

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

(Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. F. W. Schildberg)

(Direktor: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch)

**PHÄNOTYPISCHE UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG
LYMPHOZYTÄRER SUBPOPULATIONEN NACH AUSGEDEHNTER
VERBRENNUNGSVERLETZUNG**

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

vorgelegt von
Siegfried Zedler
aus
Waiblingen

2003

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Faist

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. T. Brocker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. K. H. Duswald

Prof. Dr. med. S. Endres

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

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2003

Meinen Eltern
und Elfi
in Dankbarkeit gewidmet

*„Alles Leben ist an die Zelle gebunden, und die Zelle ist nicht bloß das Gefäß des
Lebens, sie ist selbst der lebende Teil“*

Rudolf Virchow

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung	1
1.2	Pathogenese der verbrennungsinduzierten Immundysfunktion	2
1.2.1	Sepsis und Organversagen	2
1.2.2	Systemische Inflammation und Immunparalyse	4
1.2.3	Veränderungen des spezifischen Immunsystems während der systemischen Entzündung	5
1.3	Fragestellungen	11
2	IMMUNOLOGISCHE GRUNDLAGEN	13
2.1	Das Immunsystem	13
2.2	Organisation des Immunsystems	13
2.2.1	Zellen des Immunsystems	14
2.2.2	Antigenpräsentation und Lymphozytenaktivierung	15
2.2.3	T-Lymphozyten	16
2.2.4	T-Helferzellen	17
2.2.5	Suppressor-/zytotoxische T-Lymphozyten	19
2.2.6	Naive und T-Gedächtniszellen	20
2.3	Untersuchte humane T-Zell-Differenzierungsmoleküle	21
2.4	Biologische und immunologische Eigenschaften der untersuchten Lymphozytenprodukte	24
2.4.1	Interleukin-2	24
2.4.2	Interleukin-4	24
2.4.3	Interleukin-10	25
2.4.4	Interferon- γ	26
3	MATERIAL UND METHODEN	27
3.1	Geräte und Material	27
3.1.1	Geräte	27
3.1.2	Basischemikalien	27
3.1.3	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	28
3.2	Patientengut und klinische Auswahl	29
3.3	Traumata Schweregradeinteilung	29
3.4	Dokumentation und Beurteilung des klinischen Verlaufs	29
3.5	Demographische Daten	30
3.6	Probenentnahme	31
3.7	Probenaufbereitung	32
3.7.1	Separation mononukleärer Leukozyten (PBMC)	32
3.7.2	Lymphozyten-Aktivierung	33
3.8	Multiparameter-Durchflusszytometrie	35
3.8.1	Übersicht	35
3.8.2	Elektronische Kompensation der spektralen Überlappung	36
3.8.3	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	37
3.8.4	Monoklonale Antikörper zur Immuntypisierung	39
3.8.4.1	Biotinylierung des monoklonalen Antikörpers B7/BB1 (CD80)	43

3.8.5	Konzentration der Färbereagenzien	44
3.8.6	Färbeprinzipien	44
3.8.6.1	Direkte Immunfluoreszenz	44
3.8.6.2	Streptavidin-Biotin-Methode	44
3.8.7	Nachweis von Oberflächenantigenen	45
3.8.8	Zytoplasmatischer Zytokin-Nachweis	46
3.8.9	Datenaquisition und Datenanalyse	48
3.8.10	Kontrollen	48
3.8.11	Interne Qualitätssicherung	49
3.9	Fluoreszenz-Mikroskopie	50
3.10	Protein-Bestimmung	50
3.11	Statistische Auswertung	50
4	ERGEBNISSE	53
4.1	Initiale Antikörper-Titration	53
4.2	Komposition der PBMC-Fractionen	54
4.3	Phänotypisierung der PBMC	56
4.3.1	B-Lymphozyten	56
4.3.2	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	56
4.3.3	T-Lymphozyten und Subpopulationen	58
4.4	Nachweis intrazellulärer Zytokine	70
4.4.1	Die Bedeutung von Monensin und Saponin	70
4.4.2	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von intrazellulärem IFN- γ	72
4.4.3	Exemplarische Darstellung der Messergebnisse	72
4.4.4	Interleukin-2	75
4.4.5	Interferon- γ	81
4.4.6	Koexpression von IL-2 und IFN- γ	89
4.4.7	Interleukin-4	90
4.4.8	Interleukin-10	95
5	DISKUSSION	97
6	ZUSAMMENFASSUNG DER WICHTIGSTEN ERGEBNISSE	113
7	LITERATURVERZEICHNIS	117
8	ABKÜRZUNGEN	133
9	DANKSAGUNG	135
10	LEBENS LAUF	137

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

Eine tiefe und ausgedehnte Verbrennung bedeutet ein maximales Trauma für den Organismus. Die Besonderheit des thermischen Traumas liegt in der Abhängigkeit der systemischen Immunantwort von der Ausdehnung und Tiefe der Hautzerstörung. Ab einer verbrannten Körperoberfläche (total burn surface area, TBSA) von etwa 20% beim Erwachsenen muss mit systemischen Begleitreaktionen gerechnet werden. Der Verbrennungspatient ist durch das Ausmaß der Verbrennung und die damit verbundene Immunsuppression mit Beeinträchtigung aller Abwehrsysteme vielen Komplikationen ausgesetzt. Mikrobielle Kolonisation und Immunsuppression sind typische Elemente der entstehenden sogenannten „Verbrennungskrankheit“, die sich gegenseitig bedingen und verstärken können. Das septische Syndrom mit fortschreitendem Multiorganversagen stellt heute das Hauptrisiko für den schwerbrandverletzten Patienten dar. Dabei konzentrieren sich unsere heutigen Vorstellungen über die pathogenetischen Zusammenhänge auf ein „fehlgesteuertes“ Immunsystem. Auch im Zeitalter hochwirksamer Antibiotika sind etwa 75% aller spät auftretenden posttraumatischen Todesfälle auf Sepsis und damit verbundenem konsekutiven Multiorganversagen zurückzuführen. Während die „Infektion“ ein mikrobiell zugeordnetes Charakteristikum ist, reflektieren das septische Syndrom und die Sepsis eher die Antwort der körpereigenen Infektabwehr mit der typischen Entwicklung von Organversagen („Systemic Inflammatory Response Syndrome“). Dieses durch mediator-induzierte Reaktionskaskaden verursachte posttraumatische Entzündungssyndrom kann sowohl durch Bakterientoxine, als auch durch Verbrennungsnekrosen ausgelöst werden. Auch ohne mikrobielle Pathogenitätsfaktoren kann die Ausprägung der pathophysiologischen Symptomatik z.B. durch Injektion von IL-1 und TNF- α induziert werden (Marshall 1990). Träger des septischen Syndroms sind damit Zytokine und andere Entzündungsmediatoren, obwohl die physiologische Aufgabe dieser Botenstoffe eigentlich die Aktivierung und Kontrolle des Immunsystems ist.

1.2 Pathogenese der verbrennungsinduzierten Immundysfunktion

1.2.1 Sepsis und Organversagen

Primäres Leitsymptom der ausgedehnten thermischen Verletzung ist die großflächige Zerstörung der Oberfläche, die schwerbrandverletzte Patienten in der späteren posttraumatischen Phase durch Infektion und Sepsis vital gefährdet. Trotz der Fortschritte der modernen Pharmakologie und Intensivmedizin stellen schwere systemische Infektionen und Sepsis bei steigender Inzidenz und seit Erstbeschreibung des Krankheitsbildes 1909 (Jacob 1909) nahezu unveränderter Letalität (40-70%) weltweit ein großes Problem auf Intensivstationen dar (Bone 1989). Verbrennung und Infektion, massives Trauma und Gewebsschaden, Ischämie und Hämorrhagie, führen initial zu einer generalisierten inflammatorischen Antwort des Organismus, dem sogenannten "Systemic Inflammatory Response Syndrome" (SIRS). Diese nach einer Vielzahl von unspezifischen Schädigungen auftretende systemisch-inflammatorische Reaktion wird überwiegend unter dem klinischen Bild eines unkomplizierten Heilungsverlaufes unbeschadet überstanden und stellt somit eine passagere „physiologische“ Reaktion auf ein Trauma dar. Kann diese posttraumatische Entzündungsreaktion jedoch nicht mehr kontrolliert werden, entwickelt sich daraus eine Dysfunktion einzelner oder mehrerer Organe, das „Multi Organ Dysfunction Syndrome“ (MODS). Obwohl durch supportive Maßnahmen teilweise reversibel, führt das MODS häufig zum Zusammenbruch der physiologischen Regulationsvorgänge mit der Folge irreversibler Organschäden, die schließlich in ein progredientes (Multi-) Organversagen ((M)OV) münden. Beim posttraumatischen Organversagen muss zwischen unmittelbaren Organstörungen durch das direkte Trauma und damit verbundenen Gewebe- und Parenchymschäden (Lungenkontusion, Frakturen langer Röhrenknochen, Leber- und Milzverletzungen) sowie dem prolongierten Organversagen durch eine generalisierte Entzündungsreaktion, (SIRS) unterschieden werden. Das SIRS ist die Folge einer massiven Immunantwort, die als septiforme Entzündung („Sepsis Like Syndrome“) erscheint, primär allerdings nichtinfektiöser Genese ist. Andererseits kann ein intestinaler Ischämie/Reperfusionsschaden oder eine persistierende Darmischämie mit Störung der Mukosabarriere zur systemischen

Einschwemmung von Endotoxinen oder Bakterien („bakterielle Translokation“) und sekundärer bakterieller Sepsis führen (Bounous 1990). Auch bakterielle Superinfektionen durch Langzeitbeatmung oder von großen Wundflächen z.B. durch Verbrennungen sind als Folge einer sekundären Immunsuppression nicht selten. Umfangreiche experimentelle und klinische Untersuchungen der letzten Jahre weisen auf eine kaum mehr überschaubare Anzahl humoraler und zellulärer Faktoren hin, die an der Entwicklung eines posttraumatischen SIRS oder MOV beteiligt sind, wobei vielfache pathomechanistische Überschneidungen mit der Sepsis bestehen (Baue 1994). Eine Sepsis liegt vor, wenn Patienten im Rahmen einer Infektion mit Bakterien, Pilzen oder Viren mit einer systemischen Entzündungsantwort reagieren (Bone 1992). Sie manifestiert sich klinisch ebenso wie das SIRS (Tab. 1).

Tab. 1 Definition des Syndroms der systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) gemäß einer Konsensus-Konferenz des „American College of Chest Physicians“ und der „Society of Critical Care Medicine“ nach (Bone, Balk et al. 1992).

Syndrom der systemischen Entzündungsreaktion	
(Systemic Inflammatory Response Syndrome / SIRS)	
Bei infektiöser Ursache: Sepsis	
Definiert durch mindestens zwei der folgenden klinischen Symptome:	
• Körpertemperatur	> 38°C oder < 36°C
• Herzfrequenz	> 90 S/min
• Atemfrequenz	> 20 Z/min oder
PaCO ₂	< 32 mm Hg
• Leukozyten	> 12.000/mm ³ oder < 4.000/mm ³ oder
unreife Neutrophile	> 10 % (Linksverschiebung)

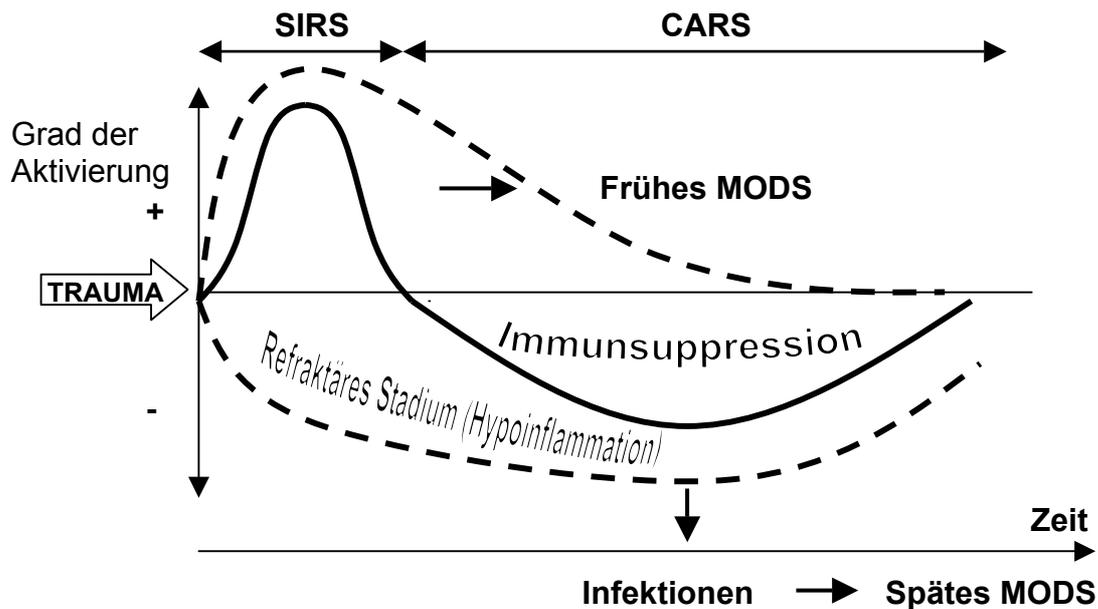


Abb. 1 Zeitlicher Verlauf der Hyperinflammation (SIRS) und der Hypoinflammation (CARS) nach Trauma und mögliche Variationen dieser Immunantwort.

1.2.2 Systemische Inflammation und Immunparalyse

Das schwere Trauma und die Sepsis führen typischerweise zu einer Immunantwort, dessen Frühphase durch eine erhöhte Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren gekennzeichnet und maßgeblich für eine lokale und/oder systemische Entzündung (SIRS) verantwortlich ist (Ertel 1993). Im weiteren Verlauf kommt es zu einer körpereigenen Gegenregulation (Volk 1996) im Sinne einer nachhaltigen antiinflammatorischen Zytokinsyntheseantwort (Immunparalyse), für die kürzlich der Begriff CARS (Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome) eingeführt wurde (Bone 1996). Allerdings dürften im Hinblick auf das temporäre Verhältnis zwischen pro- und antiinflammatorischer Antwort die Patienten im zeitlichen Verlauf wiederholt zwischen pro- und antiinflammatorischen Zuständen wechseln. Wenige Patienten mögen tatsächlich in dieses klassische, frühe pro- und späte antiinflammatorische Zytokinmuster einzuordnen sein, doch viele dürften eine verlängerte proinflammatorische Phase zeigen oder von Anfang an immunsupprimiert sein (Vincent 2000) (Abb. 1). Obwohl eine genaue Definition der pathophysiologischen Reaktion des CARS noch aussteht, setzten Keel und Ertel (Keel 1999) in Tab. 2 aufgeführte immunologische Veränderungen mit dem CARS gleich.

Tab. 2 CARS-assoziierte immunologische Veränderungen nach (Keel und Ertel 1999).

**Syndrom der kompensatorischen Gegen-Entzündungsreaktion
(Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome / CARS)**

- Lymphozytopenie
- Dominanz der T_H2-Antwort
- Hemmung der Lymphozyten/Monozyten-Interaktionen
- Erhöhte Sekretion antiinflammatorischer Mediatoren
- Hemmung der Synthese von Immunglobulinen

Trotz eines variablen Zeitpunktes für die mögliche Entwicklung eines SIRS oder CARS, ist es unstrittig, dass letztendlich die Interaktion zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren den Schweregrad der Immundysfunktion und das klinische Ergebnis der Patienten bestimmt. Entweder stellt sich nach schwerem Trauma die immunologische Balance wieder ein und es wird die Homöostase erreicht oder pro- (TNF α , IL-1, IL-6) bzw. antiinflammatorische (IL-4, IL-10) Mediatoren werden dominant und führen zu SIRS oder CARS mit der Folge von MODS und MOV (Abb. 2).

1.2.3 Veränderungen des spezifischen Immunsystems während der systemischen Entzündung

Vom immunologischen Standpunkt kommt es nach einer primären immunologischen Hyperaktivität während der chirurgischen und intensivmedizinischen Primärversorgung zu einer Dekompensation mit partieller oder subtotaler Anergie, in der Funktionsdefekte der T-Zellen, Makrophagen und Granulozyten zutage treten (Green 1988). Diese Erschöpfung der körpereigenen Defensivsysteme wird auch als Verbrauchsimmunopathie (Friedl 1992) bezeichnet und ist für die seit Jahren unverändert hohe Letalitätsrate in der späten posttraumatischen Phase mit dem konsekutiven klinischen Korrelat der postoperativen Infektionsanfälligkeit chirurgischer Risikopatienten (Faist 1992) verantwortlich.

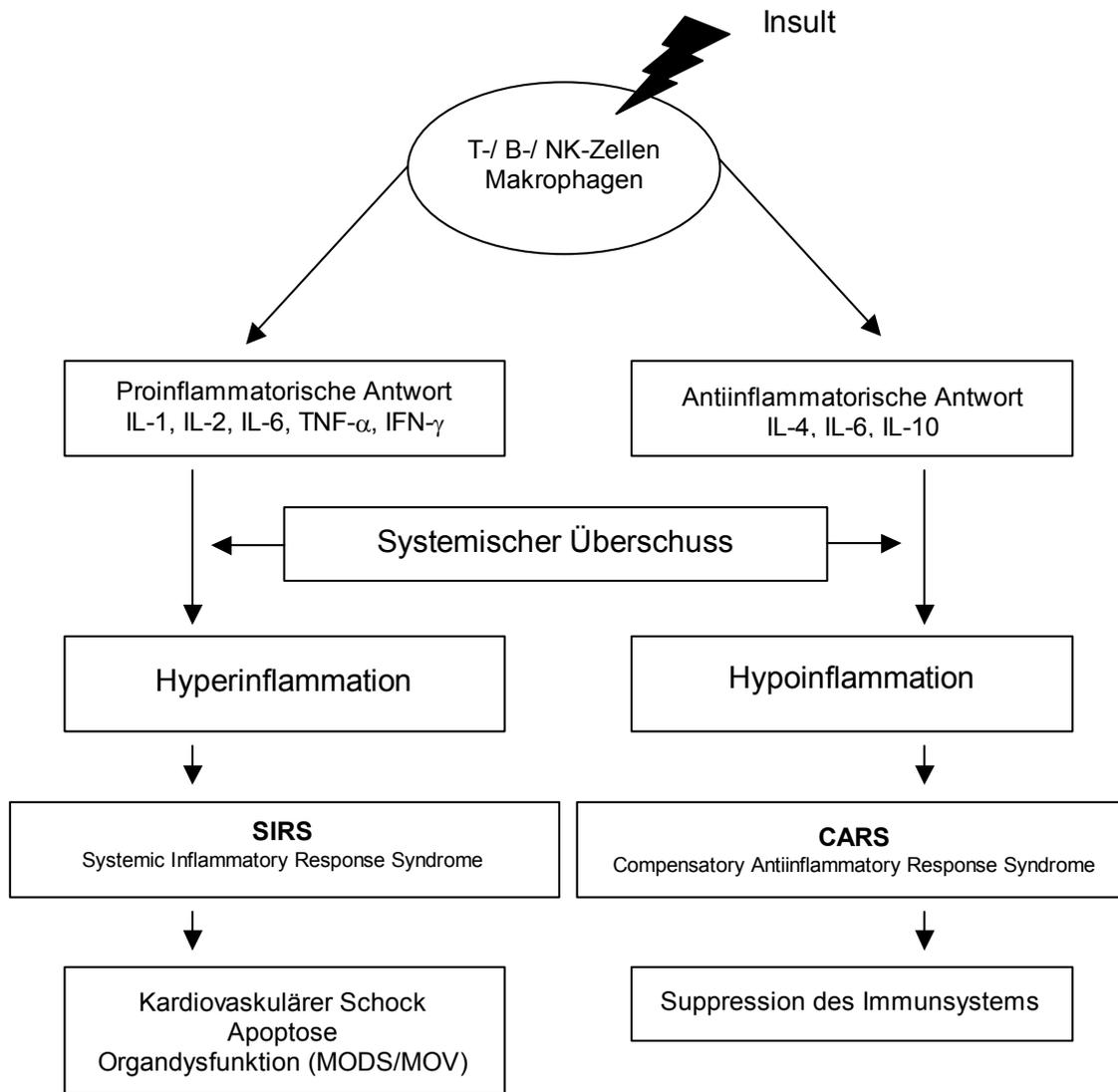


Abb. 2 Klinische Folgen einer überschießenden Immunantwort (Oberholzer 2000).

Anergie und Zeitdauer dieses Stummschaltens von Immunzellen sind korrelierbar mit dem Ausmaß der Gewebsverletzung und dem Patientenalter (Christou 1981) (Faist 1990). Diese ausgedehnte Immunsuppression nach großem chirurgischen Trauma wird als auslösendes Ereignis für den Beginn von infektiösen Komplikationen angesehen. Die zentrale Voraussetzung für das Auftreten eines septischen Multiorganversagens ist eine Dysregulation essentieller Mediatoren und Zellsysteme des körpereigenen Abwehrsystems (Goris 1985), als Resultat einer inadäquaten und unkontrollierten immunologischen Antwort auf einen adäquaten Reiz hin, z.B. einer Infektion oder einer exzessiven

Gewebsschädigung. Der prognostisch entscheidende Faktor für die Entwicklung eines Sepsissyndroms ist folglich nicht die auslösende Ursache selbst, sondern vielmehr das Ausmaß der Dysregulation dieser Systeme (De Camp 1988). In der Pathogenese des (Multi-) Organversagens aufgrund eines SIRS und nachgewiesener Infektion, z.B. Sepsis, wurde den Zytokinen, und hier insbesondere Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8), eine bedeutende Rolle zugeschrieben. IL-6, beispielsweise, wird von einer Vielzahl von Zellen (Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten) gebildet (Akira 1990) und eine seiner pleiotropen Wirkungen betrifft die Steigerung von T-Zellfunktionen (Proliferation, Zytotoxizität). Klinische Untersuchungen zeigten eine Erhöhung der IL-6 Plasmakonzentrationen nach hämorrhagischem Schock (Ertel 1991) und größerem Verbrennungstrauma (Guo 1990), die mit dem Auftreten von posttraumatischen Infektionen und dem klinischen Verlauf der Patienten korrelierten. Darüberhinaus wurde von Schlüter et al. (Schluter 1991) in isolierten mononukleären Zellen Brandverletzter eine vermehrte in vitro IL-6 Bildung dokumentiert. Neben der Aktivierung des Monozyten/Makrophagensystems betrifft die traumainduzierte Immundefizienz nahezu alle Komponenten des unspezifisch inflammatorischen und des spezifisch zellulären Immunsystems. Die zentrale Dysregulation der zellvermittelten Immunabwehr (CMI) besteht in einer Dissoziation der Monozyten/T-Zell Interaktion durch ein Überangebot von suppressorisch aktiven Monozyten und einer Unterrepräsentation der T-Zell-Hilfe (Hoyt 1990; Faist, Markewitz et al. 1992). Eine Störung des lymphozytären Systems ist nach jedem ausgedehnten Trauma feststellbar und zeigt sich häufig in einer absoluten Lymphopenie der CD3+ Lymphozyten, sowie einer gleichzeitigen Monozytose (CD14+ Zellen). Eine erfolgreiche, d.h. protektive Immunantwort ist unter anderem von der Aktivierung geeigneter T-Lymphozyten-Subpopulationen abhängig, die charakteristische Effektorfunktionen ausüben. Innerhalb dieser Subpopulationen ist eine Verschiebung der T-Helfer-(CD4+)/T-Suppressorzell-(CD8+) Ratio zugunsten der zytotoxischen und suppressoraktiven CD8+ T-Zellen zu beobachten, die mit einer verminderten proliferativen T-Zellantwort auf mitogene Stimulation, einer verringerten Interleukin-2-Produktion und einer gestörten Interleukin-2-Rezeptor-Expression einhergeht. Faist et al. (Faist 1986) konstatierten bei 11 Patienten nach Trauma eine um mehr als 70%

eingeschränkte Lymphoblastogenese, wobei 8 dieser Patienten infektiöse Komplikationen erlitten. Die supprimierte Interleukin-2-Biosynthese ist der auffälligste und persistierende Parameter der dysregulierten zellvermittelten Immunabwehr und wird aufgrund immunmodulatorischer Untersuchungen in vitro zu einem großen Teil der erhöhten Freisetzung von immunreaktivem Prostaglandin-E₂ zugeschrieben. Neben der Einschränkung der IL-2-Sekretion berichteten Faist et al. (Faist 1988), sowie Livingston et al. (Livingston 1988) von einer supprimierten Gamma-Interferon-(IFN- γ) Synthese in Lymphozyten. Im posttraumatischen Geschehen ist neben der verminderten IL-2-R-Expression (Quattrocchi 1991) eine Abnahme der monozytären Expression des menschlichen Leukozytenantigens DR (HLA-DR), einem wichtigen Histokompatibilitätsantigen der Klasse II, auffällig (Cheadle 1989), die bei Patienten mit septischen Komplikationen in erheblich stärkerem Maße supprimiert ist, als bei Patienten mit komplikationslosem Verlauf (Polk 1986).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Unterbrechung der zellvermittelten Immunantwort nach Trauma durch eine Überrepräsentation suppressoraktiver Monozyten bei gleichzeitiger inadäquater T-Zell-Hilfe bedingt ist. Die traumainduzierten Störungen der Immunfunktion durch Lymphozyten ist im wesentlichen auf drei Mechanismen zurückzuführen, die Deletion (physische Vernichtung), die bereits besprochene Anergie (Reaktionslosigkeit) und die Polarisierung, die insbesondere bei der Analyse von Zytokinsynthesemustern evident wird. Üblicherweise wird die Produktion von Zytokinen aktivierter peripherer Blutzellen entweder auf mRNA-Ebene oder über die sezernierten Proteine analysiert, wobei unklar bleiben muss, ob die Heterogenität der zytokinexprimierenden Zellen beispielsweise in Kulturen aktivierter peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) für die Koexpression der verschiedenen Zytokine verantwortlich ist oder ob individuelle Zellen verschiedene Zytokine koexprimieren. Unlängst haben Studien gezeigt, dass humane naive T_H0-Zellen als „Vorläuferzellen“, die sämtliche Lymphokine zu produzieren vermögen, auf bestimmte Antigene und Zytokine mit einer Polarisierung in zwei funktionell distinkte Phänotypen antworten. Die T_H1-Subpopulation sezerniert IL-2, IFN- γ und Tumor Nekrose Faktor beta (TNF- β) und initiiert, neben der Produktion von Immunglobulin G2a- (IgG2a), zelluläre Immunantworten. Interleukin-4 (IL-4),

Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), sowie (später) Interleukin-13 (IL-13) werden von T_H2-Zellen gebildet, welche die Synthese von Immunglobulin G1 (IgG1) und Immunglobulin-E (IgE) stimulieren. Die beiden Populationen sind in den meisten Funktionen Antagonisten und steuern über einen Regelkreis die Immunantwort. T_H1-Zellen inhibieren über IFN- γ und IL-12 die T_H2-Differenzierung und fördern ihre eigene Entstehung, wohingegen T_H2-Zellen die T_H1-Population über IL-4 und IL-10 hemmen und damit ihre eigene Konversion forcieren. In den meisten Fällen ist das Immunsystem in der Lage gegenüber einem Antigen oder Pathogen die entsprechende T_H-Antwort zu entwickeln, jedoch wird in manchen Fällen nachteilig die falsche Subpopulation aktiviert, wie die Dominanz des T_H2-Typs bei Tuberkulose, Lepra und Leishmaniasis. Die Tatsache, dass humane CD4⁺ T-Zellen aufgrund ihres Lymphokinprofils in verschiedene Subpopulation unterteilt werden können, warf die Frage auf, ob nicht auch unter den CD8⁺ T-Zellen eine ähnliche Heterogenität existiert. Tatsächlich können polarisierte CD8⁺ T-Zell-Antworten durch Analyse des Lymphokinprofils diskriminiert werden, so dass die Bezeichnung T1 und T2 treffender erscheint, als T_H1 und T_H2 (Cox 1992). Es soll hier nicht unerwähnt bleiben, dass eine übermäßige Vereinfachung nicht angebracht ist, da sich das Muster der spezifischen Immunantwort komplexer darstellt, als T1 und T2. Folglich sollten T1- und T2-Zellen nicht als zwei funktionelle Untergruppen der CD4⁺ und vielleicht auch der CD8⁺ T-Zellen betrachtet werden, sondern als polarisierte Formen der heterogenen zellvermittelten Effektorantwort.

Die verminderte IL-2-Produktion und Genexpression von T-Lymphozyten nach Verbrennungstrauma, ließen O'Sullivan et al. (O'Sullivan 1995) eine Verschiebung innerhalb der T-Helfer-Zellpopulation in Richtung eines T_H2-Phänotyps vermuten, die eine Rolle in der Pathogenese der posttraumatischen Immundysfunktion spielen könnte. Auch eine erniedrigte IFN- γ -Synthese in humanen PBMCs nach Trauma (Faist, Mewes et al. 1988), sowie ein signifikanter Anstieg der IL-4-Produktion gegenüber gesunden Kontrollen (O'Sullivan, Lederer et al. 1995) bestätigen die Hypothese einer Dominanz T_H2-ähnlicher Zytokinsynthesemuster nach schwerer Verletzung. Der Mechanismus der Differenzierung der T_H-Zellen reguliert ist bis heute nicht komplett verstanden. Es ist beispielsweise schwer zu entscheiden, ob die steigende IL-4- oder die sinkende IL-12-Produktion das entscheidende Ereignis für den "shift" in Richtung T_H2 nach

schwerem Trauma darstellt, obwohl Hsieh et al. (Hsieh 1993) in einem murinen Leishmaniasis-Experiment die Hochregulation von IL-4 als dominanten Faktor bestimmten. CD4⁺-, einige CD8⁺-T-Lymphozyten, Mastzellen und basophile Granulozyten sind bekanntermaßen Produzenten von IL-4, jedoch ist nach wie vor unklar, welche Zellen nach Trauma oder Verbrennung verstärkt dieses Zytokin sezernieren.

Das Zusammenspiel der beispielhaft genannten und anderer Zytokine als pro- und antiinflammatorische Mediatoren der initialen systemischen Entzündungsreaktion, sowie ihre mögliche Bedeutung für den weiteren klinischen Verlauf des Patienten ist allerdings noch weitgehend ungeklärt. Die Evaluierung dieser Zusammenhänge am Beispiel schwer verletzter Patienten erscheint besonders geeignet, zumal unter Berücksichtigung entsprechender Voraussetzungen von einem vormals „gesunden“ Patientengut ausgegangen werden kann, dessen Krankheitsbild einzig durch eine gegebene äußere Schädigung definiert wird und dessen Prognose maßgeblich durch ein Auftreten eines (Multi-) Organversagens beeinflusst wird. Ungefähr 80% der späten posttraumatischen Todesfälle lassen sich auf MOV und Sepsis zurückführen. Bei gleicher anatomisch definierter Verletzungsschwere (Injury Severity Score [ISS]) ist es im Einzelfall bisher nicht absehbar, ob eine Schädigung überlebt wird oder aber es zu einem Zusammenbruch der Organfunktionen kommt. Hier ist insbesondere die Frage, ob und inwieweit pro- und antiinflammatorische Mediatoren nach schwerem Trauma den klinischen Verlauf in Richtung Sepsis und Organversagen oder Heilung schon in der initialen Phase determinieren, Gegenstand derzeitiger Diskussion. Im Gegensatz zu den späten posttraumatischen Komplikationen, bei denen in zahlreichen Untersuchungen reproduzierbare Zytokinspiegel ermittelt wurden, liegen für die frühe Phase nach schwerem Trauma, die in den ersten Tagen durch die Auseinandersetzung des Individuums mit dem initialen Schaden gekennzeichnet ist, nur wenige klinische Untersuchungen vor, bei denen der kontinuierliche Verlauf der systemischen Mediatorkonzentrationen ausgehend vom Zeitpunkt der Klinikaufnahme, noch vor jeder intensivmedizinischen oder operativen Therapie, ermittelt wurde. Die initialen Mediatorkonzentrationen nach schwerem Trauma lassen jedoch zur Zeit keinen Zusammenhang mit nachfolgenden klinischen Verlaufsmustern erkennen. So konnte z.B. bislang keine Korrelation zwischen der Höhe der initialen IL-6 oder IL-8-Spiegel und einer weiteren Entwicklung eines

MOV aufgezeigt werden. Ungeachtet der weitgehend ungeklärten Regulation der Biosynthese, der Rezeptorinteraktionen und möglicher Kompartimentierungen, lassen die Bestimmungen systemischer Zytokinspiegel alleine aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeiten anscheinend keine Rückschlüsse auf die Zytokinsynthese und Sekretion und damit auf mögliche kausale Zusammenhänge in vivo zu. Da die physiologische Bedeutung der Zytokine in der Initialphase nach Trauma ungeklärt bleibt, verspricht die simultane Detektion entsprechender Mediatoren sicherlich weitere Einblicke in die Physiologie und Regulation pro- und antiinflammatorischer Mediatoren nach Trauma zu liefern. Ein methodischer Ansatz zur Evaluierung der Regulationsvorgänge im posttraumatischen Geschehen besteht in der Bestimmung der **de novo Zytokinproduktion auf Einzelzellebene** nach ex vivo Stimulation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) als Modell der Zytokinsynthese- und Sekretionsfähigkeit. Hierdurch könnte möglicherweise eine Prädisposition des Patienten zur Entwicklung von MOV und Sepsis nach schwerem Trauma anhand der Fähigkeit zur adäquaten Reaktion ermittelt werden.

1.3 Fragestellungen

Für zahlreiche Messgrößen der zellulären Immunität wurden nach schwerem Verbrennungstrauma Veränderungen beschrieben; zur prognostischen Wertigkeit dieser Messgrößen hinsichtlich infektiöser Komplikationen liegen aber bisher kaum aussagekräftige Daten vor. Andererseits herrscht allgemeine Übereinstimmung, dass beim schwer verletzten Patienten, trotz erheblicher individueller zeitlicher Unterschiede bis zur möglichen Entwicklung eines SIRS oder CARS, die Interaktion zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren letztendlich die Schwere der Immundysfunktion und somit das klinische Ergebnis des Patienten bestimmt.

Die Frage nach der Schlüsselrolle bestimmter Zytokine in der Immunregulation und ihr zellulärer Ursprung ist augenblicklich Gegenstand intensiver Forschung. Bislang nutzte man klonierte Zellen um die Zytokinsynthesemuster selektierter Zellen zu untersuchen; dabei kamen Techniken wie northern-blotting, in situ Hybridisierung, RT-PCR, zelluläre Bioassays und „sandwich ELISAs“ zum Einsatz. Genannte Methoden haben den Nachteil zeitaufwendig und arbeitsintensiv zu

sein. Außerdem erhält man in manchen Fällen nur Informationen über die Eigenschaften der gesamten analysierten Zellpopulation. Die durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Zytokine dagegen kann schnell und spezifisch Daten über die Zytokinsyntheseigenschaften individueller Zellen innerhalb einer heterogenen Zellpopulation liefern.

Das Ziel vorliegender Studie war deshalb, den individuellen Reaktionszustand des Immunsystems, von der frühen hypersensitiven Phase bis zum späten hyporeaktiven Stadium zu einem definierten Zeitpunkt nach schwerer Verbrennungsverletzung über die durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Zytokine zu erfassen (Immunmonitoring). Dieses innovative Analysesystem sollte schließlich auf seine prognostische Relevanz mit prädiktivem Wert für septische Komplikationen und letalem Ausgang geprüft werden.

2 IMMUNOLOGISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Das Immunsystem

Über 400 Millionen Jahre hat die Evolution benötigt, um den hochdifferenzierten und anpassungsfähigen Abwehrapparat in Form unseres Immunsystems zu entwickeln. Die ständige Fortentwicklung dieses Systems ermöglichte lebenden Organismen den fortwährenden Angriffen des äußeren und inneren Umfeldes zu widerstehen. Das Immunsystem hat dabei gelernt, destruktive Antworten gegen körpereigene Substanzen auszuschalten oder irreparable Zerstörungen umliegender Gewebe zu verhindern (Toleranz). Die meisten immunologischen Antworten sind von begrenzter Dauer und werden zur Vermeidung einer Überreaktion ständig regulatorisch limitiert.

2.2 Organisation des Immunsystems

Das Immunsystem schützt den Körper vor schädigenden Einflüssen durch Fremdorganismen (Bakterien, Viren, Parasiten), Schadstoffe, Toxine, sowie maligne Zellen und trägt damit wesentlich zum Erhalt seiner Integrität bei. Dazu verfügt es über ein „angeborenes“ oder unspezifisches Abwehrsystem, das in seiner Funktion nicht von einem vorausgehenden Antigenkontakt abhängt, sowie ein „erworbenes“ oder spezifisches Abwehrsystem, das erst im Laufe des Lebens eines Individuums in Anpassung an Fremdstoffe aufgebaut wird. Zum unspezifischen Abwehrsystem gehören Phagozyten und natürliche Killerzellen sowie physikalische und chemische Barrieren der Haut und Schleimhäute, antibakterielle Enzyme und Peptide in Körpersekreten (z.B. Lysozym), ferner Proteine des alternativen Weges des Komplementsystems. Im Unterschied dazu ist das erworbene Abwehrsystem durch die Fähigkeit charakterisiert, körperfremde von körpereigenen Strukturen durch Bildung spezifischer Antikörper („humorale Immunantwort“) und sensibilisierter T-Zellen („zelluläre Immunantwort“) zu unterscheiden und bei wiederholten Infektionen eine Resistenz gegenüber Krankheitserregern zu entwickeln. T- und B-Lymphozyten sind die einzigen Zellen

des Immunsystems, die Antigene erkennen und darauf reagieren können. Sie sind damit Träger der spezifischen Immunantwort und bedürfen für ihre Aktivierung und Ausübung von Effektorfunktionen meistens der Wechselwirkung mit akzessorischen Zellen. Hierzu zählen Monozyten und dendritische Zellen des spezifischen sowie Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen des unspezifischen Abwehrsystems.

2.2.1 Zellen des Immunsystems

Alle Zellen des Immunsystems stammen von pluripotenten CD34+ Stammzellen im Knochenmark ab. Sie können entsprechend ihrer Differenzierung in lymphatische und myelomonozytäre Zellreihen unterschieden werden. Aus der lymphatischen Zellreihe gehen T- und B-Zellen sowie eine dritte Population von Lymphozyten, sogenannte „Nullzellen“ oder natürliche Killerzellen hervor. Monozyten, polymorphkernige Granulozyten, Mastzellen und vermutlich auch dendritische Zellen sind myelomonozytären Ursprungs und spielen eine wichtige Rolle in der Prozessierung und Präsentation von Antigenen an T-Zellen („antigen-presenting cells“, APC). Lymphatische und myelomonozytäre Zellen des Immunsystems können heute durch Zelloberflächenantigene unterschieden werden. Einige dieser Membranstrukturen sind spezifisch für Zellen bestimmter Linien oder Differenzierungswege, während die Expression anderer je nach Aktivierungs- oder Differenzierungsgrad derselben Zelle wechselt. Nach einer internationalen Absprache mit einheitlicher Nomenklatur wird ein Oberflächenmolekül, das eine bestimmte Zelllinie oder ein Differenzierungsstadium mit bekannter Struktur aufweist und das mit einer bestimmten Gruppe („cluster“) monoklonaler Antikörper reagiert, als Mitglied eines „cluster of differentiation“ bezeichnet. Alle Oberflächenantigene der Leukozyten mit definierter Struktur erhalten daher eine „CD“-Bezeichnung. Der Stellenwert der CD-Antigene für die Klassifizierung von Lymphozyten ist beträchtlich. Beispielsweise ist der Phänotyp der meisten Helfer-T-Lymphozyten CD3+CD4+CD8- und derjenige der zytotoxischen T-Lymphozyten CD3+CD4-CD8+. Dieser Umstand erlaubt, die bei verschiedenen Immunreaktionen beteiligten Zellen zu identifizieren und ihre Reaktionsmuster und Effektorfunktionen individuell zu untersuchen. Anti-CD-

Antikörper werden auch eingesetzt, um spezifische Veränderungen in bestimmten Lymphozyten-Subpopulationen festzustellen, die im Verlauf verschiedener Erkrankungen auftreten können. Die Beeinflussbarkeit der Lymphozytenfunktion durch monoklonale Antikörper zeigt ferner, dass die Oberflächenproteine nicht ausschließlich als phänotypische Merkmale dienen, sondern dass sie selbst bei Lymphozytenreaktionen beteiligt sind. Die beiden häufigsten Funktionen verschiedener CD-Moleküle sind die Förderung von Zell-Zell-Interaktion und -Adhäsion und Signalübermittlung für die Lymphozytenaktivierung. Oberflächenmoleküle lassen sich mit fluoreszierenden Antikörpern darstellen und durchflusszytometrisch analysieren. Diese Technik, mit deren Hilfe Zellen nach Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität separiert werden können, hat die Untersuchungen lymphatischer Zellpopulationen revolutioniert.

2.2.2 Antigenpräsentation und Lymphozytenaktivierung

Jede Immunantwort beinhaltet eine Induktionsphase mit Fremdartigenerkennung durch T-Helferzellen und B-Zellen sowie eine Effektorphase mit Elimination der Fremdstrukturen durch zytotoxische T- und antikörperproduzierende B-Zellen. Die Antigenerkennung verläuft bei B- und T-Zellen unterschiedlich. Im Gegensatz zu B-Lymphozyten, die diskontinuierliche Epitope auf nativen Antigenen binden, erkennen T-Lymphozyten kontinuierliche Epitope, wobei es sich um kurze Peptide handelt, die von MHC-Molekülen auf der Membran antigenpräsentierender Zellen den T-Zellen angeboten werden (Zinkernagel 1974). Es gibt zwei Arten von MHC-Molekülen, Klasse I-MHC und Klasse II-MHC, die zur Immunglobulin-Superklasse gehören. Der T-Zellrezeptor erkennt nicht ausschließlich das gebundene Antigenpeptid, sondern auch Teile des MHC-Moleküls (Barber 1993). Antigen-Peptide entstehen durch Proteolyse von Antigenmolekülen, die entweder von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen wurden (exogene Antigene) oder aber intrazellulären Ursprungs sind (zytosolische Antigene) (Knight 1993). Exogene Antigene werden in angesäuerten Endosomen proteolytisch gespalten und von neu synthetisierten Klasse II-MHC-Molekülen, die in solche Endosomen einwandern, selektiv gebunden und zur Zelloberfläche transportiert. Dort werden sie von CD4+ T-Helferzellen erkannt wobei der CD4-Korezeptor an konstante

Domänen des MHC-Moleküls bindet (Lanzavecchia 1996; Watts 1999). Zytosolische Antigene dagegen werden über einen zytoplasmatischen Proteasekomplex zu Peptiden abgebaut, ins endoplasmatische Retikulum befördert, wo sie an Klasse-I-MHC-Moleküle binden und an die Zelloberfläche transportiert werden. Dort erkennen zytolytische CD8⁺ T-Zellen den Peptid-Klasse-I-MHC-Komplex. Analog dem CD4-Molekül bindet der CD8-Korezeptor an das Klasse-I-MHC-Molekül (Goldberg 1992) (York 1996). Für eine effektive Antigenpräsentation an T-Zellen sind neben der Wechselwirkung des MHC-Peptidkomplexes mit dem T-Zellrezeptor auch kostimulierende Signale erforderlich, die von den antigenpräsentierenden Zellen erbracht werden müssen. Dazu gehören z.B. die Produktion von Interleukin (IL) -1 und die Expression weiterer kostimulierender Moleküle, über die nach Bindung an entsprechende Liganden auf T-Zellen Proliferation und Differenzierung dieser Zellen aktiviert werden. Nach heutigem Wissensstand sind CD80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen mit Bindung an CD28 bzw. CTLA-4 auf T-Zellen sowie eine Reihe weiterer Adhäsionsmoleküle, wie z.B. CD54 (ICAM-1) von großer Bedeutung. Naive T-Zellen antworten nur dann auf ein Antigen, wenn eine antigenpräsentierende Zelle dem T-Zellrezeptor das spezifische Antigen präsentiert und gleichzeitig kostimulatorische Moleküle der B7-Familie auf der Oberfläche exprimiert, die als Liganden für CD28 dienen. Das kostimulatorische Signal über B7/CD28 ist notwendig, um die IL-2-Produktion in antigenstimulierten, naiven T-Zellen durch Stabilisierung der IL-2 mRNA zu fördern. Antigenerkennung in Abwesenheit eines kostimulatorischen Signals inaktiviert naive T-Zellen. Sie werden anergisch, d.h. sie können kein IL-2 produzieren. Demzufolge wird auch ihre klonale Expansion und Differenzierung zu T-Effektorzellen unterbunden.

2.2.3 T-Lymphozyten

Normalerweise machen die Lymphozyten 20-40% der zirkulierenden weißen Blutkörperchen aus. Etwa 70% der zirkulierenden Lymphozyten tragen T-Zellmarker. Das eigentliche Charakteristikum der T-Zelle ist der T-Zellrezeptor (TCR), dem der Oberflächenmarker CD3 assoziiert ist. Der T-Zellrezeptor dient der Erkennung von präsentiertem Antigen und löst die Aktivierung des

Lymphozyten aus. Es gibt zwei verschiedene Typen von Rezeptoren, wobei etwa 95% der T-Lymphozyten den α/β -TCR für Antigen tragen. T-Lymphozyten mit dem γ/δ -TCR stellen nur etwa 5% der zirkulierenden T-Zellen dar. Sie erkennen auch nicht-Peptid-Antigene und sind nicht MHC-restringiert. Anhand der CD4- und CD8-Antigene können die T-Lymphozyten in zwei weitere wichtige Subpopulationen, die Helfer- und die Suppressor-/zytotoxischen Zellen differenziert werden.

2.2.4 T-Helferzellen

Unter dem Begriff T-Helferzellen werden alle T-Zellen zusammengefasst, die anderen Zellen des Immunsystems bei der Ausübung ihrer besonderen Funktion zu Hilfe kommen. Dieser Definition nach unterstützen T-Helferzellen die Fähigkeit von Makrophagen zur Antigenpräsentation, die Differenzierung von Vorläufern in zytotoxische T-Zellen und die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten in antikörperbildende Plasmazellen. Sie repräsentieren somit eine Lymphozytensubpopulation mit immunregulatorischen Aufgaben. Ihr charakteristisches Merkmal ist der CD4-Rezeptor, der beim Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen dem Zellkontakt und der interzellulären Adhäsion dient. Hierbei bindet der CD4-Rezeptor an Proteine des MHC Klasse II. Diese MHC-Restriktion bedeutet, dass die CD4+ T-Helferzellen nur von antigenpräsentierenden Zellen, überwiegend Monozyten, aktiviert werden können, die MHC der Klasse II tragen. Nur wenige der ruhenden Makrophagen exprimieren auf ihrer Oberfläche diese Transportmoleküle. Sie sind antigenpräsentierende Zellen der „zweiten“ Generation. Zur Ausprägung der Klasse-II-MHC-Antigene müssen Makrophagen aktiviert werden, während die antigenpräsentierenden Zellen der „ersten“ Generation (dendritische Zellen und Langerhans-Zellen) diese Proteine konstitutiv tragen.

Es ist allgemein akzeptiert, dass sich eine ruhende naive Vorläuferzelle durch die Interaktion mit einer APC in eine aktivierte Zelle mit Effektorfunktionen wandelt. Eine Differenzierung der Effektor-T-Zellen beruht im wesentlichen auf der Analyse des Zytokinprofils, das von aktivierten T-Zellen sezerniert wird. Es ist allgemein akzeptiert, dass sich eine ruhende naive Vorläuferzelle durch die Interaktion mit einer APC in eine aktivierte Zelle mit Effektorfunktionen wandelt. Eine

Differenzierung der Effektor-T-Zellen beruht im wesentlichen auf der Analyse des Zytokinprofils, das von aktivierten T-Zellen sezerniert wird (Mosmann 1989). Aktivierte T-Lymphozyten setzen eine Reihe von Zytokinen frei, welche die Immunantwort regulieren. Bestimmte Zytokine aktivieren präferenziell bestimmte Effektorzellen bzw. fördern ihre Reifung, so z.B. $\text{IFN-}\gamma$ Monozyten und Makrophagen. Ausserdem wird von Zytokinen die B-Zell-Reifung zu Plasmazellen gesteuert. Entsprechend dem Zytokinsynthesemuster kann eine qualitativ unterschiedliche Immunantwort erfolgen. Eine überwiegende $\text{IFN-}\gamma$ -Produktion führt beispielsweise zur Stimulation von Makrophagen (Talmadge 1986), eine starke IL-4-Produktion zur B-Zell-Reifung und Immunglobulin-Produktion (Paul 1987). T-Zellen sezernieren nach wiederholter oder nach chronischer Stimulation ein eingeschränktes, zum Teil unterschiedliches Zytokinmuster. Dies trifft sowohl für CD4+ - wie CD8+ -T-Lymphozyten zu, wobei CD4+ -T-Zellen besser untersucht sind. T_{H0} -Zellen sind noch wenig differenziert und sezernieren nach Aktivierung eine breite Palette von Zytokinen in geringen Mengen (IL-2, IL-4, IL-5, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-10 u.a.), die zum Teil antagonistisch wirken. T_{H0} -Zellen werden vornehmlich in der initialen Phase einer Immunantwort bzw. auf singulären Reiz induziert. Chronische Stimulationen bewirken ein Ausreifen der T_{H0} -Zellen zu T_{H} -Zellen, die ein mehr eingeschränktes Zytokinmuster sezernieren und nach Aktivierung in der Regel hohe Konzentrationen bestimmter Zytokine freisetzen. Abhängig von der Dominanz des einen oder anderen Zytokins sind funktionell unterschiedliche T-Lymphozyten-Subpopulationen nachgewiesen. T_{H1} -Zellen produzieren viel IL-2, $\text{IFN-}\gamma$ und IL-12, aber nur wenig bis kein IL-4 und IL-5, wogegen T_{H2} -Zellen mehr IL-4 und IL-5, aber kaum IL-2 und IL-12 synthetisieren. Andere Zytokine, wie IL-6, IL-10, GM-CSF, $\text{TNF-}\alpha$, sowie IL-13 können beim Menschen nicht eindeutig den T_{H1} - oder T_{H2} -Zellen zugeordnet werden (Del Prete 1994; Sad 1995). T_{H1} / T_{H2} sollte nicht als streng dichotome Unterscheidung verstanden werden, sondern eher als tendenzieller denn absoluter Unterschied der Zytokinproduktion. Besonders im humanen System wird deshalb häufig der Begriff T_{H1} - oder T_{H2} -ähnlich verwendet. Dennoch ist diese Diskriminierung konzeptionell sehr wertvoll, da sie unterschiedliche Immunreaktionen erklärt. Nach neueren Befunden existieren beim Menschen nur relativ wenige „reine“ T_{H1} - und T_{H2} -Zellen mit dem typischen Zytokinsekretionsprofil. Die meisten Helferzellen

stellen anscheinend Mischformen dar, meist jedoch mit Überwiegen der einen oder anderen Helferfunktion (Mosmann 1989; Romagnani 1994; Abbas 1996). Kürzlich wurden T_H3 -Zellen beschrieben, die hohe Mengen TGF- β produzieren und durch orale Immunisierung induziert werden können (Fukaura 1996). Regulatorische T_R1 -Zellen können Immunreaktionen supprimieren und sind durch eine hohe IL-10 Syntheseleistung charakterisiert (Groux 1997). Eine pathologische Rolle ist diesen Zellen aber derzeit noch nicht zugeordnet worden.

2.2.5 Suppressor-/zytotoxische T-Lymphozyten

Die Suppressor-/zytotoxischen T-Lymphozyten tragen den Oberflächenmarker CD8, wobei reife Zellen entweder CD8+ oder CD4+ sind und nur unreife Thymozyten auch beide Oberflächenmarker tragen können. Analog dem CD4-Rezeptor dient auch der CD8-Rezeptor dem Zellkontakt über MHC-Proteine, allerdings werden MHC-Strukturen der Klasse I gebunden, die von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden. Funktionell lassen sich die CD8+ Zellen in zwei Gruppen einteilen. Die Hauptaufgabe der zytotoxischen T-Lymphozyten ist die Erkennung und Zerstörung virusinfizierter Körperzellen, die andere Gruppe der CD8+ Zellen, die vermeintlichen Suppressorzellen, hemmen überschießende Immunreaktionen. Allerdings sind letztere funktionell und morphologisch noch nicht eindeutig definiert, so dass die Existenz einer T-Suppressorzelle weiterhin umstritten bleibt. Einerseits gibt es keinen Zweifel über die Fähigkeit von T-Zellen, Immunreaktionen funktionell zu supprimieren, andererseits gibt es jedoch keine eindeutigen experimentellen Belege für die Existenz einer eigenständigen T-Suppressorzelle. Die Suppression der Immunantwort durch spezifische T-Zellsubpopulationen oder durch Zellen, die in anderen Situationen helfend oder zytotoxisch wirken, wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. Auf jeden Fall ist das Immunsystem in der Lage, den Ablauf einer Immunreaktion auch nach der Aktivierung von Helferzellen zu hemmen bzw. ganz zu unterdrücken.

Die meisten Lymphozyten haben immunregulatorische Aufgaben, nur etwa 20-30% der T-Lymphozyten wirken zytotoxisch und gehören zu den Effektorzellen der Immunantwort. Dies zeigt die Bedeutung der Regulation.

Mittlerweise häufen sich die Hinweise, dass auch bei CD8-positiven T-Lymphozyten Subpopulationen mit unterschiedlichen Sekretionsmustern vorkommen. Sie werden analog der T_H1/ T_H2 -Terminologie mit T cytotoxisch (Tc) 1 und (Tc) 2 bezeichnet (Sad, Marcotte et al. 1995). Der Tc1-Effektorphänotyp exprimiert ein T_H1-ähnliches Zytokinmuster. Die Produktion von IFN- γ , TNF- α und LT weist dabei auf die direkte Zytotoxizität dieses CD8+ Subtyps hin, da diese drei Zytokine zytotoxische Funktionen in Makrophagen und Granulozyten aktivieren (Fong 1990).

2.2.6 Naive und T-Gedächtniszellen

Eine weitere Unterteilungsmöglichkeit der T-Lymphozyten beruht auf der unterschiedlichen Expression von CD45-Isoformen durch alternatives Spleißen des RNA-Transkripts. CD45, das „leukocyte common antigen“, ist ein großes Membranmolekül mit einem ungefähr 700 Aminosäuren langen intrazellulären Anteil, der zwei Phosphotyrosinphosphatase-Domänen enthält. CD45 wird von allen Leukozyten exprimiert, auf Lymphozyten (etwa 10% der Oberfläche ist CD45), Monozyten und Granulozyten in absteigender Menge. Das CD45-Gen weist 33 Exons auf, wobei die Exons 4, 5, 6 unterschiedlich transkribiert werden können. Das 220 kDa Polypeptid enthält alle drei Exons (CD45), den Zwischenformen CD45RA, RB oder RC fehlt Exon 4, 5 bzw. 6 und die Isoform ohne die Exons 4, 5 und 6 ist das nur 180 kDa große Protein CD45RO. Mit CD45-isoformspezifischen monoklonalen Antikörpern können unterschiedliche Differenzierungszustände von T-Zellpopulationen charakterisiert werden, beispielsweise CD45RA auf naiven/ruhenden T-Zellen. Aktivierte T-Zellen und T-Gedächtniszellen dagegen exprimieren die CD45RO-Isoform, die den T-Zellrezeptor mit seinen Korezeptoren CD4 oder CD8 verbindet. Diese Veränderung von CD45 steigert die Sensitivität des T-Zellrezeptors für sein Antigen. Ob die CD45-Isoformen tatsächlich zur Abgrenzung von naiven T-Zellen und T-Gedächtniszellen beitragen, ist umstritten. Funktionelle Unterschiede, die durch diese Antikörper bei CD4+ T-Zellen erfasst werden, sind auf das unterschiedliche Verhaltensmuster der naiven und aktivierten Zellen zurückzuführen.

2.3 Untersuchte humane T-Zell-Differenzierungsmoleküle

Das **CD2**-Molekül (LFA-2) ist ein monomeres 50kDa-Glykoprotein, das ursprünglich als Rezeptor für T-Zell-Rosetten-bildende Schafserythrozyten entdeckt wurde und nun als LFA-3 (CD58)-Ligand identifiziert ist. Es kommt auf 80% der Lymphozyten in normalem humanem peripherem Blut vor, auf 95% der Thymozyten und 100% der T-Lymphozyten. Auch ein hoher Anteil der NK-Zellen exprimiert CD2. Als Adhäsionsmolekül wird CD2 nach Aktivierung naiver T-Zellen verstärkt exprimiert. Dabei steigert die erhöhte Anzahl von CD2 Molekülen die Avidität der Wechselwirkung zwischen aktivierten T-Zellen und potentiellen Zielzellen.

Das **CD3**-Antigen ist Teil eines größeren Komplexes, der den T-Zellrezeptor (TCR) beinhaltet. Es wird von reifen T-Zellen exprimiert. Die CD3-Antikörper reagieren mit 70 bis 80% der Lymphozyten aus humanem peripherem Blut und 10-20% der Thymozyten. T-Zell-Aktivierung kann durch Bindung eines Fremdantigens an den TCR induziert werden.

Das **CD4**-Molekül (T4) ist ein Transmembranglykoprotein, das aus einer einzelnen Kette von 59 kDa besteht. Es kommt auf der Helfer-T-Zellsubpopulation vor, die etwa 45% der peripheren Blutlymphozyten repräsentiert und dient diesen Zellen zur Erkennung von MHC II-Molekülen. Das CD4-Antigen wird ebenfalls auf Monozyten exprimiert, allerdings mit geringerer Dichte als auf den CD4⁺-T-Zellen.

Das **CD7**-Molekül ist ein einzelkettiges Protein von 40kDa, das auf einem Großteil der peripheren Blut-T-Zellen gefunden wird. Auch die meisten NK-Zellen exprimieren dieses Antigen, Monozyten nur schwach und B-Zellen sowie Granulozyten überhaupt nicht.

Das **CD8**-Antigen (T8) ist ein Disulfidbrücken-vernetztes Dimer mit einem Monomergewicht von ca. 32-34 kDa. Das CD8-Molekül kommt auf zytotoxischen/Suppressor-T-Zellen vor, die etwa 20-35% der humanen peripheren Blutlymphozyten ausmachen. Auch eine NK-Zellsubpopulation exprimiert dieses Antigen mit niedriger bis mittlerer Dichte. CD8 wirkt zusammen mit dem TCR als Korezeptor für MHC I-Moleküle bei der Antigenerkennung.

Das **CD11b**-Antigen (Mac-1) stellt die 165/95 kDa Integrin α M-Kette dar, die nicht-kovalent mit dem CD18-Antigen (Integrin β 2) assoziiert ist. CD11b wurde als der

C3bi Komplementrezeptor (CR3) identifiziert und wird von aktivierten Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und einer Teilpopulation der NK-Zellen exprimiert. Als Mitglied der $\beta 2$ Integrinfamilie der Adhäsionsmoleküle vermittelt CD11b Zell-/Zell- und Zell-/Substratinteraktionen (Bindung von PMN und Monozyten an Endothel). Weitere Liganden sind z.B. CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2), CD50 (ICAM-3).

Das **CD14**-Antigen ist ein Glykosyl-Phosphatidylinositol-verankertes einkettiges Oberflächenmembranglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 55kDa. Es ist der Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid (LPS) und dem LPS-bindenden Protein (LBP). CD14 kommt auf Zellen der myelomonozytären Reihe vor und wird von Monozyten und Makrophagen stark, von Granulozyten und B-Zellen dagegen schwach exprimiert.

CD16 (Fc γ RIII) wird von den meisten NK-Zellen, aber auch von Neutrophilen exprimiert. Das Antigen geht während der Aktivierung von NK-Zellen verloren und wird nur relativ schwach exprimiert.

Das **CD19**-Antigen ist ein integrales Membranglykoprotein vom Typ I mit einem Molekulargewicht von 90 kDa und wird von allen normalen B-Zellen einschließlich der frühen Stadien, nicht aber von Plasmazellen, exprimiert. Auf normalen T-Zellen, Monozyten und Granulozyten ist dieses Antigen nicht vorhanden.

CD25 (Tac) ist ein 55 kDa einzelkettiges Glykoprotein und stellt den niedrigaffinen Rezeptor für IL-2 dar. Er wird auf aktivierten T- und B-Lymphozyten, sowie auf aktivierten Makrophagen exprimiert.

Das **CD28**-Antigen (Tp44) ist ein Homodimer aus Disulfidbrücken-vernetzten Ketten mit einem Molekulargewicht von jeweils 44kDa. Es wird von 60-80% der CD3+-T-Zellen exprimiert. 95% der CD4+-T-Zellen tragen dieses Antigen, während CD8+-Zellen nur zu 50% CD28-positiv sind. CD28 spielt eine wichtige Rolle in der Adhäsion zwischen T- und B-Zellen über seine Liganden CD80 (B7-1/BB1) und CD86 (B7-2).

Das **CD29**-Antigen ist ein transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 110 kDa von dem bekannt ist, dass es als $\beta 1$ -Integrin nicht kovalent an $\alpha 1$ -8- und α -V-Integrine bindet. Diese CD29-Komplexe sind in Abhängigkeit von der mit CD29 assoziierten Alpha-Untereinheit an der Zell-/Zell-Adhäsion beteiligt. Ruhende T-Zellen exprimieren den „Homing“-Rezeptor CD62L

(L-Selektin), der die Zirkulation dieser Zellen durch die Lymphknoten vermittelt. Ein Durchbrechen der Endothelbarriere des lymphatischen Gewebes ist den Zellen jedoch nicht möglich. T-Effektorzellen verlieren die L-Selektine auf ihrer Oberfläche und exprimieren statt dessen größere Mengen des Integrins VLA-4 (**CD29/CD49d**), das als „Homing“-Rezeptor für das vaskuläre Endothel an Entzündungsstellen dient. Die „Inducer“-Subpopulation der CD4⁺-Lymphozyten koexprimiert CD4 und CD29.

Das **CD45RA**-Epitop kommt auf allen CD45-restringierten Molekülen vor, bei denen das A-Exon exprimiert wird. Diese hochmolekulare 220 kDa-Isoform findet man auf ungefähr 40-50% der peripheren CD4⁺ T-Zellen, 50% der peripheren CD8⁺ T-Zellen, sowie einem Teil der B-Zellen und Monozyten. Die Koexpression von CD4- und CD45RA-Antigenen ermöglicht die Identifizierung der „naiven“ (vormals „Suppressor/Inducer“) Subpopulation von CD4⁺ T-Lymphozyten.

CD45RO ist mit 180 kDa die CD45-restringierte Form mit dem geringsten Molekulargewicht. Es handelt sich um eine Null-Isoform bei der alle drei Exons herausgeschnitten sind. Das Antigen ist ein einzelkettiges Glykoprotein, das von einer Teilpopulation der CD4⁺-Gedächtnis-T-Zellen, von aktivierten T-Lymphozyten und auch schwach von Monozyten und Granulozyten exprimiert wird.

Das **CD56**-Antigen (NKH-1) ist die GPI-verankerte Isoform des 140 kDa neuronalen Zelladhäsionsmoleküls „N-CAM“. Es wird von allen Zellen mit natürlicher Killerzellaktivität exprimiert, d.h. von NK-Zellen und von einigen T-Lymphozyten. CD3⁺CD56⁺ T-Lymphozyten umfassen eine Untergruppe der zytotoxischen T-Lymphozyten, die nicht-MHC restringierte Zytotoxizität vermitteln.

Das Membranprotein **CD80 (B7-1, BB1)** wird auf aktivierten B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Auf Monozyten wird die Expression von CD80 erst nach IFN- γ -Stimulation induziert. In der späten Aktivierungsphase werden B7-Moleküle auch auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert, so dass diese aktivierten T-Zellen vermutlich auch zur autokrinen Kostimulation über den CD28-Signaltransduktionsweg in der Lage sind.

Der α/β **T-Zellrezeptor (TCR)** ist ein 80 kDa Heterodimer, bestehend aus einer α -Kette mit 44 kDa und einer β -Kette mit 37 kDa, die über Disulfidbrücken vernetzt sind. Der TCR α/β wird von mehr als 95% aller CD3⁺ T-Lymphozyten exprimiert.

2.4 Biologische und immunologische Eigenschaften der untersuchten Lymphozytenprodukte

2.4.1 Interleukin-2

Interleukin (IL)-2, früher auch T-Zell-Wachstumsfaktor genannt, und seine Rezeptoren regeln entscheidend die Stärke und Dauer einer T-zellvermittelten Immunantwort. Es wurde in Kulturüberständen mitogenstimulierter Blutlymphozyten entdeckt und 1976 erstmals durch Morgan et al. (Morgan 1976) beschrieben. Im Jahr 1979 ist auf dem zweiten Internationalen Lymphokin Workshop der Name IL-2 festgelegt worden. IL-2 ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 14-16 kDa (abhängig vom Glykolisierungsgrad), das vor allem von aktivierten CD4⁺ T-Zellen, in beschränktem Umfang auch von CD8⁺ T-Zellen sezerniert wird. Es aktiviert die T-Lymphozyten und ist das wichtigste Zytokin, das die Zellen von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus bringt und damit deren Wachstum stimuliert. Die Wirkung von IL-2 ist nicht auf die produzierende Zelle selbst beschränkt (autokriner Wachstumsfaktor), sondern erstreckt sich auch auf benachbarte, unbeteiligte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (parakriner Wachstumsfaktor). IL-2 regt T-Zellen auch zur Bildung anderer T-Zell-Zytokine an, insbesondere von IFN- γ und Lymphotoxin (LT). Außerdem stimuliert IL-2 das Wachstum der NK-Zellen und erhöht ihre zytotoxische Fähigkeit, so dass sogenannte lymphokinaktivierte Killerzellen (LAK) entstehen. Auf B-Zellen wirkt IL-2 als Wachstumsfaktor und Stimulus für die Antikörpersynthese.

2.4.2 Interleukin-4

Interleukin-4 (IL-4) wurde 1982 als eine das B-Zellwachstum fördernde Substanz beschrieben (Isakson 1982) (Howard 1982). Es ist ein Zytokin von etwa 20 kDa mit pleiotropen Wirkungen, dessen wichtigste physiologische Funktion wohl die Regulation allergischer Reaktionen ist, insbesondere durch den stimulatorischen Effekt auf B-Lymphozyten zur IgE-Produktion. IL-4 wird von CD4⁺ T-Lymphozyten, speziell jenen der T_H2-Subpopulation, von aktivierten Mastzellen und basophilen Granulozyten, sowie von einigen CD8⁺ T-Zellen produziert und wirkt auf verschiedene Zelltypen. Für T-Zellen ist IL-4 ein Wachstums- und

Differenzierungsfaktor, insbesondere für Zellen des T_H2-Typs, die die wirksamsten Helferzellen für B-Zellen sind. Außerdem fördert IL-4 die Entwicklung der IL-4 und IL-5 sezernierenden T_H2-Zellen aus naiven T-Zellen, die mit Antigen stimuliert wurden. Dies bedeutet, dass eine Stimulation, die zur IL-4-Produktion führt, schon früh nach der Antigenexposition die Entwicklung von T_H2-Zellen fördert, wobei die frühe Quelle des IL-4 unbekannt ist. IL-4 wirkt außerdem als autokriner Wachstumsfaktor für differenzierte T_H2-Zellen, wobei der antagonistische Effekt zu IFN- γ besonders hervorzuheben ist. IL-4 hemmt somit auch die Makrophagen-Aktivierung, einschließlich der erhöhten Produktion von Zytokinen wie IL-1 α , IL-1 β und TNF- α . Diese Wirkung hat auch IL-10, ein Produkt der T_H2-Zellen (aber auch der Monozyten) und ist einer der wichtigsten Gründe, warum die Aktivierung der T_H2-Zellen oft von einer Suppression der makrophagenvermittelten Immunreaktionen begleitet ist.

2.4.3 Interleukin-10

Das 1989 entdeckte (Fiorentino 1989) pleiotrope Interleukin-(IL) 10 ist ein 18 kDa schweres Zytokin, das von CD4⁺ T-Zellen, T_H0- und T_H2-Zellklonen sowie von CD8⁺ T-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Keratinozyten und aktivierten B-Zellen gebildet wird, also strenggenommen kein T_H2-spezifisches Zytokin ist. Nach Aktivierung von Monozyten/Makrophagen wird es verglichen mit anderen Zytokinen relativ spät synthetisiert. Die Produktion von IL-10 wird durch IL-4 und IFN- γ gehemmt. Andererseits inhibiert IL-10 die von Monozyten/Makrophagen abhängige T-Zellproliferation und Zytokinproduktion. Die Hemmung der Produktion von IFN- γ , TNF- α , GM-CSF und Lymphotoxin durch humanes IL-10 lässt sich auf Protein- und RNA-Ebene nachweisen. Auch die LPS-stimulierte Synthese der Monozytenprodukte IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF und G-CSF wird durch IL-10 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene inhibiert. IL-10 wirkt außerdem regulatorisch auf die T_H1-Antwort, indem die durch dendritische Zellen induzierte IFN- γ -Produktion von T_H1-Zellen gehemmt wird. Allerdings ist IL-10 nicht der wichtigste Mediator der T_H2-Antwort, sondern IL-4. IL-4 ist das Zytokin, das T_H2-Zellen in Proliferation hält und vor Apoptose rettet.

2.4.4 Interferon- γ

1957 entdeckten Isaacs und Lindemann (Isaacs 1957) einen löslichen Faktor, der aus virusinfiziertem Gewebe freigesetzt wurde und mit der Virusreplikation im nichtinfizierten Gewebe „interferierte“. Entsprechend seiner Wirkung nannte man diesen Faktor Interferon, von dem drei Proteine bzw. Proteingruppen bezeichnet mit α , β (Typ-I-Interferone) und γ (Typ-II-Interferon) unterschieden werden.

IFN- γ ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 21 bis 24 kDa, abhängig vom Glykolisierungsgrad, das keinerlei Sequenzhomologien zu den Typ-I-Interferonen aufweist. Es wird nach Aktivierung von naiven (T_H0) und T_H1 CD4+ T-Helferzellen, von nahezu allen CD8+ T-Lymphozyten und von NK-Zellen produziert. Die Transkription beginnt direkt als Konsequenz der Antigenaktivierung und wird durch IL-2, IL-12 und IL-18 erhöht. IFN- γ hat eine bedeutsame immunmodulatorische Wirkung durch Steigerung der Phagozytose und der akzessorischen Funktion von Monozyten und Makrophagen als antigenpräsentierende Zellen. Durch eine vermehrte Expression von Histokompatibilitätsantigenen der Klassen I und II fördert IFN- γ die Erkennungsphase der Immunantwort und verstärkt über diesen Mechanismus sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort. IFN- γ ist das sogenannte „Priming“-Signal aus Lymphozyten, das Makrophagen empfänglich macht für die sogenannten „Trigger“-Signale wie bakterielles LPS, TNF- α oder IL-1. Dieses Zweistufensystem der Makrophagenaktivierung ist eines der wirkungsvollsten Effektorsysteme der Immunantwort und erzielt kurzfristig für Stunden in Makrophagen einen extrem hohen Anstieg der Abwehrfunktion. IFN- γ stimuliert die Differenzierung der naiven CD4+ T-Zellen in Richtung der T_H1 -Subpopulation und hemmt das Wachstum der T_H2 -Zellen. Außerdem hemmt IFN- γ das durch IL-4 induzierte Wachstum von B-Lymphozyten und antagonisiert damit als T_H1 -Zytokin die durch T_H2 -Zellen gesteuerte IgG1- und IgE-Synthese. Auch spielt IFN- γ für die Steigerung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen und bei der Entstehung und Reifung von zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8+ CTL) eine wichtige Rolle.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte und Material

3.1.1 Geräte

- Durchflusszytometer:
FACScan der Fa. Becton-Dickinson, San Jose (CA), USA;
- Fotomikroskop:
Axiophot mit Epifluoreszenzeinrichtung der Fa. Zeiss, Oberkochen;
- Zentrifugen:
Varifuge K und Varifuge 3.2 S, beide Fa. Heraeus, Osterode;
- Cytospin 2 der Fa. Shandon, Pittsburgh (PA), USA;
- Begasungsbrutschrank B 5060 EC/CO₂ der Fa. Heraeus, Hanau;
- Sicherheitssterilwerkbank, Klasse II, BSB 6, Fa. Flow Laboratories, Meckenheim;

3.1.2 Basischemikalien

- Albumin, bovin (BSA), initiale Fraktion, min. 98%, A 7030, Fa. Sigma, Deisenhofen;
- Monensin, Natrium-Salz, M.W. 692.9, Fa. ICN Biomedicals, Eschwege;
Stammlösung zu 300 µM in Ethanol absolut;
- Saponin, Fa. ICN Biomedicals, Eschwege;
- Ionomycin, Kalzium-Salz, M.W. 747.1, I 0634, Fa. Sigma, Deisenhofen;
Stammlösung zu 1 mM in DMSO;
- Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA), approx. 99%, M.W. 616.8, P 8139, Fa. Sigma, Deisenhofen; Stammlösung zu 1 mg/ml in DMSO;
- Natriumazid, reinst, Fa. Merck, Darmstadt;
- Paraformaldehyd, zur Synthese, Fa. Merck, Darmstadt;
- Foetales Kälberserum (FCS), mykoplasmengetestet, Fa. Vitromex, Vilshofen;
- Dimethylsulfoxid (DMSO), zur Analyse, Fa. Merck, Darmstadt;
- Dimethylformamid (DMF), zur Analyse, Fa. Merck, Darmstadt;

- D-Biotinoyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester, Kat.-Nr. 1008960, Fa. Boehringer, Mannheim;
- Weizenkeimagglutinin (Lektin aus *Triticum vulgare*), TRITC-markiert, M.G. \sim 36000, L 5266, Fa. Sigma, Deisenhofen;

3.1.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

- RPMI 1640 Kulturmedium mit L-Glutamin und 25 mM HEPES, Kat.-Nr. 52400-025, Fa. Gibco, Paisley, UK;
- Hanks Gepufferte Salzlösung (HBSS), Kat.-Nr. 24020-091, Fa. Gibco, Paisley, UK;
- HEPES Pufferlösung 1M, flüssig in aqua dest., Kat.-Nr. 15630-056, Fa. Gibco, Paisley, UK;
- Phosphat-gepufferte-Saline (PBS), pH 7,2, (Natriumchlorid 5,48 g, di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat 10,12 g, Kaliumdihydrogenphosphat 2,28 g, Wasser f. Injektionszwecke ad 1000 ml), Apotheke Klinikum Innenstadt;
- Ficoll-Hypaque Separationslösung, isotonisch, Dichte 1.077, Fa. Biochrome, Berlin;
- Refobacin 80 (wässrige Gentamicinsulfatlösung, 133,3 mg/2 ml entsprechend 80 mg Gentamicin), Fa. Merck, Darmstadt;
- Erythrozyten-LysemEDIUM, pH 7,3, (Ammoniumchlorid 82,90 g, Kaliumhydrogencarbonat 10,00 g, Tetra-Natrium-EDTA 0,37 g, gereinigtes Wasser ad 1000 ml), Apotheke Klinikum Innenstadt, Gebrauchsverdünnung 1:10 in aqua dest.;
- Fixierungslösung (Paraformaldehyd 4.0 g, HEPES Pufferlösung (1 M) 1,0 ml, Hanks Gepufferte Salzlösung (HBSS) ad 100 ml);
- Trypan Blau-Lösung, 0,5%, steril, Kat.-Nr. 47285, Fa. Serva, Heidelberg;

3.2 Patientengut und klinische Auswahl

Das Untersuchungskollektiv wurde aus der Abteilung für plastische und wiederherstellende Chirurgie (Zentrum für Schwerbrandverletzte) des Städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen rekrutiert. Voraussetzung für die Aufnahme in die prospektive Studie waren mindestens 30 % Verbrennung Grad II und/oder III der Gesamtkörperoberfläche. Weitere Aufnahmebedingungen waren die Möglichkeit des Studienbeginns am ersten Tag post Trauma, sowie das Einverständnis der Patienten oder ihrer Angehörigen. Um mögliche Zusatzverletzungen adäquat mitbeurteilen zu können, bewerteten wir die Patientengruppe zusätzlich nach dem Injury Severity Score (ISS). Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der LMU genehmigt.

3.3 Traumaschweregradeinteilung

Der Schweregrad der Gesamtverletzung bestimmt die posttraumatische Morbidität und Letalität. Die Beurteilung erfolgte anhand des Abbreviated Injury Scale (AIS) und des Injury Severity Score (ISS) (Goris 1983; Greenspan 1985), einer anerkannten und zuverlässigen, rein anatomischen Möglichkeit zur Abschätzung von Traumaschwere, Komplikationswahrscheinlichkeit und klinischem Ergebnis (Bevan 1978; Faist, Mewes et al. 1988; Ertel 1989; Yates 1990; Pories 1991). Zur Berechnung des IS-Scores werden 6 Körperregionen unterschieden. Jede Einzelverletzung wird je nach Schweregrad mit Punkten von 0 (harmlos) bis 5 (lebensbedrohlich) bewertet. Der Gesamtschweregrad (ISS) berechnet sich aus der Summe der Quadrate der 3 schwersten Einzelverletzungen. Maximal erreichbar sind somit 75 Punkte.

3.4 Dokumentation und Beurteilung des klinischen Verlaufs

Die klinischen Verlaufsdaten der Studienpatienten wurden bei jeder Blutentnahme mit Hilfe eines für diese Studie entwickelten Patientendokumentationsblattes erhoben.

Die Definition der Sepsis erfolgte mittels folgender Parameter (Bone, Balk et al. 1992):

- 1.) Temperatur > 38°C oder Hypothermie (< 36°C);
- 2.) Leukozytose mit > 12 G/l oder Leukopenie mit < 4 G/l oder > 10% unreife Zellen;
- 3.) Tachykardie mit einer Frequenz > 90 Schläge/Minute;
- 4.) Tachypnoe mit > 20 Atemzüge/Minute bei Spontanatmung oder PaCO₂ < 32 mmHg;

Mindestens zwei der aufgeführten Kriterien mussten als Resultat einer Infektion (Herdnachweis oder positive Blutkultur) für die Diagnose Sepsis erfüllt sein.

3.5 Demographische Daten

Das Durchschnittsalter der 10 Studienpatienten (2 Frauen und 8 Männer) betrug 39 (\pm 5 SF) Jahre, der mittlere ISS 47 (\pm 4 SF) Punkte. Drei Patienten erlitten septische Komplikationen und verstarben, ein weiterer Patient erlag 73 Tage nach dem Trauma einem Multiorganversagen. 15 zufällig ausgewählte gesunde Labor- und Klinikmitarbeiter mit einem Durchschnittsalter von 29 (\pm 1 SF) Jahren stellten das Kontrollkollektiv.

In Tab. 3 sind das Geschlecht (Sex), das Alter (Jahre), der Traumaschweregrad (ISS [Injury Severity Score] in Punkten), der Anteil der verbrannten Oberfläche an der gesamten Körperoberfläche (KOF in %), ein mögliches Inhalationstrauma, eine notwendige künstliche Beatmung und der klinische Verlauf (komplikationslos, MOV [Multiorganversagen], Sepsis), sowie ggf. der Todeszeitpunkt (Tag post Trauma) der Studienpatienten dargestellt.

Studienpatientin 4 hatte neben der 61%igen Verbrennung der Körperoberfläche multiple Frakturen.

Tab. 3 Die demographischen Daten der Studienpatienten im Überblick

Pat. Nr.	Sex m/w	Alter (Jahre)	ISS (Pkte.)	KOF (%)	Inhal. trauma	Mech. resp. Supp.	Klinischer Verlauf	Verstorben /Tag
1	m	55	50	60	ja	ja	MOV	Tag 73
2	m	36	50	45	ja	ja	komplikationslos	
3	m	44	25	39	nein	nein	komplikationslos	
4	w	75	34 [#]	61	nein	nein	MOV/Sepsis	Tag 11
5	m	24	75	96	ja	ja	MOV/Sepsis	Tag 04
6	m	32	32	30	ja	nein	komplikationslos	
7	w	49	50	40	ja	ja	MOV/Sepsis	Tag 51
8	m	35	50	50	ja	ja	komplikationslos	
9	m	30	50	58	ja	ja	komplikationslos	
10	m	25	50	59	ja	ja	komplikationslos	

Multiple Frakturen

3.6 Probenentnahme

Den Patienten wurde an den Tagen 1, 3, 5 und 7 post Trauma morgens bis 7:00h jeweils 40 ml heparinisiertes Blut (5000 I.E. pro 20 ml Blut; {Heparin-Natrium-25000-ratiopharm; Ulm}) aus zentralvenösen Zugängen, ersatzweise aus großvolumigen peripheren Kathetern steril entnommen. Der Einfluss der zirkadianen Rhythmik konnte mit dem standardisiert frühen Abnahmezeitpunkt minimiert werden. Um das selektive Absterben der CD4+ Zellen zu verhindern wurden die heparinisierten Blutproben bei Raumtemperatur gelagert. Vom Zeitpunkt der Blutentnahme bis zur Aufbereitung vergingen in keinem Fall mehr als 60 Minuten.

3.7 Probenaufbereitung

3.7.1 Separation mononukleärer Leukozyten (PBMC)

Die Aufbereitung der antikoagulierten Blutproben erfolgte über einen Ficollgradienten. Verwendet wurde Ficoll-Hypaque, ein Flotationsmittel mit einer Dichte von 1.077, die so gewählt ist, dass sich mononukleäre Zellen an der Grenzschicht Ficoll/überstehendes Plasma anreichern, Zellen höherer Dichte - Erythrozyten, Granulozyten - hingegen absinken (Boyum 1968). Zum besseren Verständnis illustriert Abb. 3 das Prinzip.

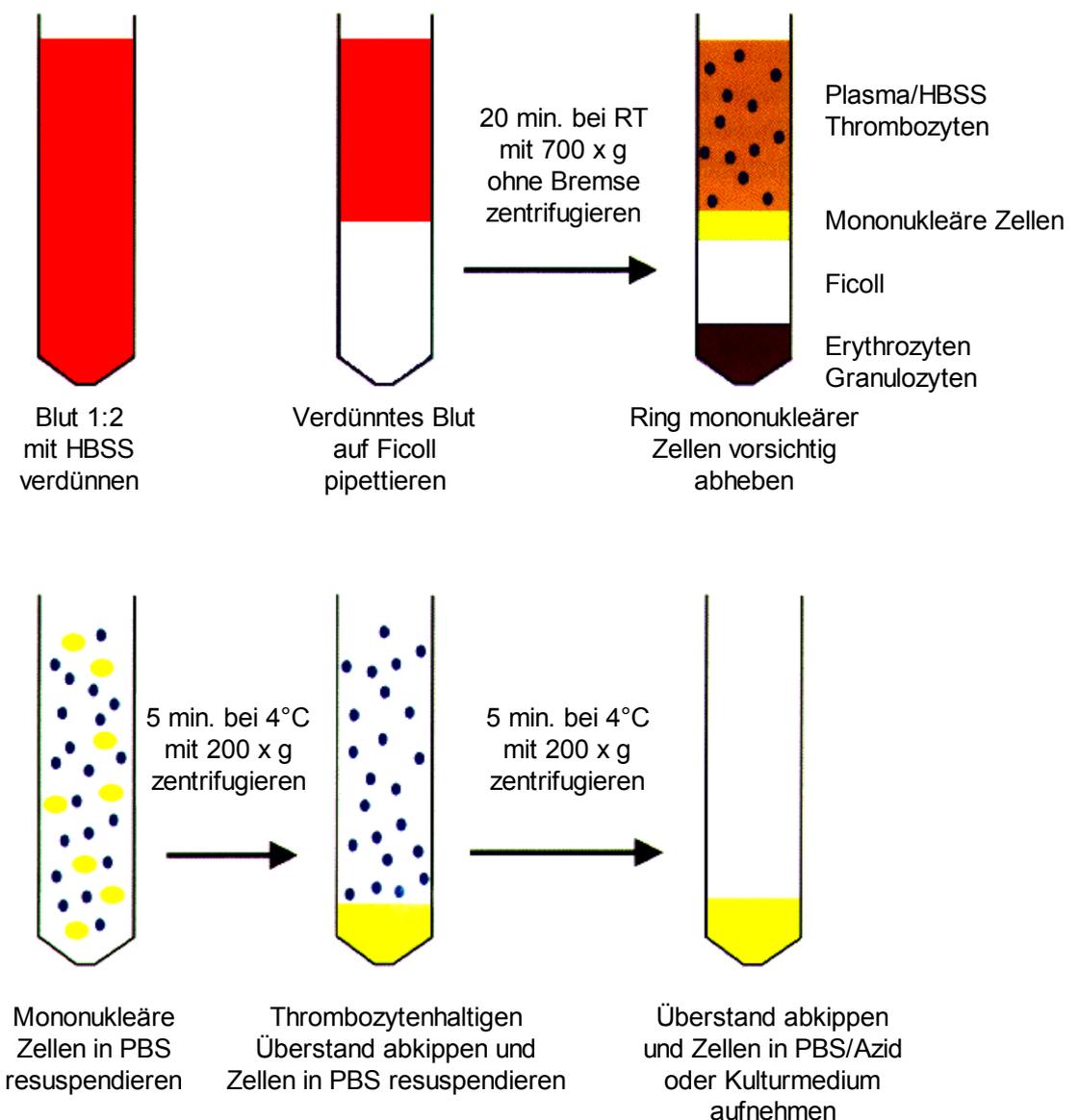


Abb. 3 Schematische Darstellung der Dichtegradienten-Zentrifugation zur Gewinnung mononukleärer Zellen (PBMC).

Das zu gleichen Teilen mit HBSS verdünnte Blut wurde in einem 50 ml Polypropylenröhrchen (Fa. Greiner, Frickenhausen) über die vorgelegte Trennlösung geschichtet und mit 700 x g für 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die im Interphasering angereicherten mononukleären Zellen wurden vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und zweimal mit 200 x g für jeweils 5 Minuten in eiskaltem PBS gewaschen.

Nun erfolgte die osmotische Hämolyse der verbliebenen Erythrozyten mit Ammoniumchlorid-Lysepuffer für 2 Minuten, da sich erythrozytenhaltige Proben nicht für durchflusszytometrische Messungen eignen. Aufgrund ihrer Lichtstreuungseigenschaften erschweren Erythrozyten eine eindeutige Identifikation der Lymphozytenpopulation. Außerdem führen Verunreinigungen der mononukleären Zellen durch Erythrozyten, wie sie häufig bei schwer traumatisierten Patienten beobachtet werden, zu falsch niedrigen Werten für die einzelnen Lymphozytensubpopulationen.

Nach einem weiteren Waschschrift in kaltem PBS wurde das Zellpellet in RPMI 1640 Kulturmedium mit L-Glutamin und 25 mM HEPES unter Zusatz von 10 % FCS und 0.1 mg/ml Gentamycin bzw. in PBS-Azid (0.1 % NaN₃) resuspendiert.

Die Gesamtzellzählung erfolgte zwanzigfach verdünnt mit 3%iger Essigsäure in einer Neubauerzählkammer, Tiefe 0.1 mm, 0.0025 mm² (Fa. Brand). Eine abschließend durchgeführte Vitalitätsprüfung mit 0.4%iger Trypanblaulösung ergab regelmäßig >95% lebende Zellen.

3.7.2 Lymphozyten-Aktivierung

Die peripheren Blutzellen (PBMC) wurden auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und jeweils 1 ml dieser Suspension steril in die Vertiefungen der Kulturplatten (24-well Gewebekulturplatten; Fa. Greiner, Frickenhausen) pipettiert. Die Aktivierung der Zellen erfolgte polyklonal mit 1 μ M Ionomycin und 5 ng/ml PMA bei 37°C und 8 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre über verschiedene Zeiträume (Abb. 4). Der fünfständigen Kultur zum intrazellulären Nachweis von IL-2, IL-4 und IFN- γ wurde von Beginn an 3 μ M Monensin zur Inhibition der Proteinsekretion zugesetzt. Das erst spät detektierbare IL-10 erforderte 12 bzw. 24 stündige Ansätze mit Monensinzugabe während der jeweils letzten 5 Stunden der Gesamtkulturdauer (Tab. 4).

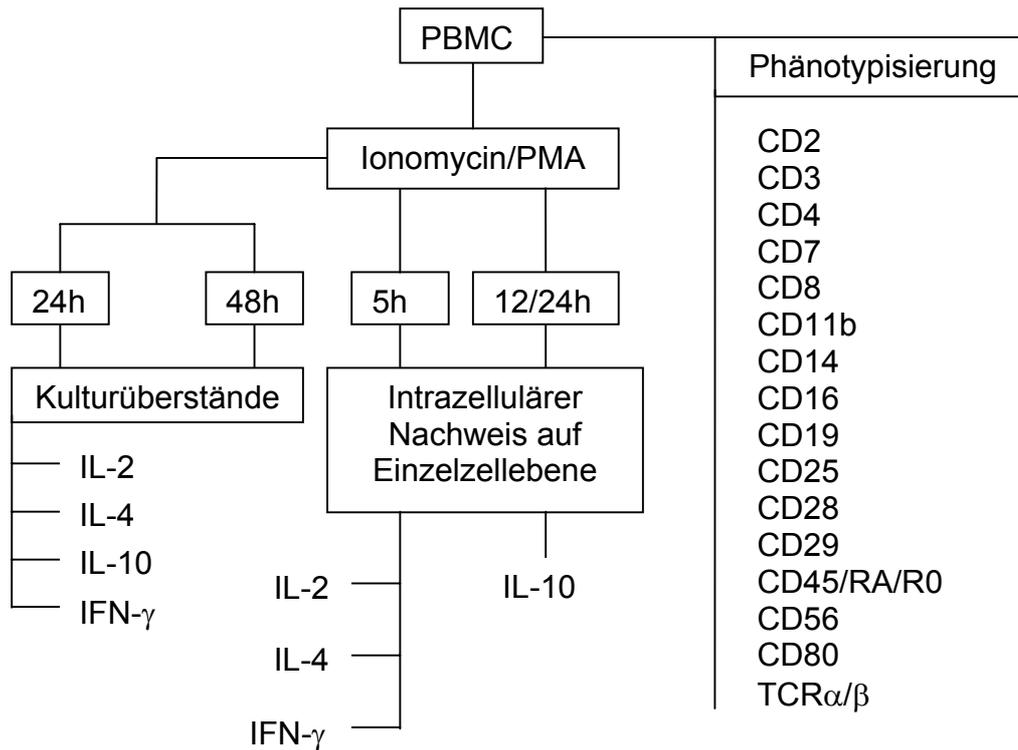


Abb. 4 Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls mit unstimulierten PBMC-Ansätzen zur durchflusszytometrischen Phänotypisierung und stimulierten PBMC-Ansätzen zur Mediatorenmessung in den Kulturüberständen und intrazellulär auf Einzelzellebene.

Tab. 4 Verwendung von Monensin in den unterschiedlichen Zellkulturansätzen mit (ja), ohne Monensin (nein), nicht bestimmt (n. b.).

Protein Stim.- dauer	IFN-γ	IL-2	IL-4	IL-10
5 h	ja	ja	ja	n. b.
12 h	n. b.	n. b.	n. b.	ja (5 h)
24 h	n. b.	nein	nein	ja (5 h)
48 h	nein	n. b.	n. b.	nein

3.8 Multiparameter-Durchflusszytometrie

3.8.1 Übersicht

Für die durchflusszytometrischen Analysen stand ein FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, Ca, USA) mit einem luftgekühlten 15 Milliwatt Argon-Ionenlaser zur Verfügung. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 488 nm.

Die Probe wird während der Messung kontinuierlich der Durchflusszelle zugeführt. In dieser Durchflusszelle werden die Zellen mit Hilfe der Mantelflüssigkeit hydrodynamisch fokussiert, d.h. genau im Zentrum der Flusszelle ausgerichtet und durchwandern einzeln den Laserstrahl. Tritt eine mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbte Zelle in den Laserstrahl ein, so werden die gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und strahlen Licht einer bestimmten Wellenlänge ab. Dieses emittierte Licht wird von einer Sammeloptik aufgefangen und den drei Hochleistungsfotoverstärkerröhren (Photomultiplier Tubes, PMTs) mit Bandpassfiltern 530 nm (FITC), 585 nm (PE) und > 650 nm (PE-CY5) zugeführt. Hier werden die Lichtimpulse aufgefangen, optoelektronisch verstärkt und an die Datenverarbeitung weitergeleitet (Abb. 5). Zusätzlich wird das von den Zellen gestreute Laserlicht analysiert. Das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht (Vorwärtsstreulicht, Forward Scatter, FSC) ist ein Parameter, der Aussagen über die Zellgröße zulässt. Das Laserlicht, das die Zelle im 90° - Winkel streut (Seitwärtsstreulicht, Side Scatter, SSC), gibt Informationen über ihre innere Struktur. Je stärker eine Zelle granularisiert ist, desto größer ist der Side Scatter-Impuls dieser Zelle. Sowohl die Streulichtimpulse, als auch die Fluoreszenzsignale können wahlweise linear oder logarithmisch verstärkt werden, wobei der Messbereich, nicht jedoch die Kanalauflösung beeinflusst wird. Zur quantitativen Auswertung der gespeicherten Originaldaten (list-mode) ist eine elektronische „Wiederholung der Messung“ ohne Zellen mit veränderter Datenausgabe über eindimensionale Histogramme oder bivariate Streudiagramme (dot plots) mit linearer oder mit 4-Dekaden-Log Skalierung möglich.

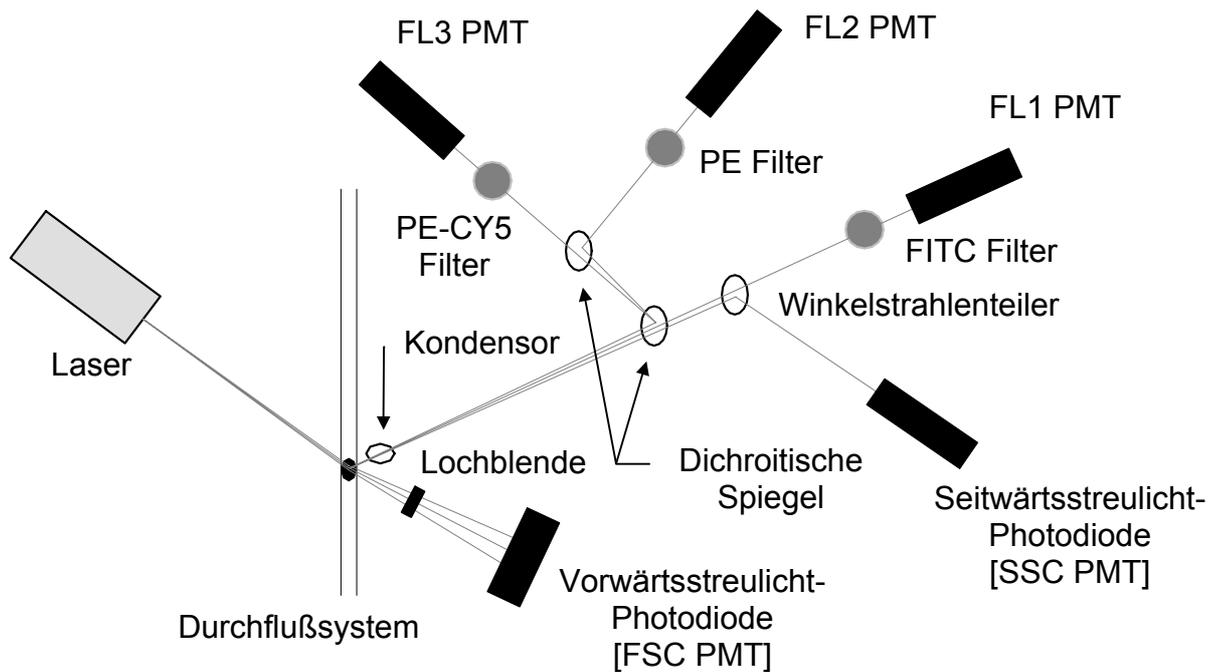


Abb. 5 Optisches System des FACScan

3.8.2 Elektronische Kompensation der spektralen Überlappung

Die bei Mehrfachfärbungen verwendeten Fluorochrome FITC, PE, sowie PE-Cy5 emittieren bei unterschiedlichen Wellenlängen, zeigen aber Überlappungen in den Spektren, wie in Abb. 6 dargestellt. So kann in einem jeweils kleinen Messbereich nicht eindeutig beurteilt werden, ob die Zellen grünes oder oranges bzw. oranges oder rotes Licht emittieren. Die am Durchflusszytometer einstellbare Farbkompensation ermöglicht den elektronischen Analyseausschluss derjenigen Zellen, die in den genannten Überschneidungsbereichen registriert werden. Eine nicht korrekt eingestellte Kompensation resultiert in falsch positiven oder artifiziellen Ereignissen. Optimale Kompensationswerte konnten durch die Analyse von mononukleären Zellen einer Normalperson erreicht werden, die unabhängig voneinander mit den drei verschiedenen Fluorochromen gefärbt wurden. Bei korrekter Einstellung der Kompensation fanden sich keine positiven Zellen in den Doppelfärbungs-Quadranten der jeweiligen Zweiparameterdarstellungen.

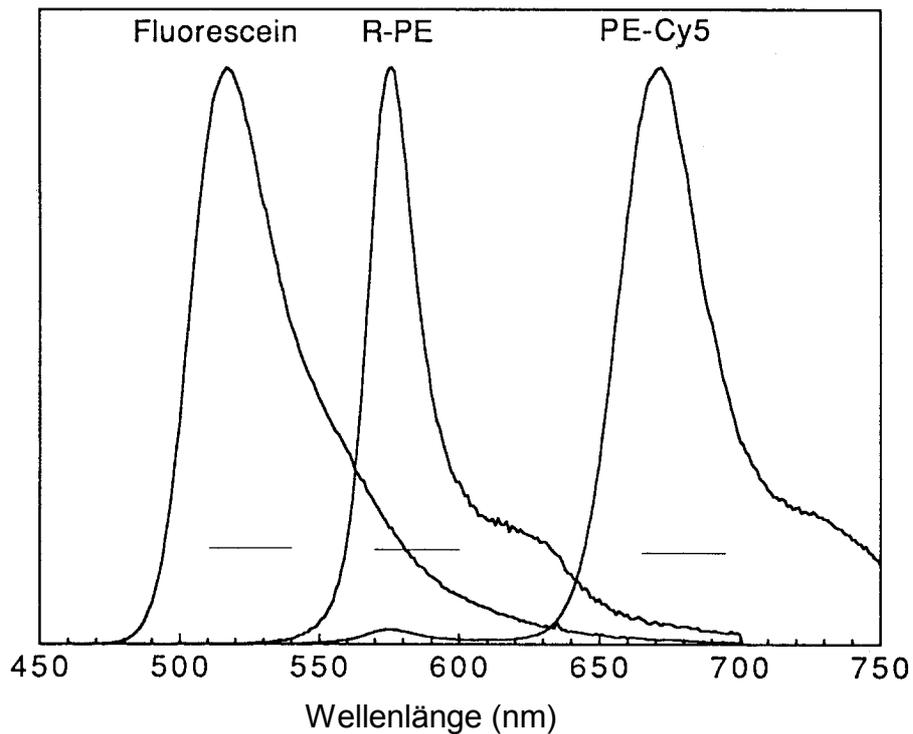


Abb. 6 Fluoreszenzspektren von FITC, R-PE und PE-CY5. Die Balken repräsentieren die Bandbreite der 30 nm Interferenzfilter bei halbmaximaler Transmission, wie sie typischerweise in Durchflusszytometern den jeweiligen Photoverstärkerröhren vorgeschaltet sind (vgl. Abb. 5).

3.8.3 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Die folgende Tabelle vermittelt eine Übersicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, die im folgenden kurz beschrieben und als Strukturformeln dargestellt werden.

Tab. 5 Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome

Fluorochrom	Exzitations- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]	Laseranregung [nm, Argon]
FITC	495	520	488
PE	495, 564	576	488
PE-Cy5	495, 565, 650	670	488
TRITC	520, 554	582	---

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ist ein traditionell gebräuchliches Fluorochrom mit einem Molekulargewicht von 389 Da (Abb. 7) und einem Absorptionsmaximum bei 495 nm. Die Anregung mit 488 nm führt zu einer Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 520 nm (grün) (Abb. 6).

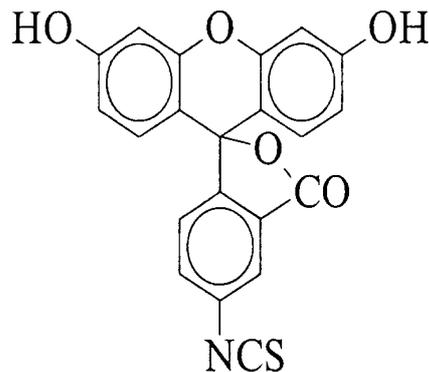


Abb. 7 Strukturformel des Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

R-Phycoerythrin (R-PE) ist ein akzessorisches Photosynthesepigment der Rotalgen. Das 240 kDa Phycobiliprotein mit der großen Zahl von 34 Phycoerythrobilinchromophore (Abb. 8) pro Molekül ist prädestiniert für durchflusszytometrische Applikationen. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 564 nm. Die Exzitation mit 488 nm ergibt ein Fluoreszenzmissionsmaximum bei ungefähr 576 nm (orange-rot) (Abb. 6).

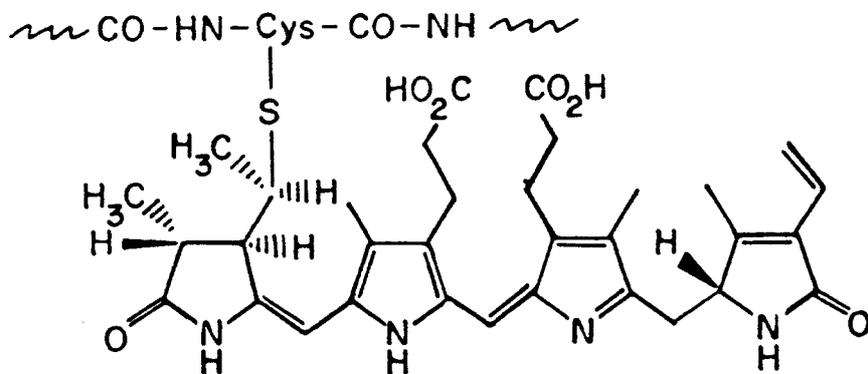


Abb. 8 Strukturformel des Phycobilins als prosthetischer Gruppe des Phycoerythrins

PE-Cy5 ist ein Tandemkonjugat aus R-Phycoerythrin und Cyan 5 (MW 1.5 kDa) mit einem Absorptionsmaximum bei ungefähr 650 nm. Nach Anregung des R-PE mit 488 nm wird Energie auf das Cyan 5 Molekül transferiert (Abb. 9), das dann mit einer längeren Wellenlänge fluoresziert und bei ungefähr 670 nm (rot) sein Emissionsmaximum hat (Abb. 6).

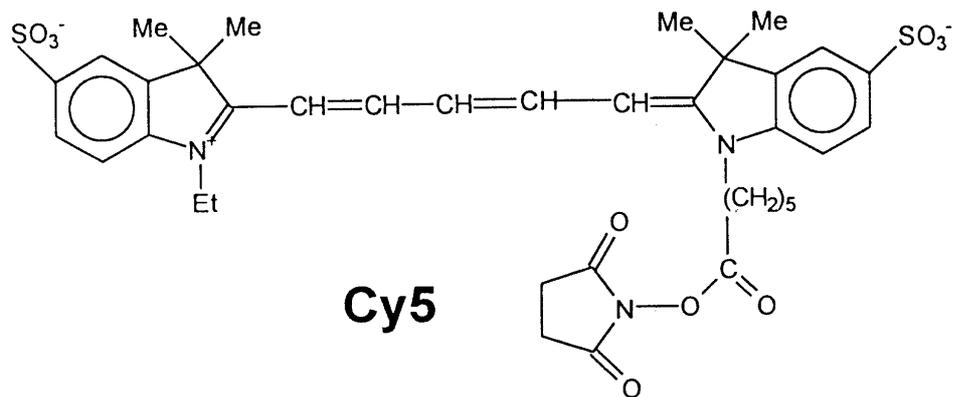


Abb. 9 Strukturformel des Cyan 5 Moleküls (Cy5)

3.8.4 Monoklonale Antikörper zur Immuntypisierung

Es folgen tabellarische Auflistungen der verwendeten Antikörper mit zugehöriger CD - (cluster of differentiation) Zuordnung, Klonbezeichnung, IgG-Klassifikation, Fluorochromkonjugation, Spezies und Hersteller- bzw. Vertriebsnachweis (Tab. 6), sowie der verwendeten Antikörperkombinationen in der Mehrfarbenanalyse (Tab. 7). Zur Veranschaulichung sind in Abb. 10 sind die durchflusszytometrisch nachgewiesenen Oberflächenantigene auf NK-Zellen, Monozyten, B- und T-Lymphozyten schematisch dargestellt.

Tab. 6 Auflistung der verwendeten monoklonalen Antikörper (mAk). (Be-Co, Beckman-Coulter, Krefeld; Phar, Pharmingen, Hamburg; Ca-Se, Camon-Serotec, Wiesbaden; Hölzel, Hölzel Diagnostika, Köln;)

Spezifität.	Klon	Isotyp	Konjugat	Spezies	Vertrieb
Einfarbenreagenzien gegen Oberflächenantigene					
CD 2	MT 910	IgG1 κ	FITC	Maus	Dako
CD 3	UCHT 1	IgG1	PE-CY5	Maus	Be-Co
CD 4	MT 310	IgG1 κ	FITC	Maus	Dako
CD 4	MT 310	IgG1 κ	PE	Maus	Dako
CD 4	MT 310	IgG1 κ	PE-CY5	Maus	Dako
CD 4	RPA-T4	IgG1 κ	PE-CY5	Maus	Phar
CD 7	DK 24	IgG2b	FITC	Maus	Dako
CD 8	SK 1	IgG1 κ	FITC	Maus	Be-Di
CD 8	RPA-T8	IgG1 κ	PE-CY5	Maus	Phar
CD 11b	Bear 1	IgG1	FITC	Maus	Be-Co
CD 16	DJ 130c	IgG1 κ	PE	Maus	Dako
CD 19	J 4.119	IgG1	FITC	Maus	Be-Co
CD 28	L 293	IgG1 κ	PE	Maus	Be-Di
CD 29	B-D 15	IgG1 κ	PE	Maus	Ca-Se
CD 45 RA	HI 100	IgG2b	PE	Maus	Phar
CD 45 RA	ALB 11	IgG1	FITC	Maus	Be-Co
CD 45 R0	UCHL 1	IgG2a	PE	Maus	Be-Co
CD 45 R0	UCHL 1	IgG2a κ	FITC	Maus	Dako
CD 56	B 159.5	IgG1 κ	biotin.	Maus	Phar
CD 80	MAB 104	IgG1	unkonj.	Maus	Be-Co
TCR α/β	BMA 031	IgG2b	PE	Maus	Be-Co

Spezifität.	Klon	Isotyp	Konjugat	Spezies	Vertrieb
Zweifarbigenreagenzien gegen Oberflächenantigene					
CD 45/14	Immu 19.2/RMO 52	IgG1/IgG2a	FITC/PE	Maus	Be-Co
CD 3/19	UCHT 1/J 4.119	IgG1/IgG1	FITC/PE	Maus	Be-Co
CD 3/25	UCHT 1/B 1.49.9	IgG1/IgG2a	FITC/PE	Maus	Be-Co
Anti-Zytokinreagenzien					
IFN- γ	45.15	IgG1	FITC	Maus	Hölzel
IL-2	N7.48A	IgG2a	biotin.	Maus	Hölzel
IL-4	8 F 12	IgG1	biotin.	Maus	Hölzel
IL-10	JES3-19F1	IgG2a	biotin.	Ratte	Hölzel
IL-10	B-N10	IgG2b	biotin.	Maus	Hölzel

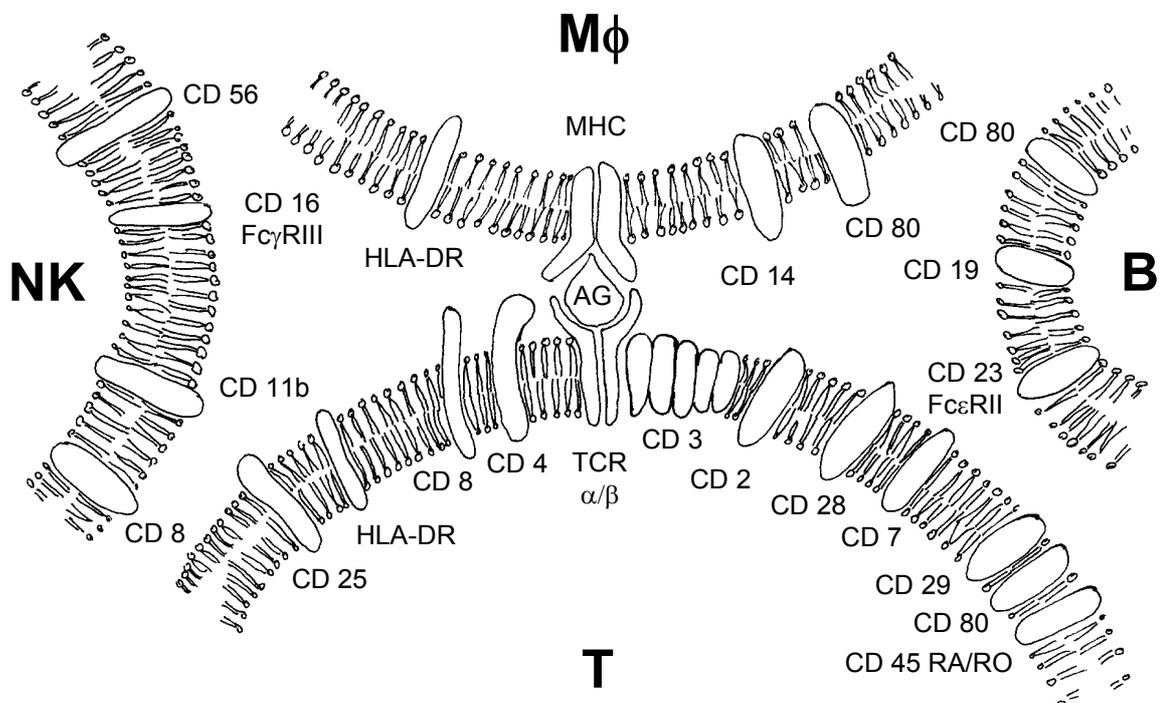


Abb. 10 Schematische Darstellung der durchflusszytometrisch nachgewiesenen Oberflächenantigene auf Monozyten (M ϕ), B-Lymphozyten (B), natürlichen Killerzellen (NK) und T-Lymphozyten (T).

Tab. 7 Verwendete Antikörperkombinationen in der Mehrfarbenanalyse

Probe	FL1 [FITC]	FL2 [PE]	FL3 [PE-CY5]
1 Negativkontrolle	IgG1	IgG1	IgG1
2 Negativkontrolle	IgG1	IgG2a	IgG1
3 Negativkontrolle	IgG2a	IgG2a	IgG1
4	anti-CD45	anti-CD14	--
5	anti-CD3	anti-CD19	--
6	anti-CD3	anti-CD25	--
7	anti-CD4	anti-CD28	anti-CD8
8	anti-CD11b	anti-CD28	anti-CD8
9	anti-CD4	anti-CD16	anti-CD8
10	anti-CD11b	anti-CD16	anti-CD8
11	anti-CD45RA	anti-CD29	anti-CD4
12	anti-CD45RA	anti-CD45RO	anti-CD4
13	anti-CD45RA	anti-CD45RO	anti-CD8
14	anti-CD2	anti-TCR α/β	anti-CD3
15	anti-CD7	anti-CD56	anti-CD3
16	anti-CD4	anti-CD80	anti-CD8
17	anti-CD19	anti-CD28	anti-CD80
18	anti-CD4	anti-IL 4	anti-CD8
19	anti-CD4	anti-IL 2	anti-CD8
20	anti-CD45RO	anti-IL 2	anti-CD4
21	anti-CD45RA	anti-IL 2	anti-CD4
22	anti-CD45RO	anti-IL 2	anti-CD8
23	anti-CD45RA	anti-IL 2	anti-CD8
24	anti-IFN- γ	anti-CD45RO	anti-CD4
25	anti-IFN- γ	anti-CD45RA	anti-CD4
26	anti-IFN- γ	anti-CD45RO	anti-CD8
27	anti-IFN- γ	anti-CD45RA	anti-CD8
28	anti-IFN- γ	anti-IL 2	anti-CD4
29	anti-IFN- γ	anti-IL 2	anti-CD8

3.8.4.1 Biotinylierung des monoklonalen Antikörpers B7/BB1 (CD80)

Die Biotinylierung von Antikörpern geschieht ohne Schädigung der antigenen Bindungseigenschaften (Guesdon 1979). Allerdings wird die Streptavidin-Bindungsfähigkeit des Biotins nach Koppelung an ein Makromolekül stark eingeschränkt (sterische Behinderung). Dieser Effekt kann durch ein chemisches Verbindungsglied (Abstandshalter [„spacer“-] arm = D-Biotinoyl- ϵ -aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester) zwischen Makromolekül und Biotin vermieden werden, so dass Biotin und Streptavidin ungehindert reagieren können (Bonnard 1984).

Protokoll der Biotinylierung

- 0,2 mg CD80 (B7-1/BB1) mAK-Lyophilisat in 500 μ l aq. iniekt. lösen;
- 10 mg D-Biotinoyl- ϵ -aminocapronsäure-N-hydroxy-succinimidester in 2ml Dimethylformamid lösen (Glasgefäß!);
- 450 μ l mAk-Lösung (0,4 mg/ml) mit 25 μ l der Biotinlösung (5 mg/ml) und 24 Std. abgedunkelt bei RT mit 200 U/min. auf einem Schüttler inkubieren;
- 1. Zentrifugation mit Centricon 30 für 45 min. mit 5500 U/min. bei 4°C mit festem Rotor; \rightarrow 0,5 ml PBS + 0,475 ml CD80 mAk/Biotin-Ansatz;
- 2. Zentrifugation bei 5500 U/min. für 30 min., 4°C mit 1 ml PBS;
- 3. Zentrifugation bei 5500 U/min. für 30 min., 4°C mit 1 ml PBS;
- 4. Zentrifugation bei 1000 U/min. für 5 min. nach Zugabe von 500 μ l PBS mit 0,1% NaN₃;
 \rightarrow System umdrehen \Rightarrow Auffanggefäß \Rightarrow biotinylierter CD80 mAk;
- 5. Zentrifugation bei 1000 U/min. für 5 min. nach Zugabe von 400 μ l PBS mit 0,1% NaN₃;
- Die Gesamtmenge von 900 μ l in 200 μ l Aliquots (\sim 0,2 mg/ml) bei -20°C lagern;

3.8.5 Konzentration der Färbereagenzien

Einige der kommerziellen Reagenzien wurden zur Optimierung nachtitriert, da sich die vom Hersteller angegebene Konzentration häufig als zu hoch erwies (vgl. Abb. 14). Zu niedrige Konzentrationen führen zu schlechter Diskriminanz zwischen positiven und negativen Zellpopulationen bis hin zu Überlappungen, die eine statistische Analyse unmöglich machen können. Auf der anderen Seite führen zu hohe Konzentrationen zu unspezifischer Färbung negativer Zellen durch niedrigaffine Kreuzreaktionen.

3.8.6 Färbeprinzipien

3.8.6.1 Direkte Immunfluoreszenz

Bei dieser Technik reagiert ein ein fluorochromkonjugierter Primärantikörper mit dem zellulären Antigen. Es erfolgt nur ein einziger Antikörper-Inkubationsschritt, so dass die Methode rasch durchführbar ist und kaum unspezifische Reaktionen auftreten. Da an dieser Färbung jedoch nur ein markierter Antikörper beteiligt ist, kommt es zu keiner Signalverstärkung (Abb. 11).

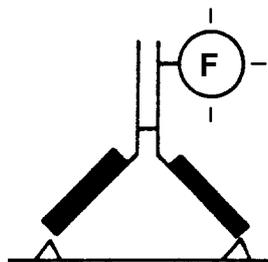


Abb. 11 Direkte Immunfluoreszenz-Technik

3.8.6.2 Streptavidin-Biotin-Methode

Diese Technik nützt die starke Affinität (Dissoziationskonstante 10^{-15} M^{-1}) von Streptavidin für Biotin (= Vitamin H, MG 244). Streptavidin ist ein Protein des Bakteriums *Streptomyces avidinii* (MG 60000) mit vier Bindungsstellen pro Molekül für Biotin. Jedoch binden aufgrund der molekularen Konfiguration in der Regel

weniger als vier Biotinmoleküle. Das Verfahren benötigt einen biotinylierten Primärantikörper, der das zelluläre Antigen spezifisch erkennt. Freie Bindungsstellen am fluorchromgekoppelten Streptavidin binden in einem zweiten Inkubationsschritt an das Biotin des Primärantikörpers (Abb. 12). Die überaus starke Affinität von Streptavidin gegenüber Biotin führt zu stabilen Verbindungen und verschafft dieser Technik eine konstante und deutlich höhere Sensitivität im Vergleich zur direkten Färbemethode.

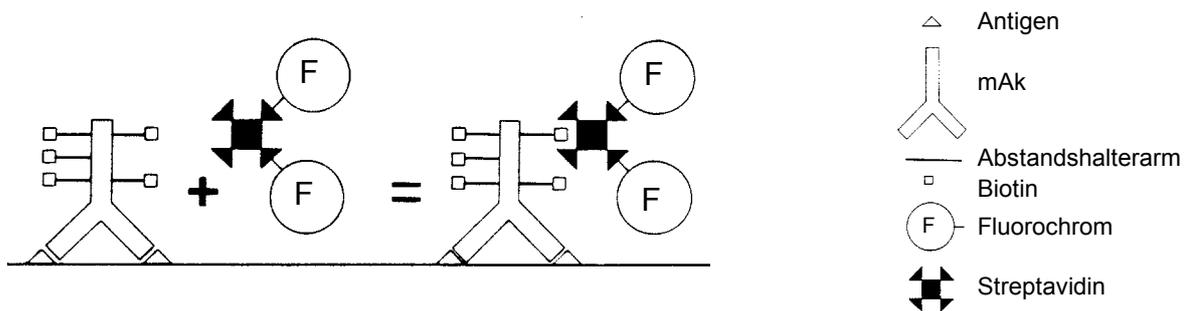


Abb. 12 Biotin-Streptavidin-Färbemethode

3.8.7 Nachweis von Oberflächenantigenen

Zur Bestimmung der Oberflächenantigene (Phänotypisierung) wurden die PBMC zu 1×10^5 Zellen/50 μ l in PBS mit 0,1% NaN_3 in 5ml Polystyrolrundbodenröhrchen (Falcon, Heidelberg) resuspendiert. In diesen 50 μ l Aliquots erfolgte anschließend die simultane Doppel- bzw. Dreifachfärbung mit ausreichenden Mengen der entsprechenden fluorchromierten mAk gemäß den Färbeprotokollen in Tab. 7 für 15 Minuten im Dunkeln auf Eis. Eventuell verbliebene und makroskopisch erkennbare kontaminierende Erythrozyten (häufig in Patientenproben) ließen sich im Anschluss an die Färbung mit einer zweiminütigen Ammoniumchloridbehandlung (2ml/Ansatz) endgültig lysieren. Nach der Hämolyse wurden die Zellen bei 4°C und 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert, zweimal in PBS mit 0,1% NaN_3 gewaschen und lichtgeschützt bei 4°C bis zur Analyse am selben Tag aufbewahrt.

3.8.8 Zytoplasmatischer Zytokin-Nachweis

Nach fünfstündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 8 % CO₂ wurden die aktivierten und die nicht-aktivierten PBMC in 5ml Polystyrolrundbodenröhrchen geerntet, zweimal in eiskaltem HBSS mit 10mM HEPES gewaschen und zu ungefähr 2x10⁶ Zellen/ml in einem totalen Volumen von 50µl/Röhrchen resuspendiert. Es folgte die Fixierung in eiskaltem HBSS/HEPES mit 4% Paraformaldehyd für 10 Minuten auf Eis um die zelluläre Integrität zu erhalten. Gelegentliches kräftiges Schütteln der Proben konnte ein Verklumpen der Zellen während der Fixierung vermeiden. Nach zwei Waschschritten in HBSS/HEPES wurden die Proben in jeweils 2 ml HBSS/HEPES mit 0,1% Saponin permeabilisiert. Da dieser Prozess reversibel ist, war es erforderlich die folgenden Antikörperinkubationen und Waschschrritte in Gegenwart von Saponin durchzuführen. Nach 5 Minuten Permeabilisierung wurden die Zellen abzentrifugiert und mit zytokinspezifischen, in Saponinpuffer verdünnten, fluorochromierten bzw. biotinylierten Antikörpern (2µg/ml) für 20 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung der Oberflächenproteine erfolgte simultan mit prätitrierten Mengen fluorochromierter Antikörper. Anschließend wurden die Zellen in Saponinpuffer gewaschen und im Falle biotinylierter mAk mit in Saponinpuffer verdünntem (1:200), fluorochromiertem Streptavidin (Dako, Hamburg) lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 20 Minuten gefärbt. Es folgten zwei Waschschrritte, zunächst in Saponinpuffer, dann final in HBSS/HEPES bevor die Proben bei 4°C bis zur Analyse aufbewahrt wurden. Um ein Verblässen des FITC-Fluoreszenzsignales zu vermeiden erfolgten Färbung und Analyse der Zellen stets am selben Tag (Abb. 13).

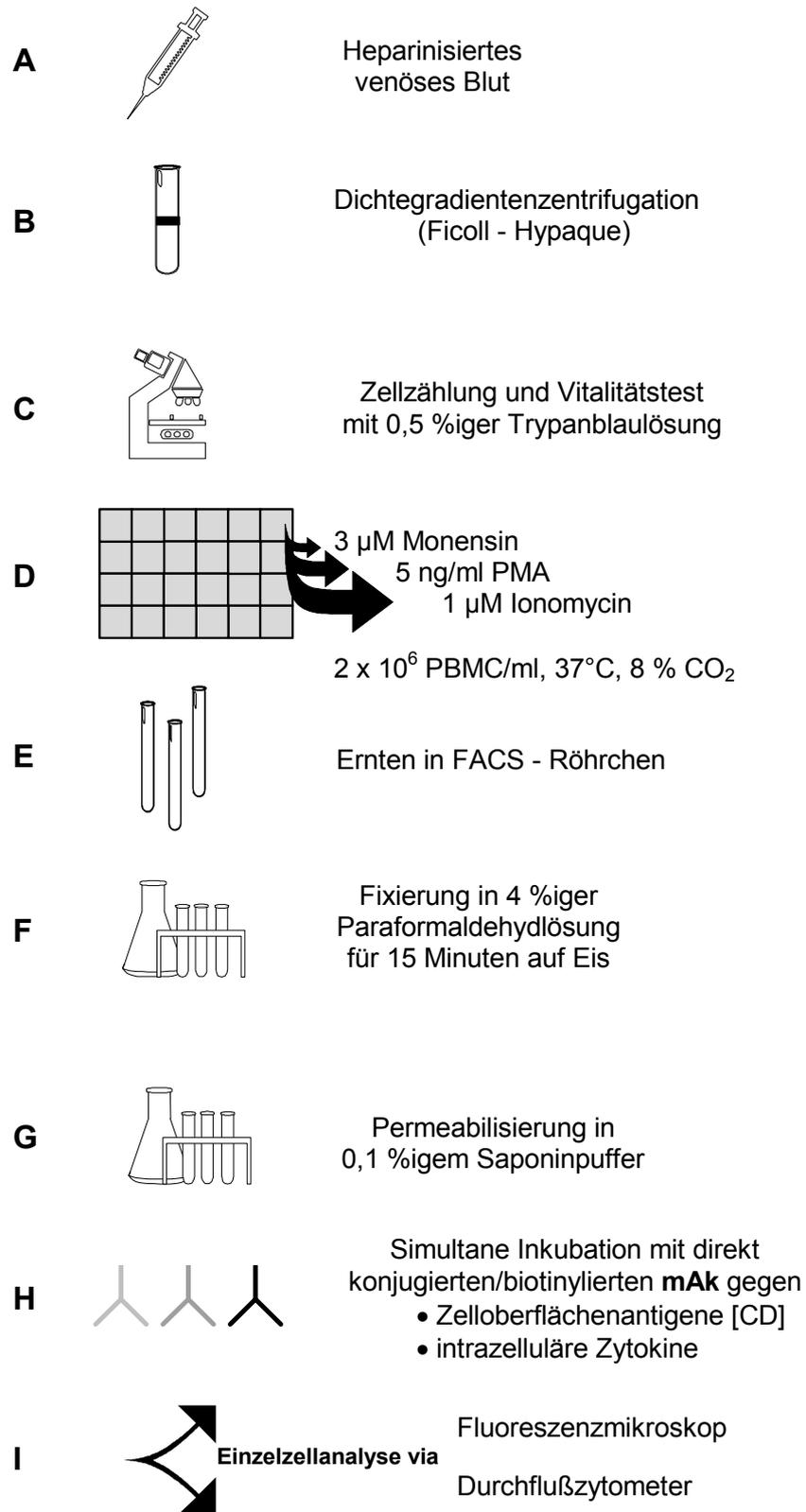


Abb. 13 Schema des immunzytochemischen Nachweises von Oberflächenantigenen und zytoplasmatischen Strukturen auf Einzelzellebene.

3.8.9 Datenaquisition und Datenanalyse

Pro Messung wurden zwischen 5000 und 10000 Zellen analysiert und die Rohdaten bestehend aus den linear verstärkten Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtsignalen, sowie drei logarithmisch verstärkten Fluoreszenzsignalen im Listendateiformat (List-Mode) gespeichert. Mit dieser Art der Datenaufzeichnung ist der gesamte Messvorgang Zelle für Zelle dokumentiert, was eine wiederholte Datenauswertung nach unterschiedlichsten Kriterien auch noch nach Jahren erlaubt.

Die Datenauswertung erfolgte mit der FLOWMATE Software (Dako, Hamburg). Jeder Bestimmung von Oberflächenantigenen ging eine Messung mit anti-CD45 FITC und anti-CD14 PE voraus. Sie diente der Ermittlung eines bestmöglichen Lymphozytenfensters (Lymphozyten-Gate) über eine physikalisch/immunologische Dreizelldifferenzierung. In Verbindung mit den Lichtstreuungsparametern konnten die drei Leukozytenuntergruppen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten eindeutig differenziert und deren Anteile berechnet werden.

3.8.10 Kontrollen

Folgende Kontrollen wurden zur Diskriminierung von spezifischer und artifizieller Färbung durchgeführt:

Nachweis von Oberflächenantigenen

- *Leerwertkontrolle*: Zellen ohne spezifische Behandlungen zum Nachweis einer möglichen Eigenfluoreszenz;
- *Isotypkontrollen*: Inkubation der Zellen mit isotypischen Immunglobulinen der gleichen Tierspezies wie die spezifischen Antikörper zum Nachweis unspezifischer Bindungen über Fc-Rezeptoren;
- *Positivkontrolle*: Inkubation der Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen das nicht restringierte CD 45-Epitop („leucocyte common antigen“, LCA), das von allen humanen Leukozyten auf der Oberfläche exprimiert wird.

zusätzlich beim Nachweis zytoplasmatischer Proteine

- *Ligandenblockierung*: Blockierung der Bindung des konjugierten Antikörpers an intrazelluläre Zytokine durch Präinkubation des konjugierten Antikörpers mit einem molaren Überschuss rekombinantem Zytokinprotein;

3.8.11 Interne Qualitätssicherung

Aufgrund der zahlreichen Fehlerquellen durchflusszytometrischer Untersuchungen wurden zur internen Qualitätssicherung folgende Punkte strikt beachtet:

1. **Aufbereitung** der heparinisierten Blutproben innerhalb 1 Stunde;
2. **Probenaufbewahrung** bei Raumtemperatur;
3. **Messtätige Überprüfung** der photoelektrischen Komponenten des Geräts (Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften, Kompensation) über gefärbte und ungefärbte Mikro-Kügelchen (CALIBRITE, Becton-Dickinson): Die in regelmäßigen Abständen durchgeführte Qualitätskontrolle des FACScan mit Hilfe der Autocomp-Software und die Kalibrierung mit den CALIBRITE-Kügelchen resultierte bei der Selbstoptimierung in vergleichbaren Spannungswerten für die verschiedenen Fotoverstärkerröhren. Eine konstante Messqualität des Instruments war deshalb anzunehmen und rechtfertigte das tägliche Aufspielen einer fixen, für die intrazelluläre Zytokindetektion optimierten Geräteeinstellung.
4. **Überprüfung** jeder Phänotypisierung mittels Plausibilitätskontrollen:
% T-Zellen + % B-Zellen + % NK-Zellen = 100% \pm 5%
% T-Helferzellen + % T-Suppressor/Zytotoxische-Zellen = % T-Zellen \pm 10%
5. **Kontrolle** der Lichtstreuungsdiagramme bei allen Messungen;
6. **Kontrolle** des Lymphozytenfensters über Anti-CD45-/Anti-CD14-Messungen; Ein korrekt gesetztes Fenster musste folgende Grenzwerte einhalten:
Lymphozyten > 95% und Monozyten < 5%;
7. **Mitführen** von Kontrollen bei jeder Messung;

3.9 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Auswertung der Zytozentrifugenpräparate (1×10^5 PBMC/Präparat) erfolgte mit einem Axiophot Mikroskop der Firma Zeiss, Oberkochen, mit Epifluoreszenzeinrichtung. Bei FITC-Anregung fand der Exzitationsfilter BP 450-490 und der Emmissionssperrfilter LP 520 Anwendung, bei TRITC-Anregung der Anregungsfilter BP 546/12 mit dem Sperrfilter LP 590. Zur Unterdrückung der Nebendurchlässigkeit im roten Spektralbereich befand sich der Rotdämpfungsfilter BG 38 im Strahlengang.

3.10 Protein-Bestimmung

Zur quantitativen Bestimmung von IL-2, IL-4, IL-10 und IFN- γ in den zellfreien Kulturüberständen nativer und aktivierter PBMC wurden kommerziell erhältliche enzymvermittelte Immunassays (ELISA) der Fa. Biosource International, Camarillo, CA, USA, verwendet. Die Nachweisgrenzen lagen für IL-2 bei 7,8 pg/ml, für IL-4 bei 2 pg/ml, für IL-10 bei 5 pg/ml und für IFN- γ bei 3 pg/ml. Alle Messdaten sind aufgrund einer dreiteiligen Differentialanalyse für 100% Lymphozyten korrigiert (Simulset Software, BDIS), indem der prozentuale Anteil an Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten in den Leukozytenpopulationen über ihre Fluoreszenzparameter (CD45/CD14) berücksichtigt wurde.

3.11 Statistische Auswertung

Die Streuung der Mittelwerte (MW) ist prinzipiell als Standardfehler (SF) angegeben. Unterschiede zwischen den Stichproben (Patienten an konsekutiven Tagen versus Kontrollen) wurden mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA) für parametrische Daten oder im Falle nicht parametrischer Daten mit der Kruskal-Wallis ANOVA für Ränge erfasst. Die minimal geforderte Signifikanz für die anschließend paarweise durchgeführten post-hoc Mehrfachvergleiche nach Bonferroni bzw. Dunn war für $p < 0.05$ (*) definiert. Präsentiert werden die Ergebnisse als Prozent positive Zellen und teilweise als mittlere

Fluoreszenzintensität (MFI) zur indirekten Abschätzung des Expressionsgrades. Die grafischen Darstellungen erfolgen z.T. über sogenannte Boxplots, die den Median (durchgezogene Linie in der Box), den Mittelwert (unterbrochene Linie in der Box), die Quartile und die Extremwerte anzeigen. Die Box stellt den Interquartilbereich mit 50% der Werte dar, die von der Box ausgehenden Linien führen bis zur 5.-95. Perzentile. Die maximalen Werte werden ober- und unterhalb der Linie jeweils als Einzelpunkte ausgegeben, die lineare Regressionsanalyse indiziert den Verlauf.

4 ERGEBNISSE

4.1 Initiale Antikörper-Titration

Abb. 14 zeigt repräsentativ das Resultat eines initialen Titrationsexperiments zur Optimierung der Färbung peripherer Blutlymphozyten mit Erythrozytenlyse für den monoklonalen FITC-konjugierten Maus anti-human CD4 Antikörper MT310. Für $1 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$ PBMC ergab sich eine Antikörpersättigung mit 320 ng/ml Protein, was im vorliegenden Beispiel einer Inkubation mit $4 \mu\text{l}$ Antikörperlösung entsprach.

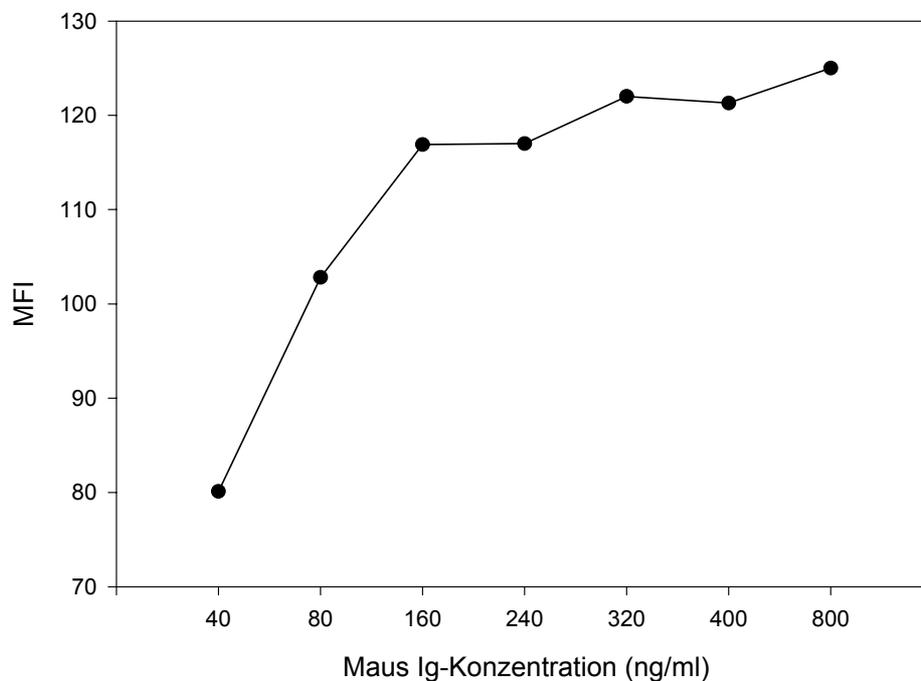


Abb. 14 Sättigungskurve für den FITC-konjugierten Maus anti-human CD4 mAk, Klon MT310.

4.2 Komposition der PBMC-Fractionen

Nach schwerer Verbrennungsverletzung kam es zu einer signifikanten Abnahme des relativen Lymphozytenanteils innerhalb der PBMC-Fractionen von durchschnittlich $64,80 \pm 3,52\%$ am Tag 1 auf $44,33 \pm 6,03\%$ am Tag 7 gegenüber $85,60 \pm 0,79\%$ bei den Gesundkontrollen (Abb. 15).

Der relative Anteil der Monozyten zeigte eine leicht steigende Tendenz mit dem höchsten Wert von $29,10 \pm 3,71\%$ am Tag 1 und Werten von $18,90\%$, $27,44\%$ und $21,78\%$ an den weiteren Untersuchungstagen. Bei den Gesundkontrollen konnten durchschnittlich $13,95 \pm 0,76\%$ bestimmt werden (Abb. 16).

In den PBMC-Fractionen gesunder Kontrollen waren Granulozyten mit anteiligen $0,45 \pm 0,15\%$ praktisch nicht nachweisbar. Bei den Patienten konnte ein kontinuierlicher und signifikanter Zuwachs von $6,30 \pm 1,48\%$ am Tag 1 bis auf $33,89 \pm 8,32\%$ am Tag 7 beobachtet werden (Abb. 17).

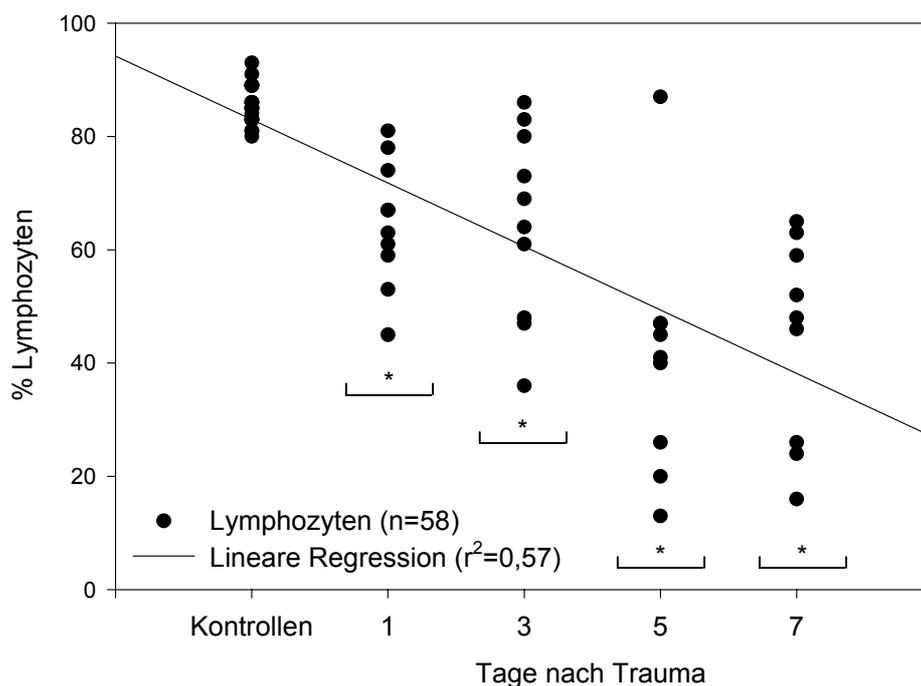


Abb. 15 Verlauf des relativen Lymphozytenanteils innerhalb der PBMC-Fractionen nach Verbrennung; * $p < 0,05$ vs. Kontrollen.

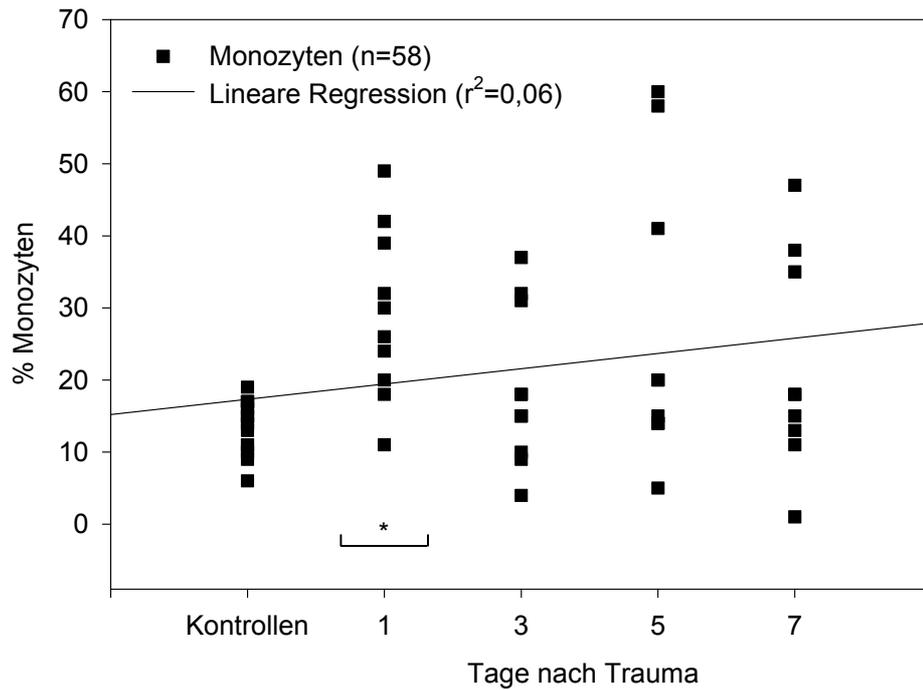


Abb. 16 Verlauf des relativen Monozytenanteils innerhalb der PBMC-Fractionen nach Verbrennung; * $p < 0,05$ vs. Kontrollen.

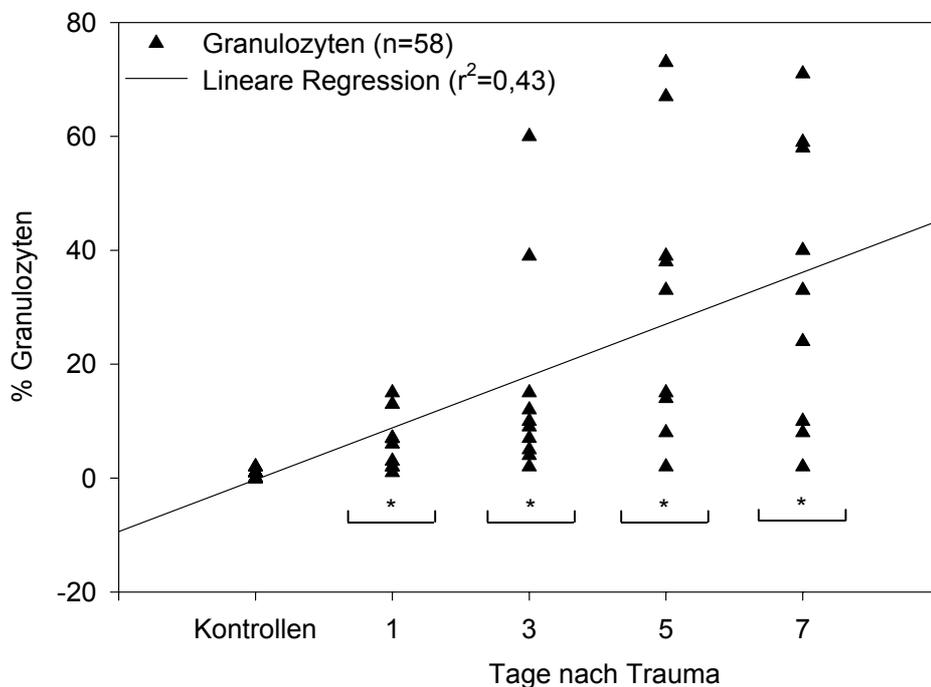


Abb. 17 Verlauf des relativen Granulozytenanteils innerhalb der PBMC-Fractionen nach Verbrennung; * $p < 0,05$ vs. Kontrollen.

4.3 Phänotypisierung der PBMC

4.3.1 B-Lymphozyten

Der prozentuale Anteil der CD19+ B-Lymphozyten in den PBMC-Fractionen betrug bei gesunden Kontrollen im Mittel $5,15 \pm 0,65\%$. Nach Verbrennung war eine signifikante Zunahme der B-Zellen festzustellen, ausgehend von $9,78 \pm 2,02\%$ am Tag 1 bis auf $16,11 \pm 2,37\%$ am Tag 7 nach Trauma (Abb. 18).

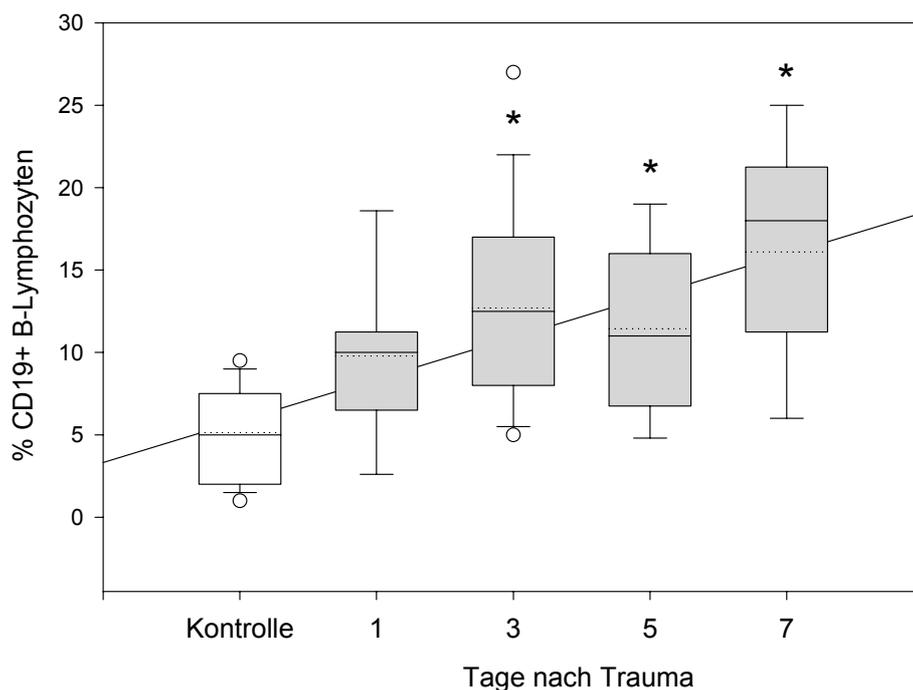


Abb. 18 Frequenz der CD19+ B-Lymphozyten. * $p < 0,05$ vs. Kontrollen.

4.3.2 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Abb. 19 zeigt eine prozentuale Abnahme der NK-Zellpopulation innerhalb der PBMC am Beispiel des CD16-Antigens von initialen $12,39 \pm 2,64\%$ am Tag 1 bis auf $6,77 \pm 1,11\%$ am Tag 7 nach Trauma. Der Referenzwert aus dem gesunden Kollektiv beträgt $13,57 \pm 1,47\%$. Die Expressionsdichte des CD11b Antigens auf CD16+ NK-Zellen, dargestellt als MFI, zeigte keine signifikanten Veränderungen im posttraumatischen Verlauf ($34,54 \pm 3,51$ am Tag 1 bzw. $31,16 \pm 3,76$ am Tag 7) verglichen mit den Kontrollen ($38,23 \pm 2,20$) (Abb. 19).

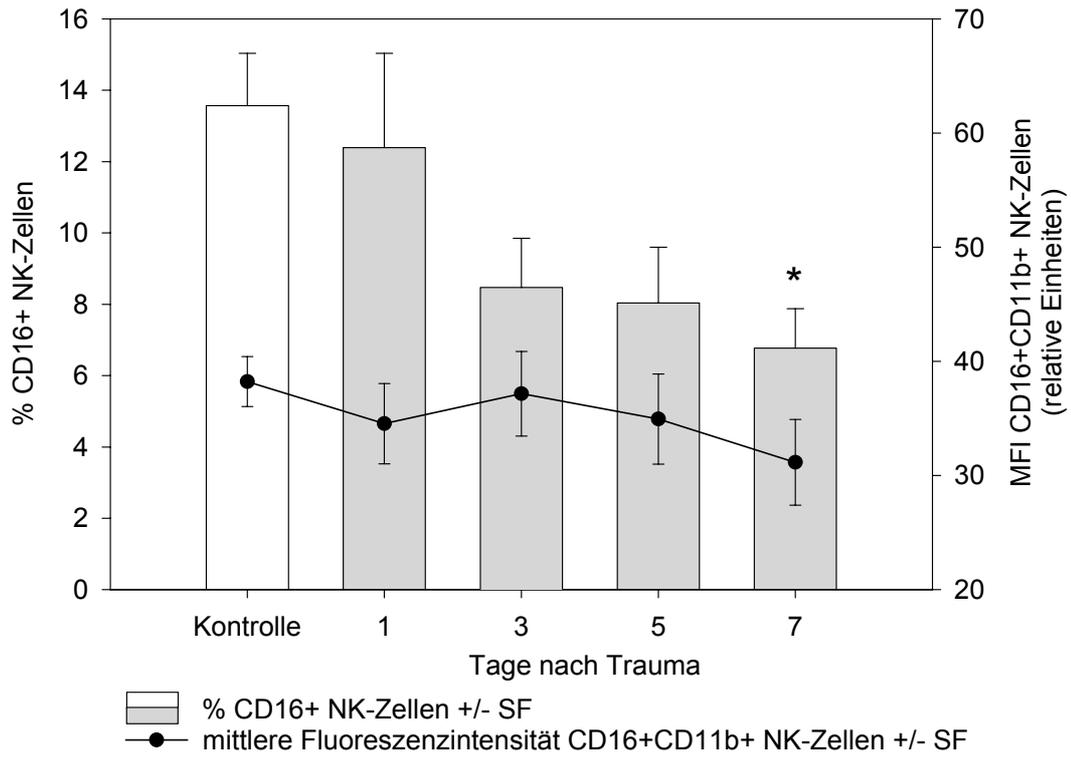


Abb. 19 Frequenz der CD16+ NK-Zellen und CD11b-Expression auf NK-Zellen (CD16+CD11b+). *p<0,05 vs. Kontrollen.

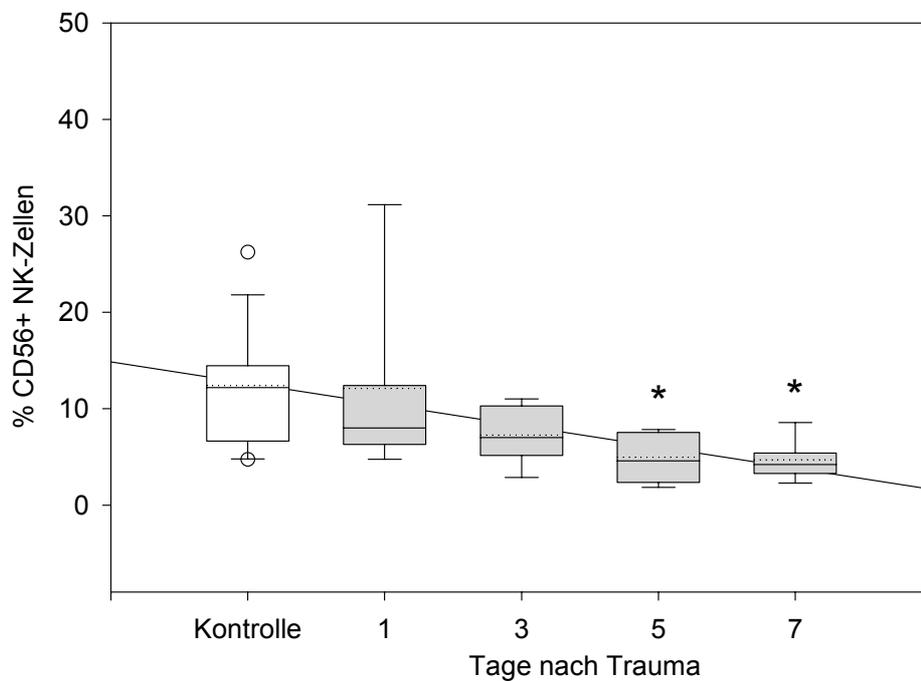


Abb. 20 Frequenz der CD56+ NK-Zellen. *p<0,05 vs. Kontrollen.

Anhand der CD56 Expression (CD56+CD3-) konnte die prozentuale Abnahme der NK-Zellen bestätigt werden mit signifikant reduzierten Werten an den Tagen 5 ($5,00 \pm 1,01\%$) und 7 ($4,73 \pm 0,88\%$) gegenüber $12,39 \pm 1,66\%$ in der Kontrollgruppe (Abb. 20).

4.3.3 T-Lymphozyten und Subpopulationen

Trotz der tendenziell leicht rückläufigen absoluten Zahl der T-Lymphozyten (CD3+) nach Verbrennungsverletzung zeigt dieser Verlauf statistisch keine Signifikanz. Die Werte bewegen sich mit minimalen $75,00 \pm 3,15\%$ am Tag 7 und maximalen $82,00 \pm 2,23\%$ am Tag 5 im Bereich der gesunden Kontrollen ($81,70 \pm 1,61\%$) (Abb. 21).

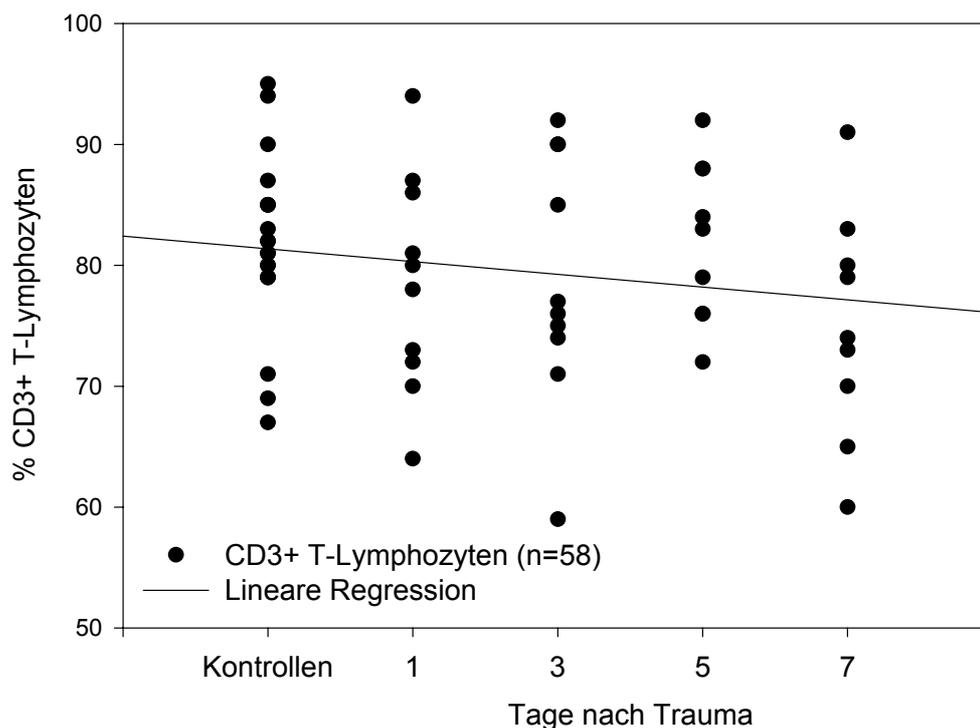


Abb. 21 Frequenz der CD3+ T-Lymphozyten

Die Zahl der den IL-2R α -tragenden (Tac, p55) T-Zellen (CD3+CD25+) ist im posttraumatischen Verlauf an den Tagen 5 und 7 mit $5,00 \pm 1,11\%$ bzw. $7,00 \pm 1,36\%$ gegenüber dem Kontrollkollektiv ($1,88 \pm 0,32\%$) signifikant erhöht (Abb. 22).

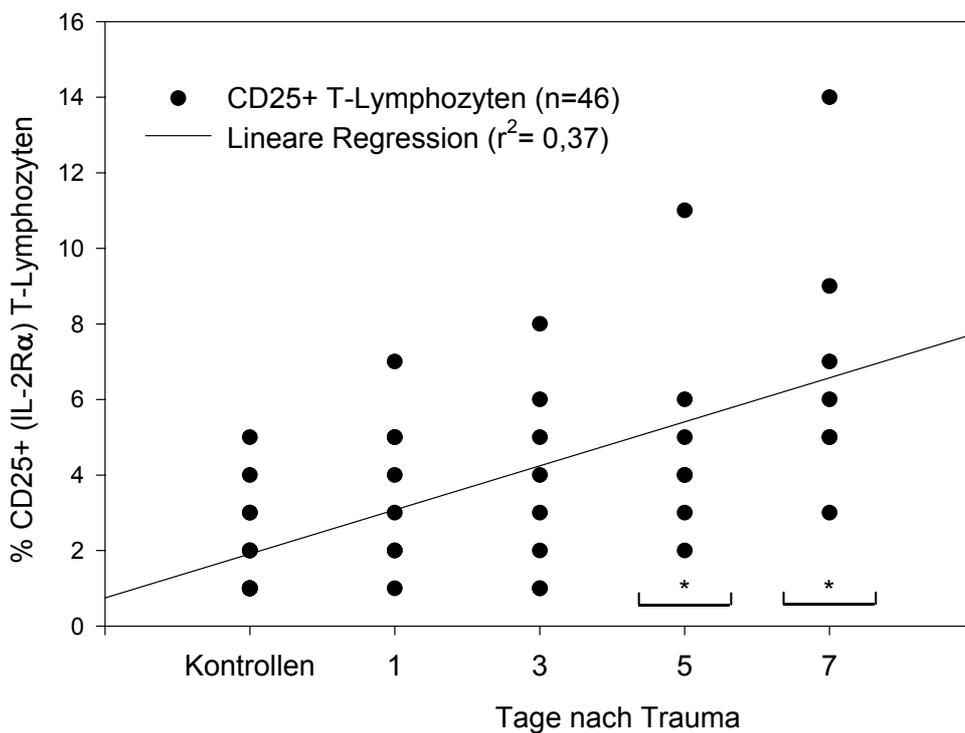


Abb. 22 Frequenz der IL-2R α + T-Lymphozyten (CD3+CD25+).
*p<0,05 vs. Kontrollen.

T-Helferzellen (CD4+) und Suppressor-/zytotoxische T-Zellen (CD8+CD16-) sind in der Frequenz, angegeben als dimensionsloses Verhältnis (ratio CD4/CD8), mit einem Referenzwert von $1,94 \pm 0,19$ und leicht erhöhten Werten im posttraumatischen Verlauf zwischen $2,15 \pm 0,28$ (Tag 1) und $2,73 \pm 0,38$ (Tag 7) nicht signifikant verschieden (Abb. 23).

Auch die prozentuale Analyse der CD2+CD3+ T-Lymphozyten ergab keine signifikanten Veränderungen zwischen der Kontrollgruppe und dem Patientenkollektiv und betrug in allen Fällen knapp 100% (Abb. 24). Allerdings fiel bei Betrachtung der Expressionsdichte des CD2-Antigens auf den CD3+ T-Zellen innerhalb der ersten Woche nach Trauma zunächst ein Anstieg der MFI auf. Verglichen mit $69,76 \pm 4,66$ bei Kontrollen erreichte die MFI am Tag 3 mit $104,11 \pm 18,94$ statistische Relevanz, um bis zum Tag 7 mit $76,25 \pm 12,58$ wieder auf Kontrollniveau zu sinken (Abb. 24).

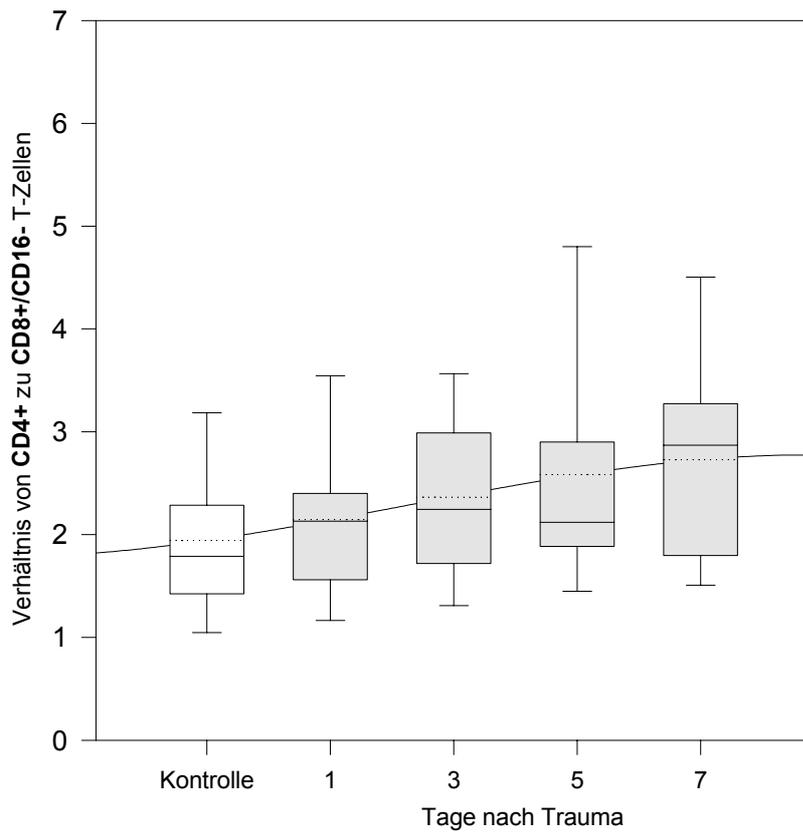


Abb. 23 Frequenz von T-Helferzellen (CD4+) und Suppressor-/zytotoxische T-Zellen (CD8+) angegeben als Verhältnis (CD4+/CD8+CD16-).

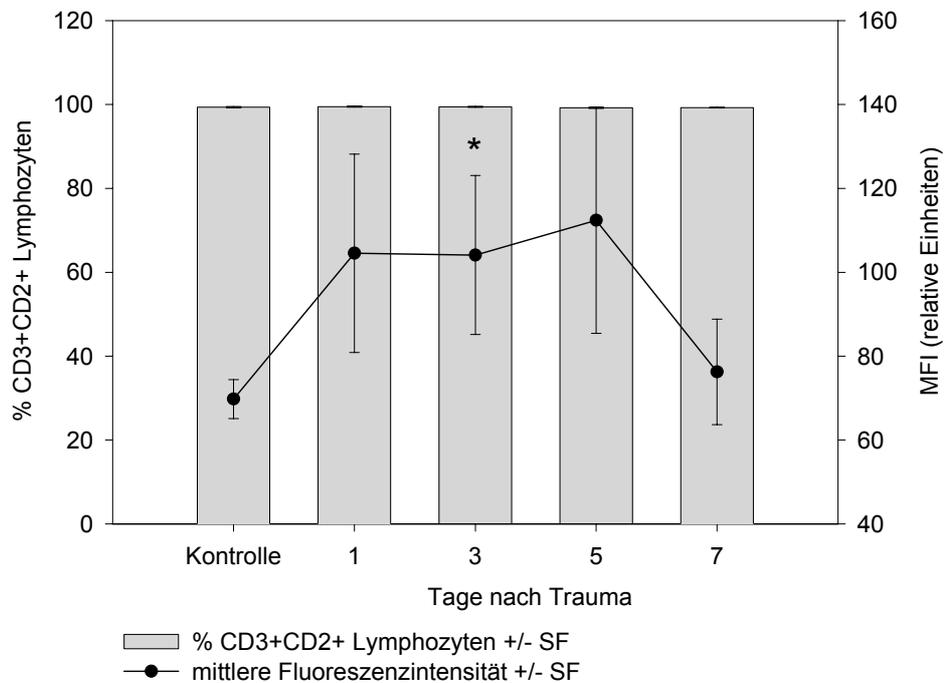


Abb. 24 Frequenz CD2+CD3+ T-Lymphozyten und CD2-Expression auf T-Lymphozyten (CD2+CD3+). *p<0,05 vs. Kontrolle.

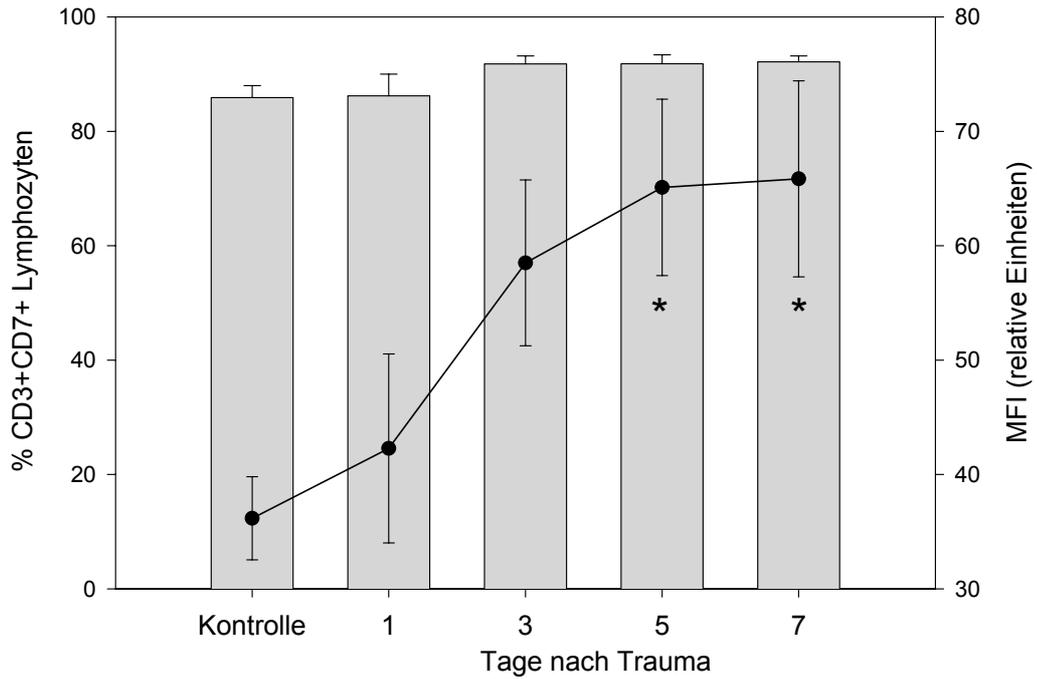


Abb. 25 Frequenz von CD3+CD7+ T-Lymphozyten und CD7-Expression auf T-Lymphozyten (CD3+CD7+). *p<0,05 vs. Kontrolle.

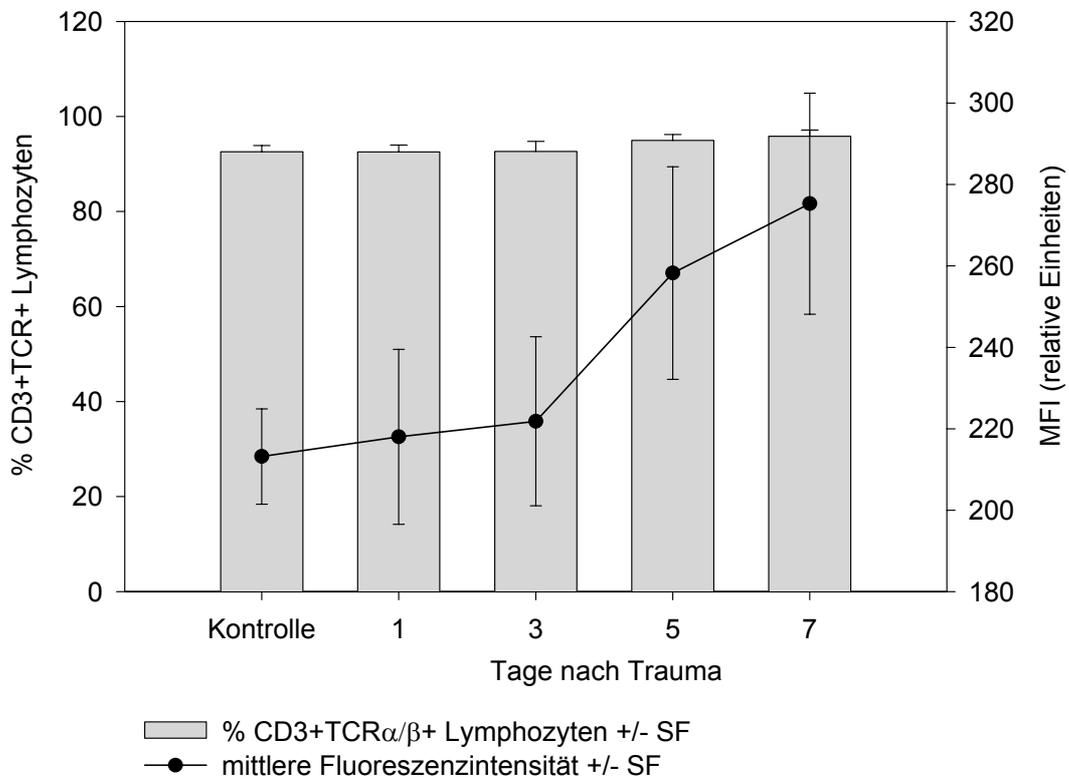


Abb. 26 Frequenz von CD3+TCRα/β+ T-Lymphozyten und TCRα/β-Expression auf T-Lymphozyten (CD3+TCRα/β+).

Die Expressionsdichte des CD7-Antigens auf CD3+ T-Zellen dagegen wurde ausgehend von $36,17 \pm 3,64$ in der Kontrollgruppe kontinuierlich hochreguliert von $42,28 \pm 8,27$ am Tag 1 post Trauma bis auf $65,85 \pm 8,57$ am Tag 7. Allerdings war damit nur eine leichte, statistisch nicht signifikante Frequenzsteigerung von CD3+CD7+ T-Zellen im Bereich von $86,23 \pm 3,79\%$ am Tag 1 bis $92,15 \pm 1,02\%$ am Tag 7 gegenüber dem Referenzwert mit $85,91 \pm 2,07\%$ verbunden (Abb. 25). Ein ganz ähnliches Bild zeigte sich bei der Expression des TCR α/β auf den CD3+ T-Lymphozyten, obwohl der prozentuale Anteil und auch die Expressionsdichte dieses Antigens trotz einer stetigen Zunahme in der frühen Phase nach Trauma zu keinem Zeitpunkt signifikant gegenüber den Gesundheitskontrollen ($92,60 \pm 1,29\%$ bzw. $213,16 \pm 11,71$ MFI) erhöht war (Abb. 26). Die Frequenz der CD28 exprimierenden T-Helferzellen (CD4+CD28+) lag im posttraumatischen Verlauf mit Werten zwischen $96,27 \pm 2,67\%$ (Tag 3) und $97,27 \pm 1,64\%$ (Tag 7) im Bereich des Kontrollkollektivs ($97,44 \pm 1,60\%$). Die Expressionsdichte dieses kostimulatorischen Moleküls dagegen nahm kontinuierlich von $154,45 \pm 14,60$ am Tag 1 bis auf signifikant erhöhte $178,50 \pm 14,49$ am Tag 7 zu, verglichen mit $123,19 \pm 8,39$ der gesunden Referenz (Abb. 27).

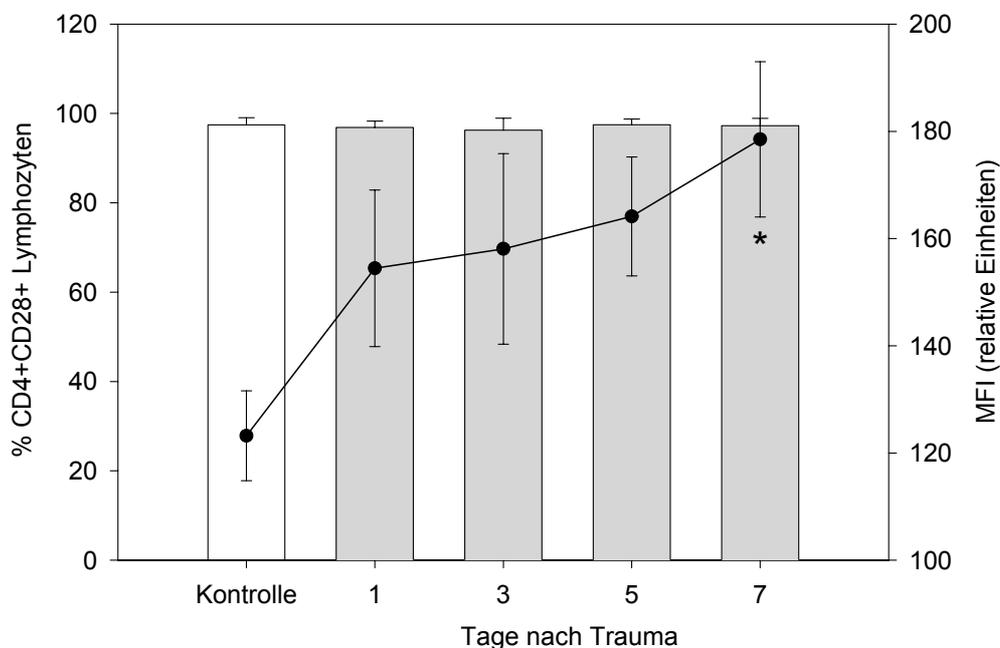


Abb. 27 Frequenz von CD4+CD28+ T-Lymphozyten und CD28-Expression auf T-Helfer-Lymphozyten (CD4+CD28+). *p<0,05 vs. Kontrolle.

Die Zahl und die mittlere Fluoreszenzintensität der CD8+CD28+ T-Lymphozyten stieg nach Trauma leicht, jedoch nicht signifikant, an und erreichte jeweils am Tag 5 Maximalwerte mit $67,83 \pm 5,76\%$ bzw. $43,99 \pm 10,86$ MFI. In der Kontrollgruppe trugen $58,46 \pm 3,27\%$ der CD8+ T-Lymphozyten auch das CD28-Antigen auf ihrer Oberfläche mit einer Dichteverteilung von $22,21 \pm 3,64$ MFI (Abb. 28).

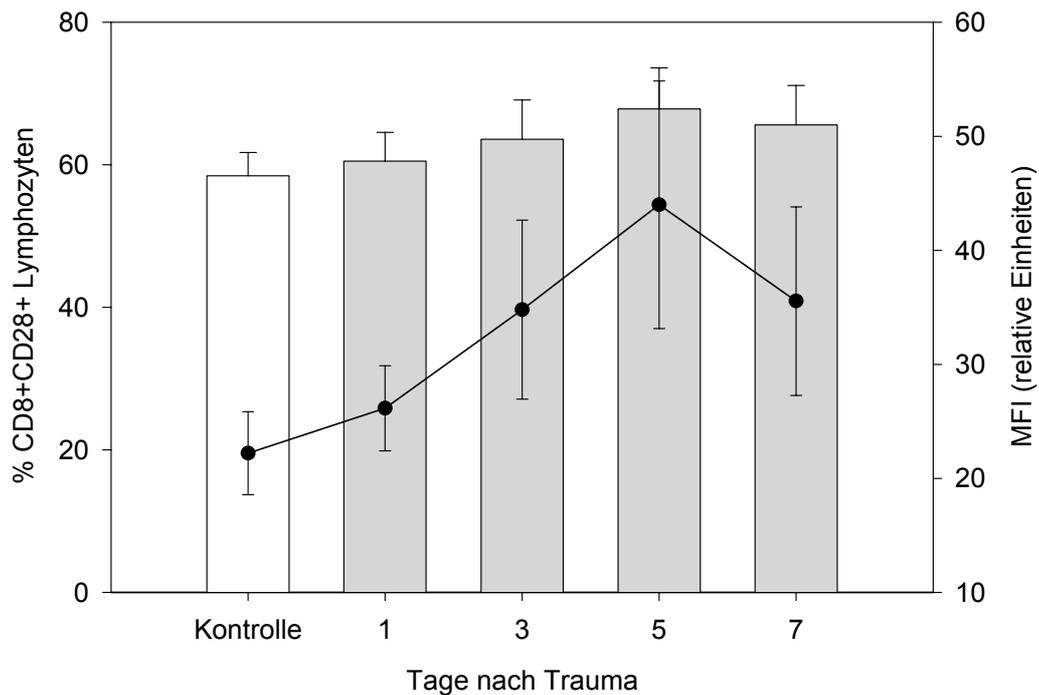


Abb. 28 Frequenz von CD8+CD28+ T-Lymphozyten und CD28-Expression auf CD8+ T-Lymphozyten (CD8+CD28+).

Die Analyse der Subpopulationen CD8-positiver T-Lymphozyten ergab hinsichtlich der prozentualen Anteile von Suppressor- (CD11b+CD16-) und zytotoxischen Zellen (CD11b-CD16-) keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen (Abb. 29). In der Kontrollgruppe konnten $21,78 \pm 2,19\%$ der CD8+ T-Lymphozyten der Suppressorsubpopulation zugeordnet werden, nach Verbrennungstrauma zwischen $17,93 \pm 5,03\%$ (Tag 7) und $21,67 \pm 4,85\%$ (Tag 3). Auch die Expressionsdichte des CD11b-Adhäsionsmoleküls auf der Oberfläche von CD8+CD11b+CD16- Suppressor-T-Lymphozyten, dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität, bewegte sich in der ersten Woche nach Trauma mit minimalen $5,55 \pm 0,61$ und maximalen $5,88 \pm 0,49$ auf Kontrollniveau ($5,63 \pm$

0,42). Auf der Oberfläche von $78,23 \pm 2,19\%$ der CD8+ T-Lymphozyten gesunder Kontrollen konnte weder das CD11b- noch das CD16-Antigen nachgewiesen und die Untergruppe per definitionem als zytotoxische T-Zellen angesprochen werden (CD8+CD11b-CD16-). Nach Trauma waren mit kumulativen $80,34 \pm 2,29\%$ statistisch nur unwesentliche Veränderungen in der Häufigkeit dieses Zelltyps nachweisbar (Abb. 29).

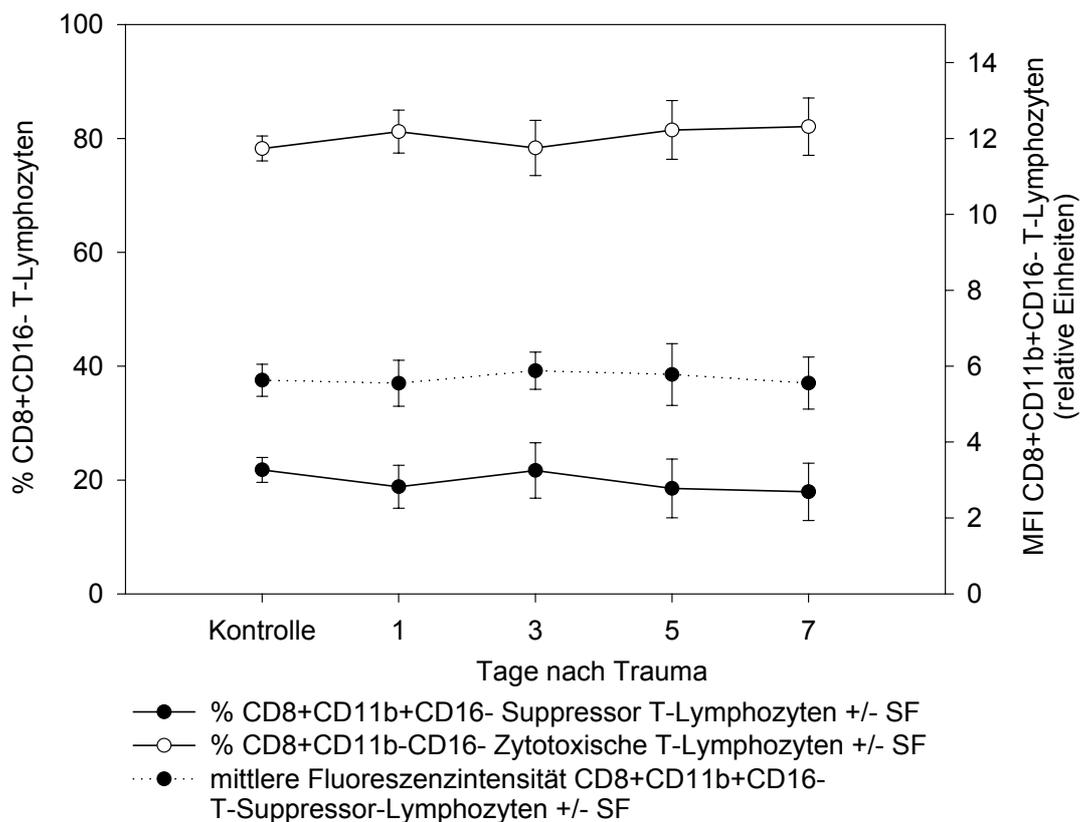


Abb. 29 Frequenz von CD8+**CD11b**+CD16-/CD8+**CD11b**-CD16- T-Lymphozyten und CD11b-Expression auf CD8+CD16- T-Lymphozyten (CD8+CD11b+CD16-).

In Abb. 30 ist die prozentual anteilige Entwicklung einer CD3+CD56+ Subpopulation von T-Lymphozyten mit zytotoxischer Aktivität im posttraumatischen Verlauf dargestellt. Trotz leicht steigender Tendenz nach Trauma mit kumulativ $4,75 \pm 0,77\%$ CD3+CD56+ T-Lymphozyten gegenüber $2,89 \pm 0,44\%$ bei den gesunden Kontrollen waren diese Veränderungen statistisch nicht signifikant.

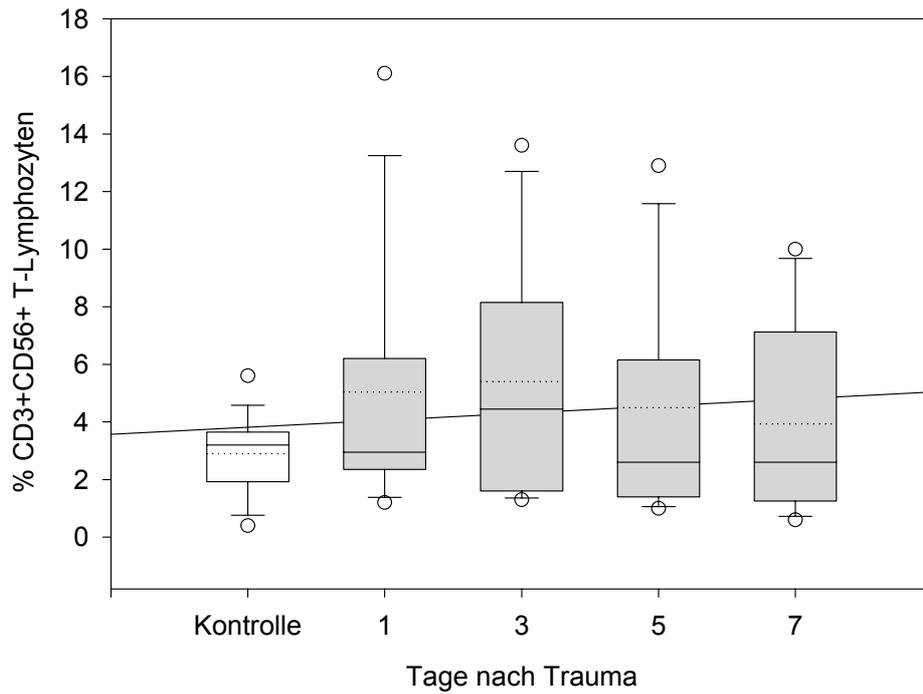


Abb. 30 Frequenz von CD3+CD56+ zytotoxischen T-Lymphozyten.

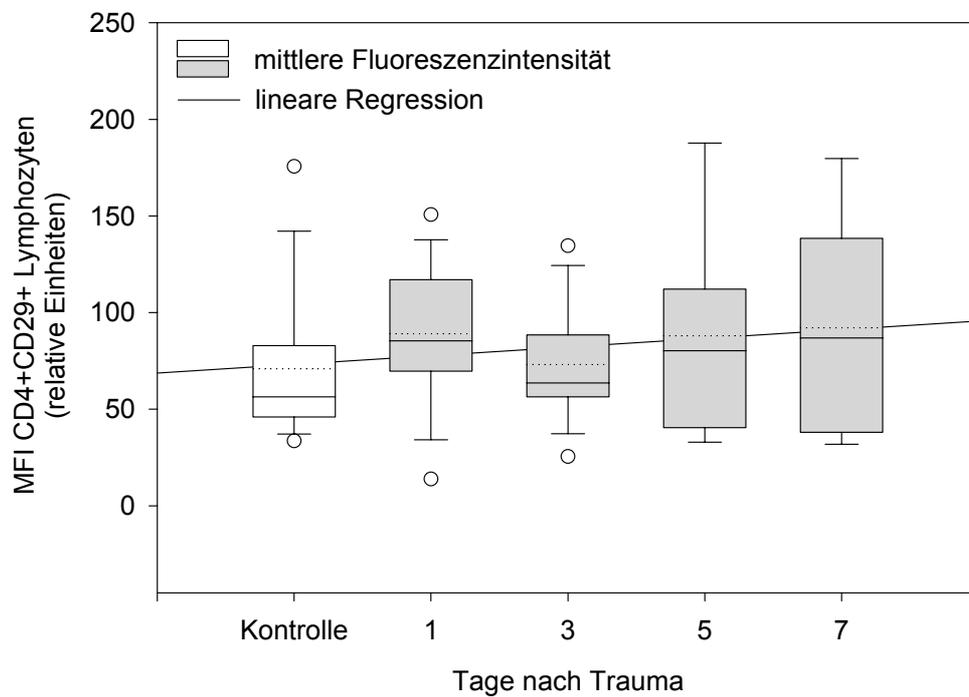


Abb. 31 CD29-Expression auf CD4+ T-Lymphozyten (CD4+CD29+).

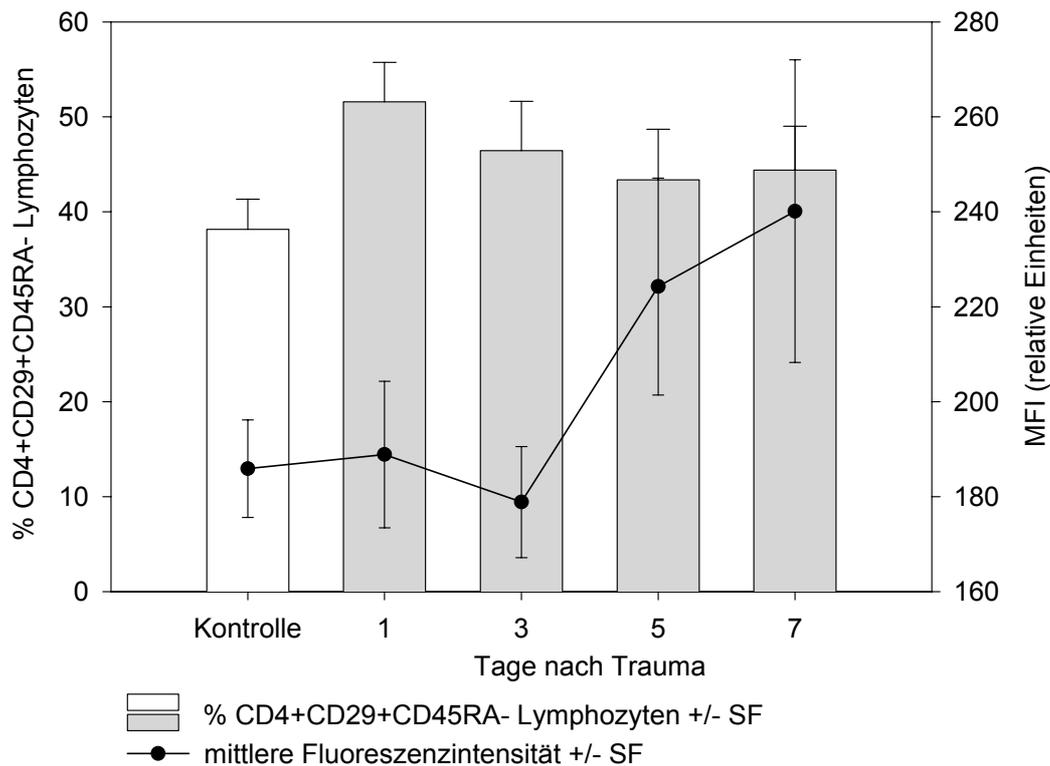


Abb. 32 Frequenz von CD4+CD29+CD45RA- T-Lymphozyten und CD29-Expression auf CD4+ „Inducer“- T-Lymphozyten (CD4+CD45RA-).

Innerhalb der CD4+ T-Helferlymphozyten kam es im posttraumatischen Verlauf zu keiner statistisch signifikanten Änderung des prozentualen Anteils der „Inducer“-Subpopulation (CD4+CD29+CD45RA-). Verglichen mit anteiligen $38,15 \pm 3,17\%$ der CD4+ T-Helferzellen als gesunde Referenz, bewegte sich der Anteil der „Inducer“-Subpopulation bei den Patienten leicht erhöht zwischen $51,58 \pm 4,16\%$ (Tag 1) und $43,37 \pm 5,32\%$ (Tag 5) (Abb. 32). Auch die Bestimmung der Dichteverteilung des CD29-Antigens auf T-Helferzellen (CD4+) erreichte trotz steigender Expressionsdichte bei Patienten zu keinem Messzeitpunkt statistische Relevanz. Für die CD4+ Zellen ergaben sich im Vergleich mit den Kontrollen ($70,82 \pm 9,63$ MFI) kontinuierlich steigende Werte von $87,83 \pm 29,72$ MFI am Tag 1 nach Trauma bis auf $106,07 \pm 45,17$ MFI am Tag 7 (Abb. 31). Die Subpopulation der CD4+CD45RA- T-Helferzellen zeigte eine verstärkte Expression dieses $\beta 1$ -Integrins beginnend am Tag 5 post Trauma mit einem Spitzenwert von $240,12 \pm 31,88$ MFI am Tag 7 verglichen mit $185,89 \pm 10,28$ MFI der Kontrollgruppe ohne

aber ein signifikantes Niveau zu erreichen (Abb. 32). Die prozentualen Verteilungen des CD45RA- und des CD45RO-Antigens ließen erwartungsgemäß einen reziproken Verlauf erkennen. Mit kumulativen $45,82 \pm 2,43\%$ war die Expression von CD45RA auf den „naiven“ T-Helferzellen (CD4+CD45RA+) nach Trauma verglichen mit den Kontrollen leicht rückläufig ($54,21 \pm 3,41\%$) (Abb. 33). Der Anteil der T-Gedächtniszellen (CD4+CD45RO+) dagegen stieg mit kumulativen $44,82 \pm 2,50\%$ gegenüber den Kontrollen mit $37,07 \pm 3,29\%$ leicht an (Abb. 33). Beide Verläufe zeigten keine statistische Relevanz. Bei Betrachtung des CD45RA-Antigens auf CD8+ T-Zellen konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ($75,66 \pm 1,42\%$) eine signifikante prozentuale Abnahme dieser Subpopulation von $61,62 \pm 2,99\%$ am Tag 1 und $62,49 \pm 4,47\%$ am Tag 3 bis auf $62,66 \pm 4,01\%$ am Tag 5 festgestellt werden mit tendenziell leichter Erholung am Tag 7 nach Trauma (Abb. 34). Dementsprechend stieg die Zahl der CD8+CD45RO+ T-Zellen im posttraumatischen Verlauf an, mit einem signifikant erhöhten Spitzenwert von $23,85 \pm 2,77\%$ am Tag 3. Den Normalwert ermittelten wir mit anteiligen $13,54 \pm 1,25\%$ CD8+CD45RO+ T-Lymphozyten innerhalb der CD8+ Population (Abb. 34).

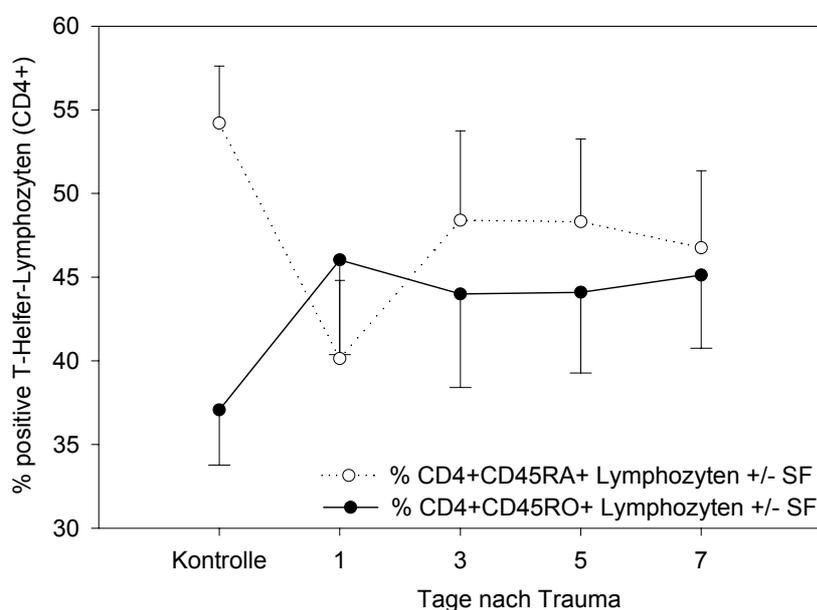


Abb. 33 Frequenz von CD45RA+ und CD45RO+ T-Helferlymphozyten (CD4+CD45RA+/CD4+CD45RO+).

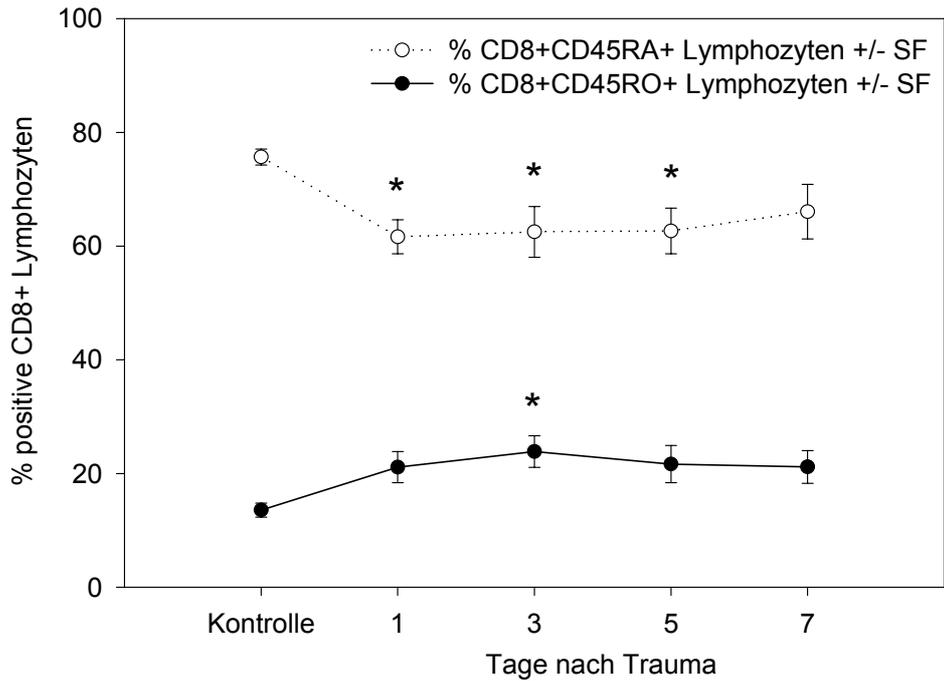


Abb. 34 Frequenz von CD45RA+ und CD45RO+ CD8+ T-Lymphozyten (CD8+CD45RA+/CD8+CD45RO+). *p<0,05 vs. Kontrolle.

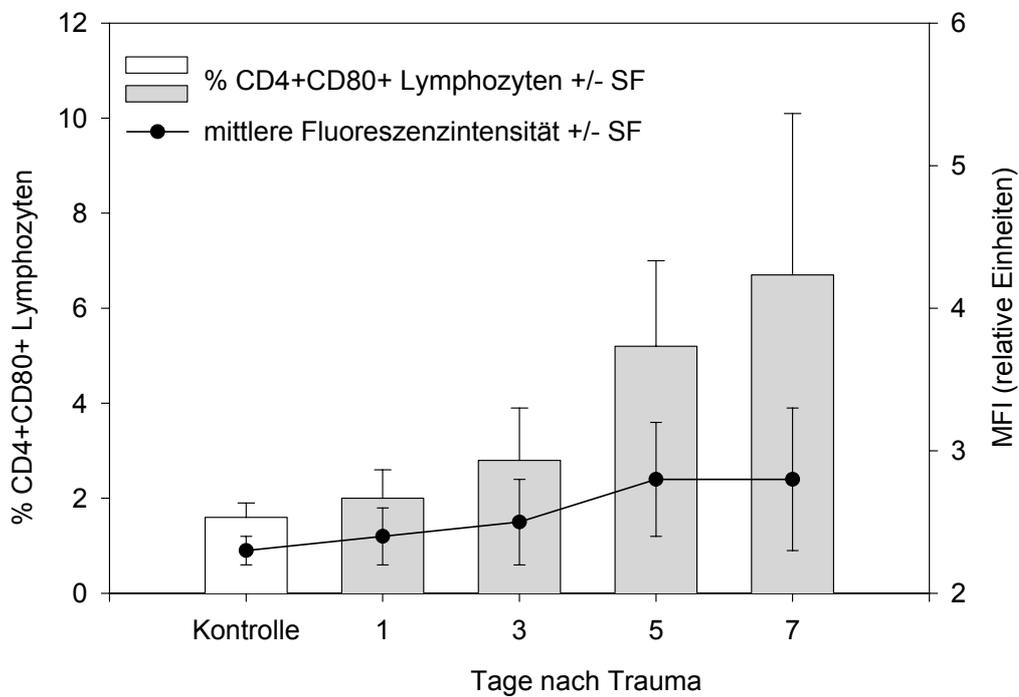


Abb. 35 Frequenz von CD4+CD80+ T-Lymphozyten und CD80-Expression auf CD4+ T-Lymphozyten (CD4+CD80+).

Die Zahl der kostimulatorischen Membranproteinmoleküle B7-1 (CD80) auf T-Helferzellen (CD4+CD80+), deren Anteil bei den gesunden Kontrollen $1,60 \pm 0,30$ erreichte, nahm in der ersten Woche nach Trauma ausgehend von $2,00 \pm 0,60\%$ am Tag 1 bis auf $6,70 \pm 3,40\%$ kontinuierlich, aber nicht signifikant, zu (Abb. 35). Die Expressionsdichte von CD80 auf CD4+ T-Zellen stagnierte mit kumulativ $2,70 \pm 0,19$ MFI nahezu auf Kontrollniveau ($2,30 \pm 0,10$ MFI) (Abb. 35). Die Frequenz der CD8+CD80+ T-Zellen stieg nach Trauma ebenfalls auf einen allerdings nicht signifikanten Maximalwert von $3,50 \pm 1,70\%$ am Tag 5 an und war am Tag 7 mit $2,70 \pm 1,00\%$ bereits wieder leicht rückläufig (Abb. 36). Die Dichteverteilung bewegte sich mit kumulativ $2,40 \pm 0,19$ MFI im Bereich des Normalwertes ($2,20 \pm 0,20$ MFI) (Abb. 36).

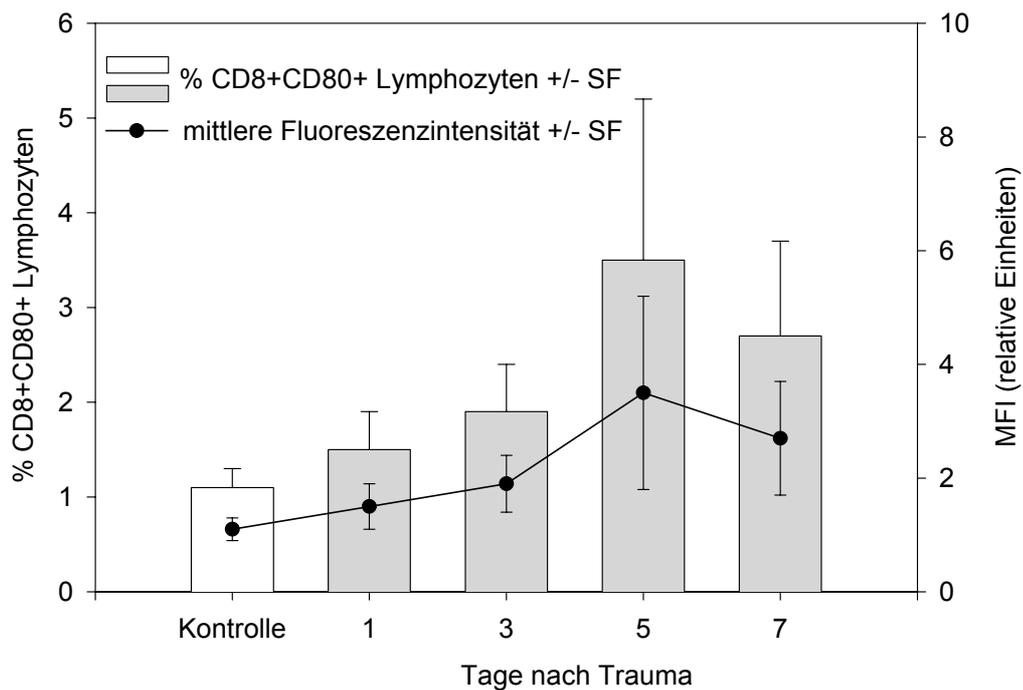


Abb. 36 Frequenz von CD8+CD80+ T-Lymphozyten und CD80-Expression auf CD8+ T-Lymphozyten (CD8+CD80+).

4.4 Nachweis intrazellulärer Zytokine

4.4.1 Die Bedeutung von Monensin und Saponin

Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von Monensin mit PMA und Ionomycin kurzzeitig aktiviert und gegen intrazelluläre Zytokine gefärbt. Wie in Abb. 37 am Beispiel einer IFN- γ -Färbung dargestellt, verstärkt das Na-Ionophor Monensin die Signal/Rauschen-Ratio durch Erhöhung der Fluoreszenzintensität ebenso wie durch eine höhere Zahl gefärbter Zellen. Ohne Permeabilisierung der Zellen mit Saponin ist den monoklonalen Antikörpern das Penetrieren in das Zytoplasma so gut wie nicht möglich und es ergeben sich Färberegebnisse im Bereich der Isotypkontrollen, die ihrerseits eine mögliche unspezifische Anfärbung aufzeigen.

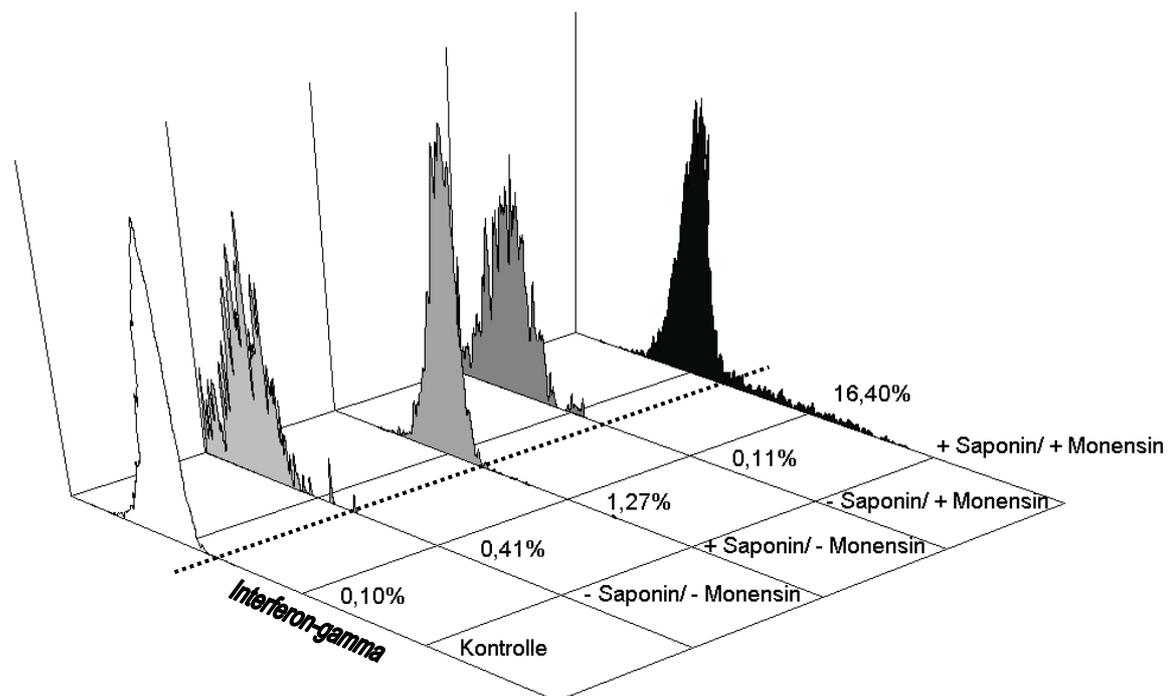


Abb. 37 Der Effekt von Monensin und Saponin auf die intrazelluläre Färbung von IFN- γ . PBMC wurden mit 5 ng/ml PMA und 1 μ M Ionomycin in Gegenwart oder Abwesenheit von 3 μ M Monensin über 5 Stunden stimuliert und anschließend gegen intrazelluläres IFN- γ mit oder ohne Permeabilisierung durch Saponin gefärbt. Ein Analysefenster wurde auf die Lymphozyten gelegt. 16,4% der Lymphozyten waren positiv in Gegenwart von Monensin und 1,27% in Abwesenheit von Monensin. Die Ansätze ohne Saponinbehandlung und die Kontrolle mit einem irrelevanten Maus IgG1 mAk (Isotypkontrolle) zeigten <1% positive bzw. unspezifisch gefärbte Zellen.

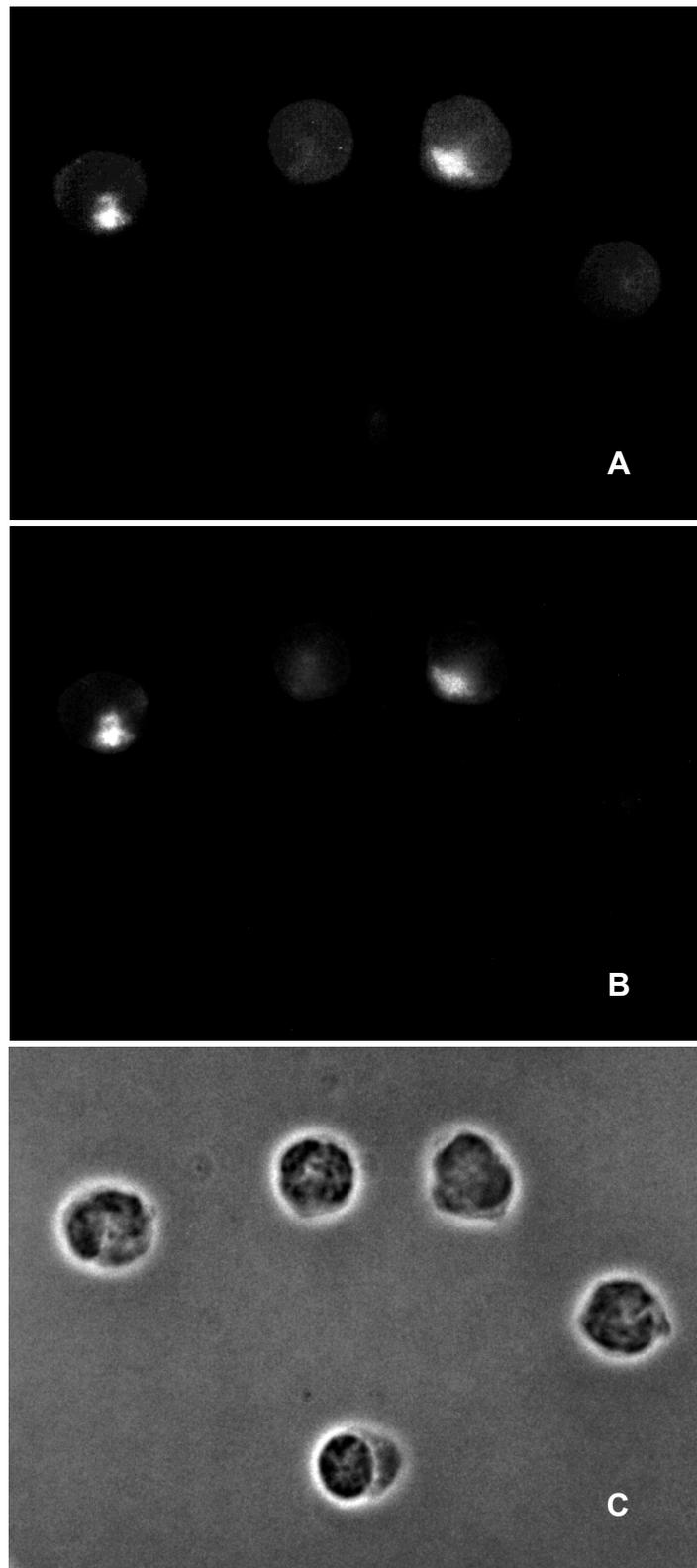


Abb. 38 PBMC-Färbung mit 10 $\mu\text{g/ml}$ WKA-TRITC zur Visualisierung des Golgi-Apparates (A). Nach Inkubation mit IFN- γ -FITC mAK zeigen zwei positive PBMC das typische zytoplasmatische Färbemuster in perinukleärer Position (B), das die Akkumulation vom IFN- γ in den Golgivesikeln widerspiegelt. (C) Korrespondierende Phasenkontrastaufnahme. Originalvergrößerung x1000.

4.4.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von intrazellulärem IFN- γ

Zur Sicherstellung des zytoplasmatischen Ursprungs der durchflusszytometrisch erhaltenen Signale wurden Zytozentrifugenpräparate (1×10^5 PBMC/Präparat) der stimulierten und gefärbten Zellen hergestellt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die exemplarisch ausgewählte intrazelluläre IFN- γ -Färbung zeigt die charakteristische Morphologie einer polaren, perinukleären Akkumulation von IFN- γ in den Golgivesikeln des Zytoplasmas (Abb. 38 B). Um zusätzlich den Golgiapparat darzustellen wurden fixierte und permeabilisierte PBMC simultan mit FITC anti-IFN- γ mAk und TRITC Weizenkeimagglutinin (WKA) gefärbt, das als Lektin über die Reaktion mit Sialuronsäure und dem N-acetylglucosaminanteil von Glycokonjugaten vornehmlich am Golgiapparat bindet (Virtanen 1980). Wir fanden eine totale Überlappung der FITC- und TRITC-Färbung bei zwei PBMC (Abb. 38 A, B), die darauf hindeutet, dass ein Großteil des zytoplasmatischen IFN- γ in den Golgiorganellen lokalisiert ist.

4.4.3 Exemplarische Darstellung der Messergebnisse

In Abb. 39 werden drei ausgewählte durchflusszytometrische Dreifarbenanalysen als korrelierte Zweiparameterdarstellungen präsentiert. Diese bivariaten Punktwolken, sogenannte „dot plots“, zeigen die Relation zwei verschiedener Eigenschaften einer Zelle zueinander an. Dabei entspricht jeder dargestellte Punkt dem Messwert von mindestens einer Zelle mit ihren beiden Eigenschaften. Als Beispiele seien angeführt die Korrelation von intrazellulärem IL-2 mit intrazellulärem IFN- γ innerhalb der T-Helferzellpopulation (CD4+) bzw. der CD8+ Zellen (Abb. 39 B, C), oder von intrazellulärem IL-2 mit CD4+CD45RO+ T-Gedächtniszellen (Abb. 39 D). Die Auswertung der Dreifarbenfluoreszenzen erfolgte teilweise ergänzend über eindimensionale Histogramme, einer Darstellung der Häufigkeitsverteilung. Sie erlauben für jeweils einen singulären Messparameter, hier für intrazelluläres IL-4 (Abb. 40) neben der Abschätzung des Anteils positiver Zellen auch die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity, MFI), einem indirekten Maß für die Antigendichte.

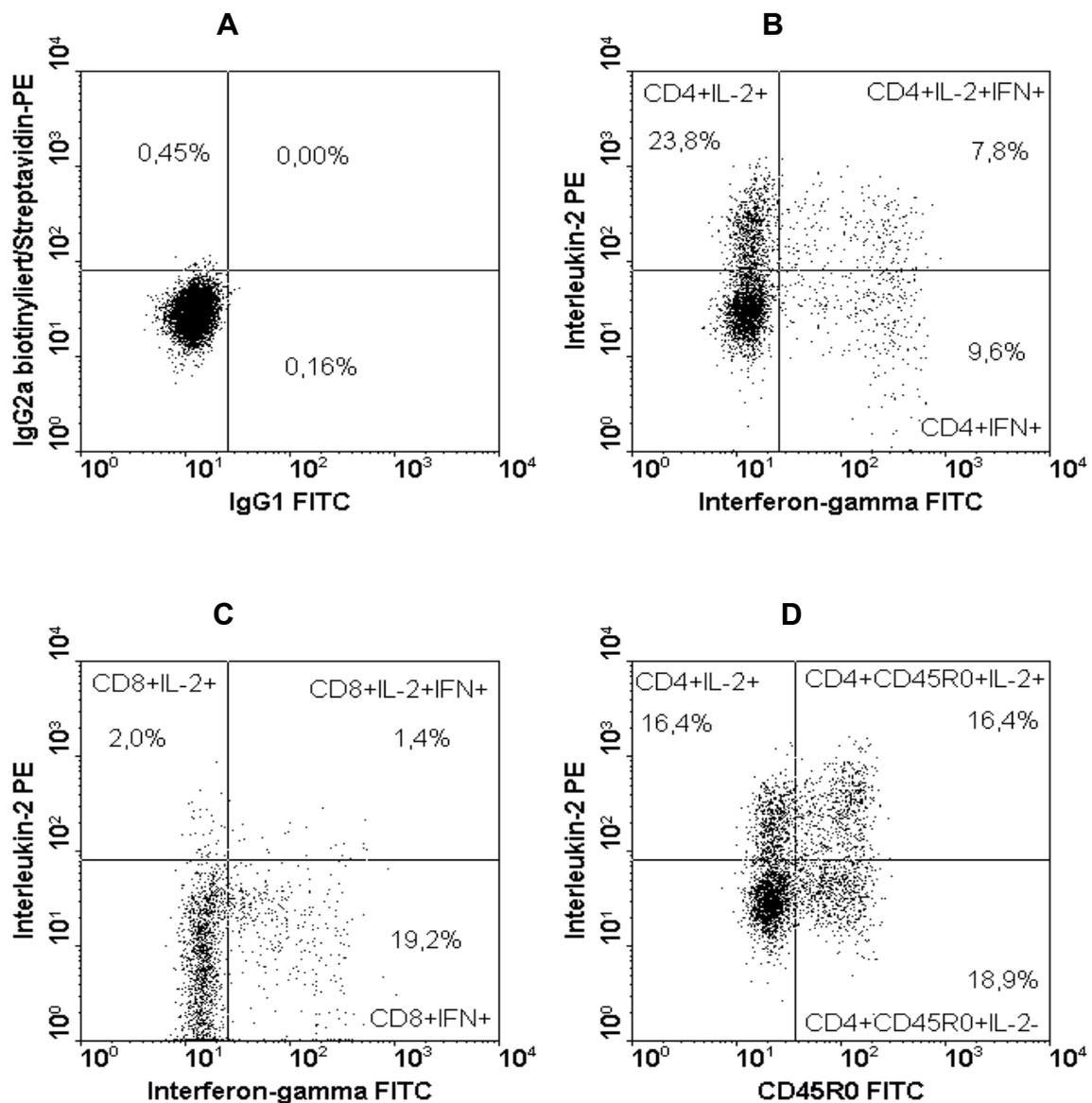


Abb. 39 Repräsentative bivariate Punktwolken- („dot plot“) Darstellung der Expression von IL-2 und IFN- γ durch kurzzeitaktivierte CD4+ und CD8+ PBMC mit 5 ng/ml PMA + 1 μ M Ionomycin + 3 μ M Monensin für 5 Std. (A) zeigt die Isotypkontrolle mit irrelevanten Maus IgG1 und Maus IgG2a Antikörpern. PBMC wurden dreifachgefärbt gegen CD4 bzw. CD8, IL-2 und IFN- γ mit einem Analysefenster auf den CD4+ Zellen (B) bzw. den CD8+ Zellen (C). Die IL-2 Synthesekapazität der T-Gedächtniszellen (CD4+CD45RO+) ist in (D) veranschaulicht.

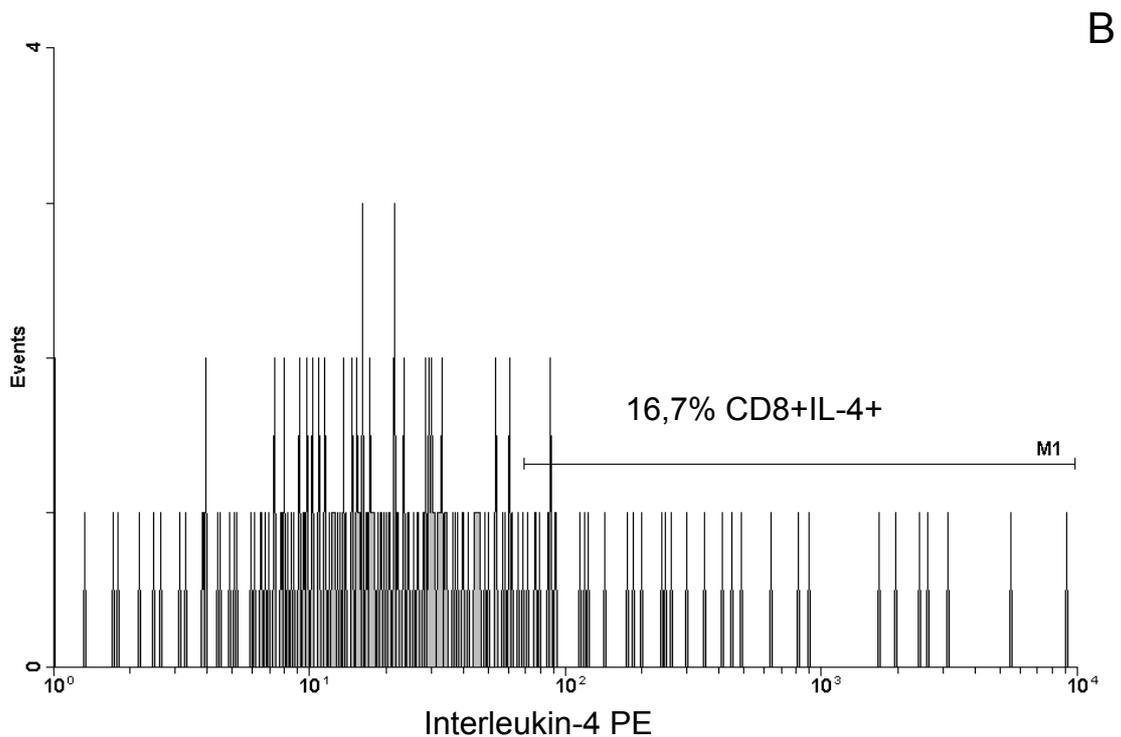
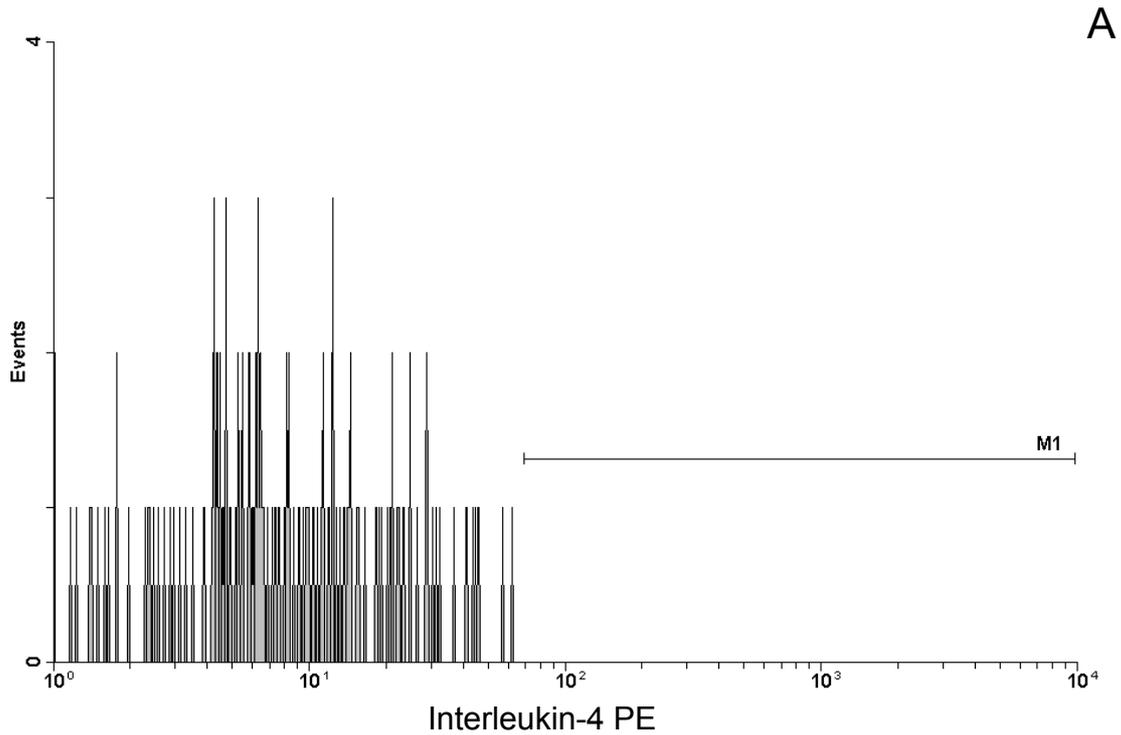


Abb. 40 Eindimensionales Histogramm der Frequenz IL-4- produzierender CD8+ Zellen nach Kurzzeitaktivierung mit 5 ng/ml PMA + 1 μ M Ionomycin + 3 μ M Monensin für 5 Std. (B). In (A) ist die Isotypkontrolle mit einem irrelevanten Maus IgG1-Antikörper dargestellt.

4.4.4 Interleukin-2

In den Kulturüberständen PMA und Ionomycin stimulierter PBMC fanden wir nach 24-stündiger Inkubationszeit ohne Monensinzugabe bei differenzierter Betrachtung eine signifikant erhöhte IL-2-Freisetzung innerhalb des verstorbenen Patientenkollektivs an den posttraumatischen Tagen 5 ($63396 \pm 2906 \text{ pg/ml}$) und 7 ($66039 \pm 11259 \text{ pg/ml}$) gegenüber den Kontrollen mit $31178 \pm 2027 \text{ pg/ml}$. Die IL-2-Synthese der überlebenden Patienten lag mit kumulativen $38162 \pm 2288 \text{ pg/ml}$ auf Kontrollniveau (Abb. 41).

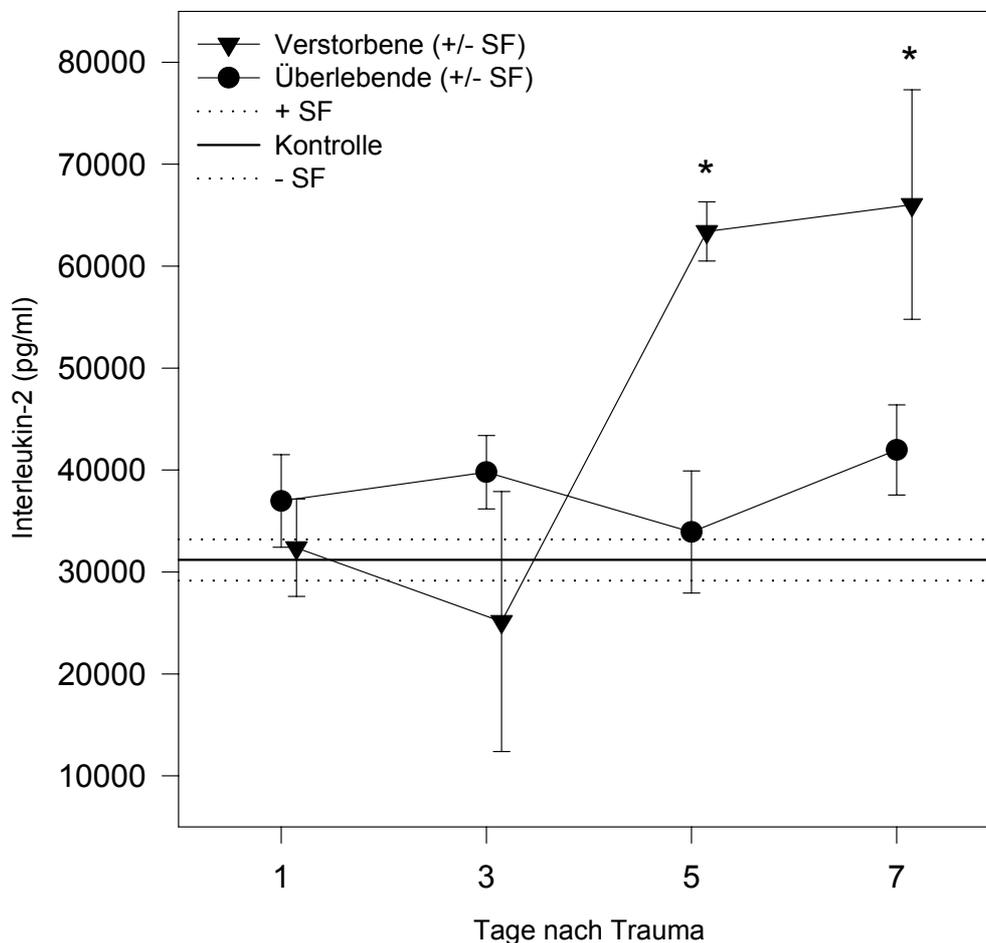


Abb. 41 Die PBMC verstorbener und überlebender Patienten zeigten eine signifikant unterschiedliche IL-2-Synthesekapazität gegenüber der Kontrollgruppe nach 24-stündiger Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Ionomycin und 5 ng/ml PMA. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

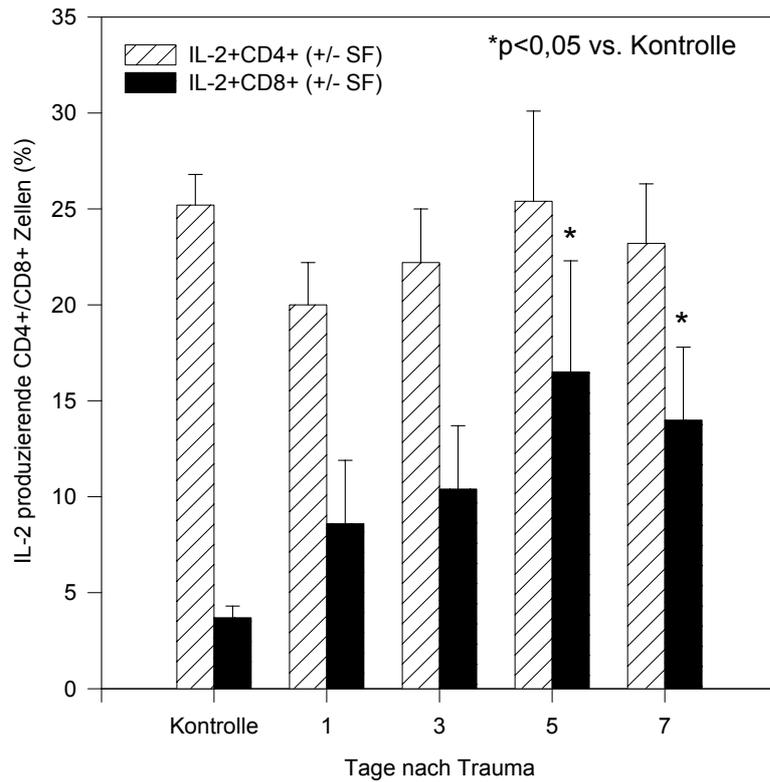


Abb. 42 Verlauf der intrazellulären IL-2-Expression von CD4+ und CD8+ Zellen nach Verbrennungstrauma und Kurzzeitstimulation mit Ionomycin und PMA.

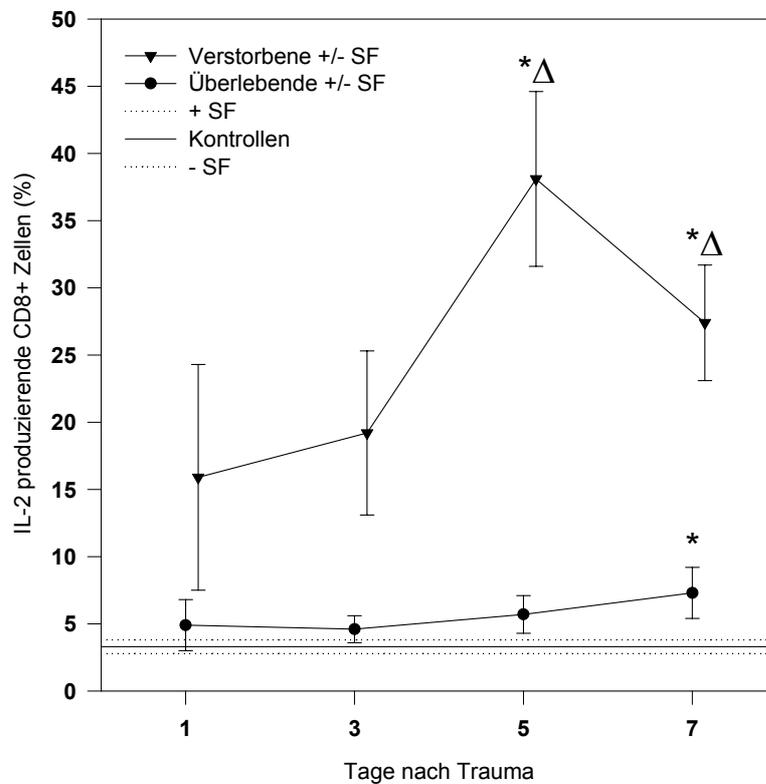


Abb. 43 Differentielle IL-2-Produktion in CD8+ Zellen nach Verbrennungstrauma und Kurzzeitstimulation mit Ionomycin und PMA. *p<0,05 vs. Kontrolle, Δp<0,05 vs. Überlebende.

Die durchflusszytometrische Einzelzellanalyse der PBMC nach 5-stündiger Stimulation mit Ionomycin und PMA zeigte mit $25,2\pm 1,6\%$ eine wesentlich stärkere Beteiligung der CD4+ Lymphozyten an der intrazellulär nachgewiesenen IL-2-Antwort, als der CD8+ Subpopulation mit $3,7\pm 0,6\%$ (Abb. 42). Im posttraumatischen Verlauf blieb die Frequenz der IL-2 synthese-fähigen CD4+ Lymphozyten mit kumulativen $22,6\pm 1,6\%$ im Bereich der Kontrollen. Die Zahl der IL-2 exprimierenden CD8+ Zellen dagegen stieg post Trauma auf signifikante $16,5\pm 5,8\%$ am Tag 5 und $14,0\pm 3,8\%$ am Tag 7 an. Aufgrund dieses Befundes untersuchten wir die CD8+ Population getrennt nach überlebenden und verstorbenen Patienten und fanden die Frequenz der IL-2 produzierenden Zellen bei den Verstorbenen in guter Übereinstimmung mit der Syntheseleistung des Gesamtkollektivs (Abb. 42) teilweise signifikant erhöht. An den konsekutiven Tagen 5 und 7 synthetisierten und akkumulierten $38,1\pm 6,5\%$ und $27,4\pm 4,3\%$ der CD8+ Zellen nicht überlebender Patienten IL-2 (Abb. 43). Die Zahl IL-2+CD8+ Zellen bei den Überlebenden wies in der ersten Woche nach Verbrennung eine nur leicht steigende Tendenz auf und war bis auf den signifikanten Spitzenwert am Tag 7 ($7,3\pm 1,9\%$) statistisch nicht von den Kontrollen zu unterscheiden.

Zwei weitere T-Zellsubpopulationen wurden auf ihre IL-2 Syntheseleistung nach Kurzzeitstimulation ex vivo untersucht. Die prozentualen Anteile IL-2 positiver T-Gedächtniszellen mit dem Phänotyp CD4+CD45RO+ und IL-2 positiver naiver T-Lymphozyten mit dem Phänotyp CD4+CD45RA+ lagen für beide Subtypen trotz steigender Tendenz bei den naiven T-Zellen, im Bereich der ermittelten Referenzwerte (Abb. 44). Kumulativ wurden im Vergleich zu den Kontrollen ($38,9\pm 2,2\%$) in der T-Gedächtniszellpopulation $34,4\pm 2,8\%$ IL-2 produzierende Zellen (CD4+CD45RO+IL-2+) innerhalb der ersten Woche post Trauma gemessen. Demgegenüber waren kumulativ $15,3\pm 2,8\%$ IL-2 positive naive T-Zellen (CD4+CD45RA+IL-2+) bei den Patienten nachweisbar, verglichen mit $14,8\pm 1,4\%$ der Kontrollen. Eine weitere differenzierte Analyse ergab keinen Hinweis auf eine Korrelation der IL-2 Synthese von CD4+CD45RA+ oder CD4+CD45RO+ Zellen und dem klinischen Verlauf (nicht dargestellt).

Analog den CD4+ Zellen untersuchten wir auch bei den CD8+ Zellen die IL-2 Sekretion der CD45RO+ und CD45RA+ Subpopulationen und fanden einen parallelen Verlauf der beiden Kurven, der Anstiege zwischen den Tagen 3 und 5 post Trauma erkennen lässt (Abb. 45). Allerdings ist nur die prozentuale Zunahme der IL-2 positiven CD8+CD45RA+ Zellen statistisch signifikant, ausgehend von $4,2\pm 1,2\%$ am Tag 1 nach Trauma auf $9,0\pm 4,2\%$ bzw. $8,2\pm 1,5\%$ an den Tagen 5 und 7 verglichen mit dem Referenzwert von $1,4\pm 0,4\%$. Trotz Steigerung liegt die Zahl der IL-2 produzierenden CD8+CD45RO+ Zellen, an allen Untersuchungstagen, auch am Tag 7 nach Verbrennung mit $26,7\pm 7,6\%$, im Bereich der gesunden Kontrollen ($9,7\pm 1,6\%$). Bei weiterer Unterscheidung war in der Gruppe der Verstorbenen ein signifikant erhöhter Spitzenwert IL-2 positiver CD8+CD45RO+ Zellen mit $43,4\pm 17,6\%$ am Tag 5 nach Trauma zu verzeichnen, begleitet von einem wenn auch nicht signifikanten Anstieg bei den überlebenden Patienten mit $13,8\pm 2,8\%$ am Tag 5 und $26,3\pm 11,8\%$ am Tag 7 (Abb. 46). Die differenzierte Auswertung der IL-2 Synthese von CD8+CD45RA+ Zellen ergab eine auffällige Parallelität zur Kapazität der CD8+CD45RO+ Zellen im Sinne eines nahezu identischen Kurvenverlaufs bei allerdings niedrigerer Frequenz (Abb. 47). In beiden Kollektiven nahm die Zahl IL-2 positiver Zellen in der ersten Woche nach Trauma zu und erreichte bei den verstorbenen Patienten an den Tagen 5 ($18,6\pm 10,2\%$) und 7 ($10,7\pm 1,8\%$) und bei den überlebenden Patienten am Tag 7 ($7,0\pm 1,8\%$) gegenüber dem Kontrollwert mit $1,4\pm 0,4\%$ statistische Signifikanz.

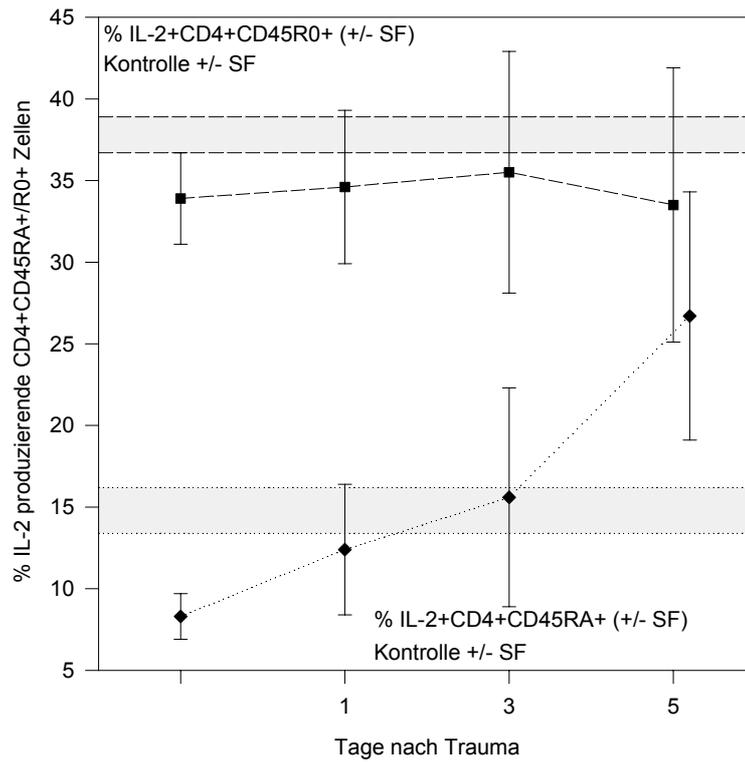


Abb. 44 Verlauf der IL-2 Synthese in naiven T-Lymphozyten (CD4+CD45RA+) und in T-Gedächtniszellen (CD4+CD45RO+) nach Verbrennungsverletzung.

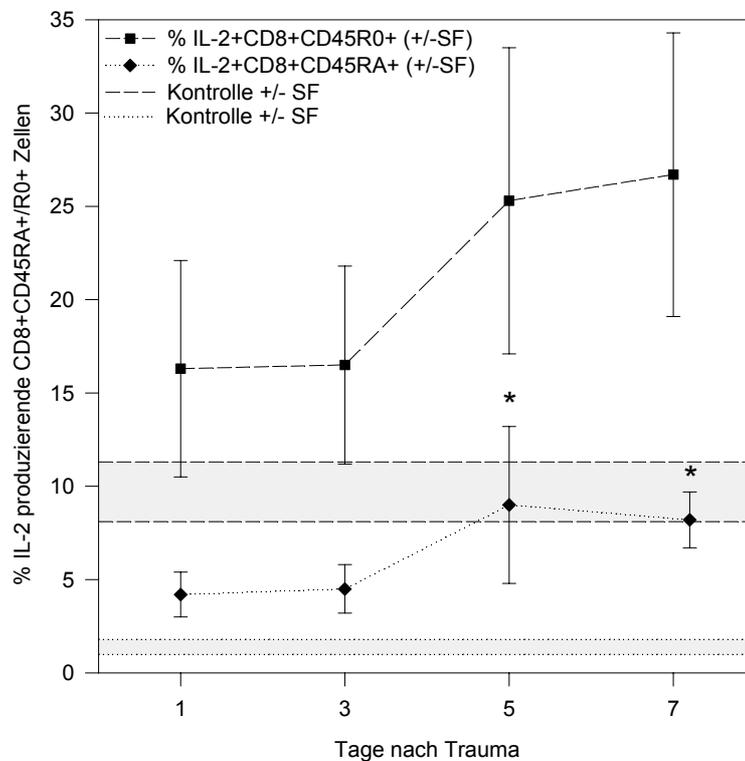


Abb. 45 Verlauf der IL-2 Synthese in CD8+CD45RA+ und in CD8+CD45RO+ Lymphozyten nach Verbrennungsverletzung. *p<0,05 vs. Kontrolle.

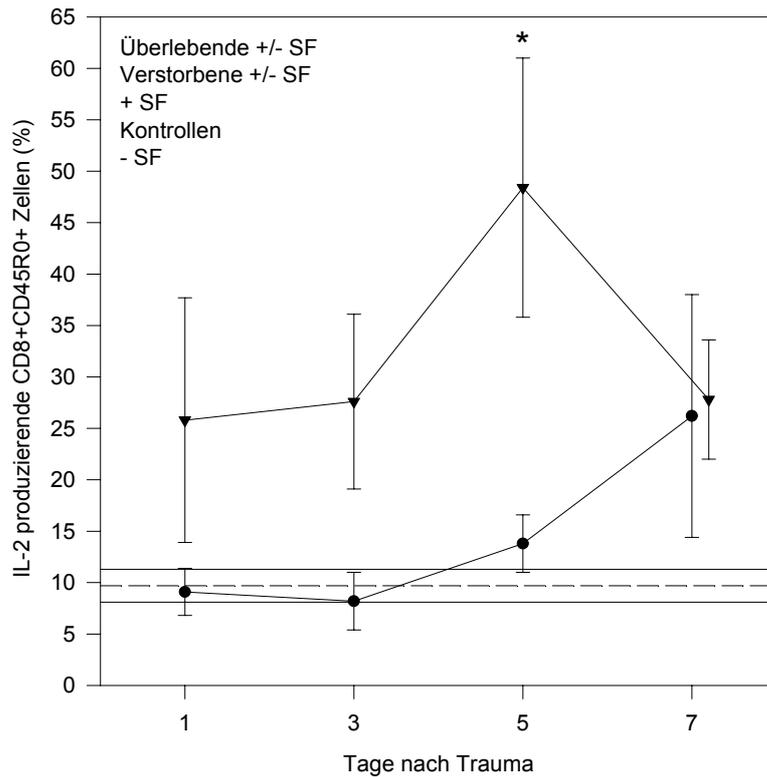


Abb. 46 Differentielle IL-2-Synthese in CD8+CD45RO+ Zellen nach Verbrennungstrauma. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

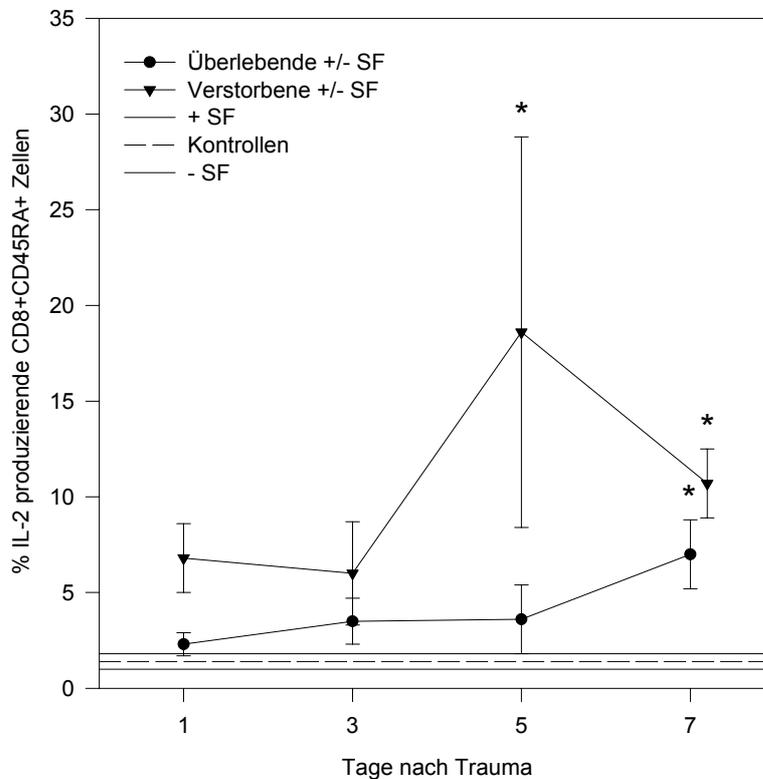


Abb. 47 Differentielle IL-2-Synthese in CD8+CD45RA+ Zellen nach Verbrennungstrauma. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.4.5 Interferon- γ

In den Kulturüberständen Ionomycin und PMA stimulierter PBMC ohne den Zusatz von Monensin wurde nach 48-stündiger Stimulation ein Maximum der IFN- γ Ausschüttung am Tag 1 nach schwerer Verbrennung mit signifikanten 27279 ± 6116 pg/ml gegenüber den Kontrollen mit 12275 ± 1802 pg/ml gemessen. An den konsekutiven Tagen 3, 5 und 7 konnte eine IFN- γ Sekretion gemittelt über alle drei Tage von 17359 ± 1378 pg/ml nachgewiesen werden, was statistisch dem Kontrollniveau entspricht (Abb. 48). Bei differenzierter Betrachtung der Proteinfreisetzung offenbarte sich ein relativ homogenes Bild der Sekretionskurven von verstorbenen und überlebenden Patienten. Einer mäßigen Erhöhung am Tag 1 post Trauma mit 24382 ± 7420 pg/ml (Verstorbene) und 28728 ± 8803 pg/ml (Überlebende) folgten beide weiteren Verläufe in etwa dem Referenzwert ohne jemals statistische Signifikanz zu erlangen (Abb. 49).

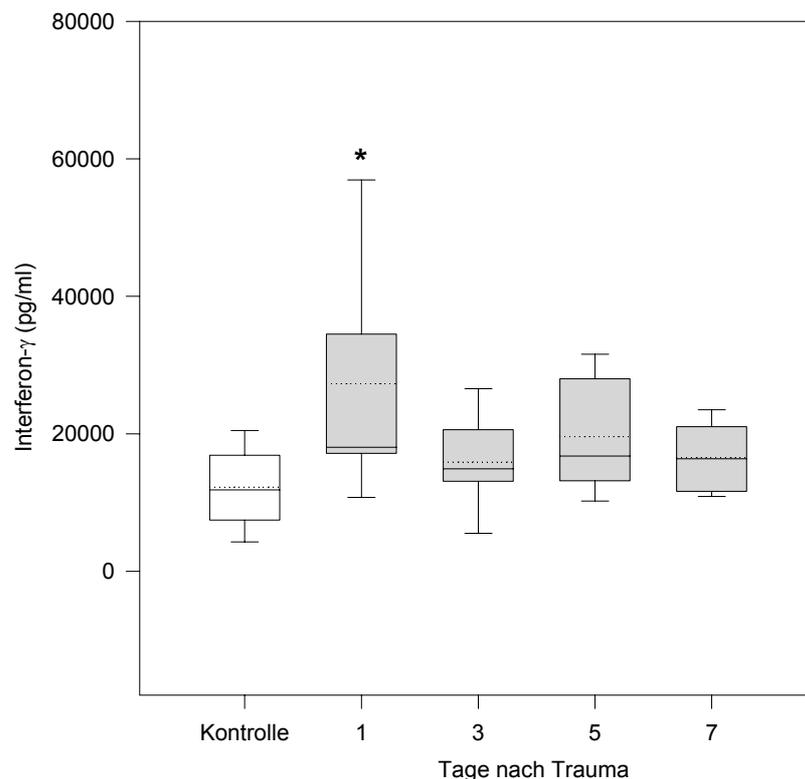


Abb. 48 IFN- γ Freisetzung aus PBMC nach 48-stündiger Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Ionomycin und 5ng/ml PMA. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

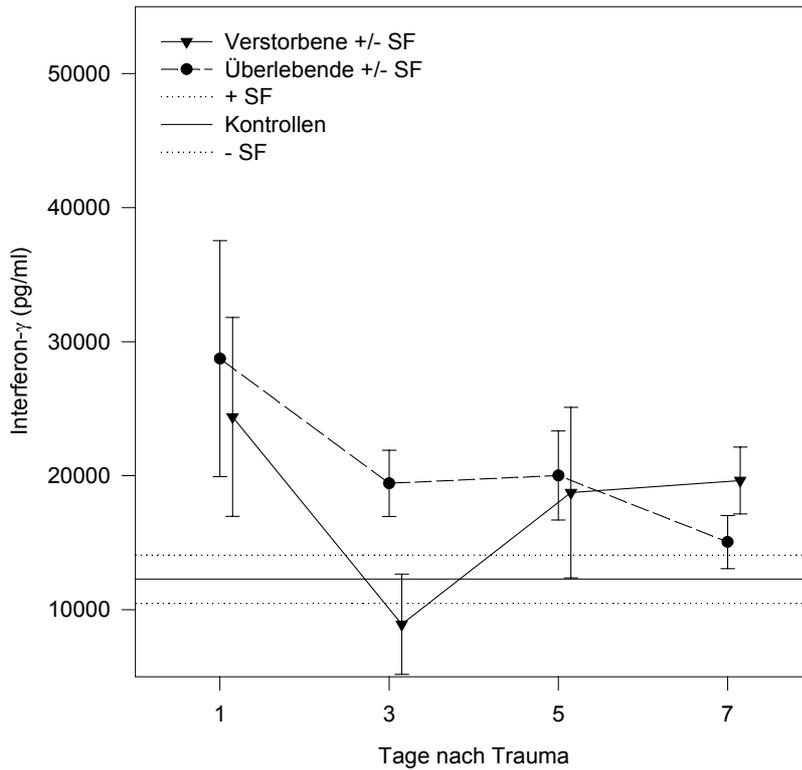


Abb. 49 Differentielle Analyse der IFN- γ Freisetzung aus PBMC nach 48-stündiger Stimulation mit 1 μ M Ionomycin und 5ng/ml PMA. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

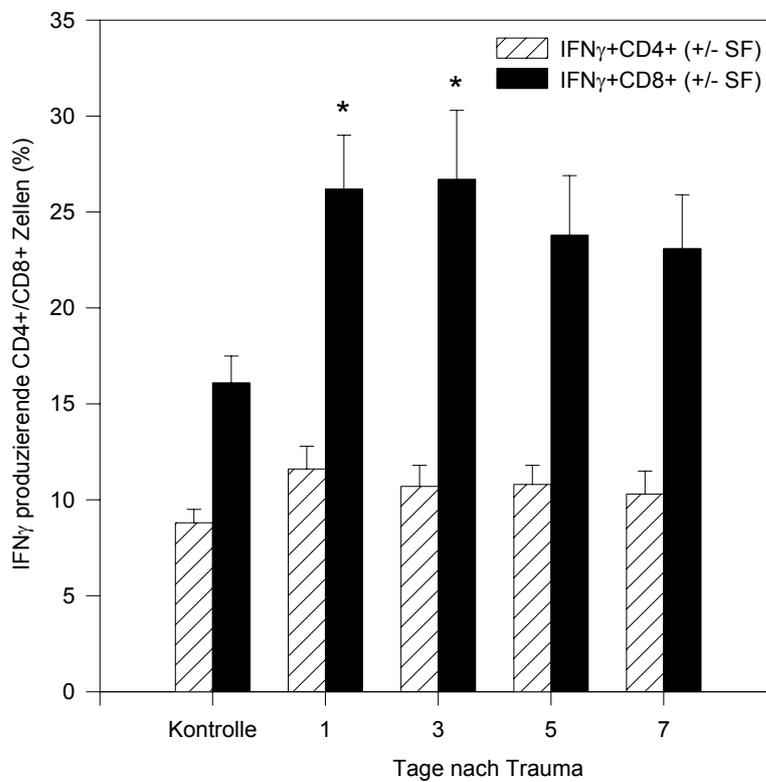


Abb. 50 Kinetik der IFN- γ Synthese von CD4+ und CD8+ PBMC an konsekutiven Tagen nach schwerem Verbrennungstrauma. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Nach Kurzzeitstimulation mit Ionomycin und PMA produziert ein beachtlicher Prozentsatz von CD4+ und CD8+ T-Zellen gesunder Spender IFN- γ . Der Anteil IFN- γ synthetisierender Zellen ist dabei in der CD8+ Subpopulation mit $16,1 \pm 1,4\%$ etwa doppelt so hoch wie in der CD4+ Subpopulation mit $8,8 \pm 0,7\%$ (Abb. 50). Ähnlich den Kontrollen fanden wir auch nach schwerer Verbrennungsverletzung unter den IFN- γ Produzenten mehr CD8+ als CD4+ Zellen. Die IFN- γ Synthese der CD4+ Zellen war am Tag 1 nach Trauma leicht jedoch nicht signifikant erhöht ($11,6 \pm 1,2\%$), um in den drei folgenden konsekutiven Tagen sehr schnell wieder auf Normalwerte zu sinken. Die IFN- γ Antwort des CD8+ Subtyps dagegen war über den gesamten Untersuchungszeitraum gegenüber dem Referenzwert deutlich gesteigert mit signifikanten Spitzenwerten an den Tagen 1 ($26,2 \pm 2,8\%$) und 3 ($26,7 \pm 3,6\%$), gefolgt von $23,8 \pm 3,1\%$ am Tag 5 und $23,1 \pm 2,8\%$ am Tag 7.

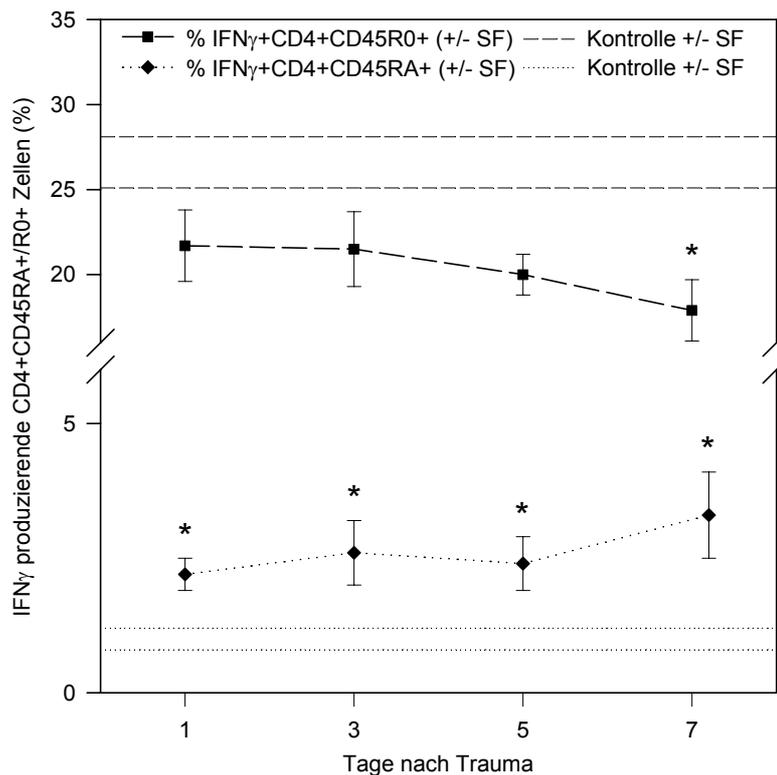


Abb. 51 IFN- γ Syntheseleistung von T-Gedächtniszellen (CD4+CD45RO+) und naiven T-Helferzellen (CD4+CD45RA+) nach Verbrennungstrauma. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

In einem weiteren Untersuchungsschritt differenzierten wir innerhalb der T-Helferzellen (CD4+) die IFN- γ positiven T-Gedächtniszellen (IFN- γ +CD4+CD45RO+) und die naiven T-Zellen (IFN- γ +CD4+CD45RA+). Tendenziell zeigte sich in der ersten Woche nach Verbrennung eine gegenläufige Entwicklung mit sinkendem Anteil IFN- γ positiver T-Gedächtniszellen und steigender Zahl IFN- γ produzierender naiver T-Helferzellen (Abb. 51). Ausgehend von $21,7\pm 2,1\%$ IFN- γ positiver T-Gedächtniszellen am Tag 1 waren am Tag 7 im Vergleich mit gesunden Spendern ($26,6\pm 1,5\%$) nur noch signifikant rückläufige $17,9\pm 1,8\%$ nachweisbar. Bereits am Tag 1 lagen die naiven IFN- γ produzierenden T-Helferzellen mit $2,2\pm 0,3\%$ signifikant über dem Kontrollniveau ($1,0\pm 0,2\%$) und nahmen bis zum Tag 7 auf $3,3\pm 0,8\%$ zu.

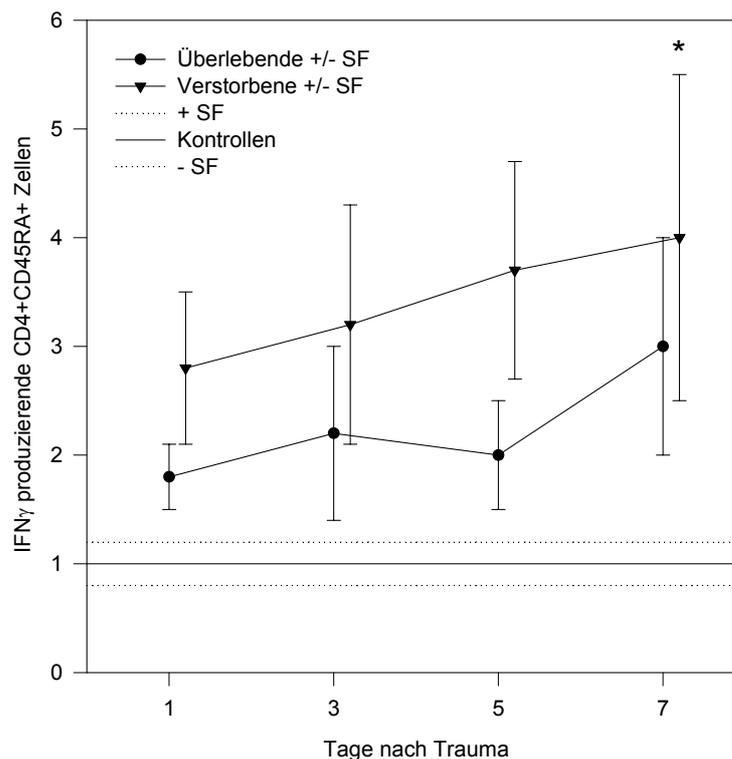


Abb. 52 Differenzierte Darstellung der IFN- γ Synthese von naiven T-Helferzellen (CD4+CD45RA+) nach schwerer Verbrennungsverletzung. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

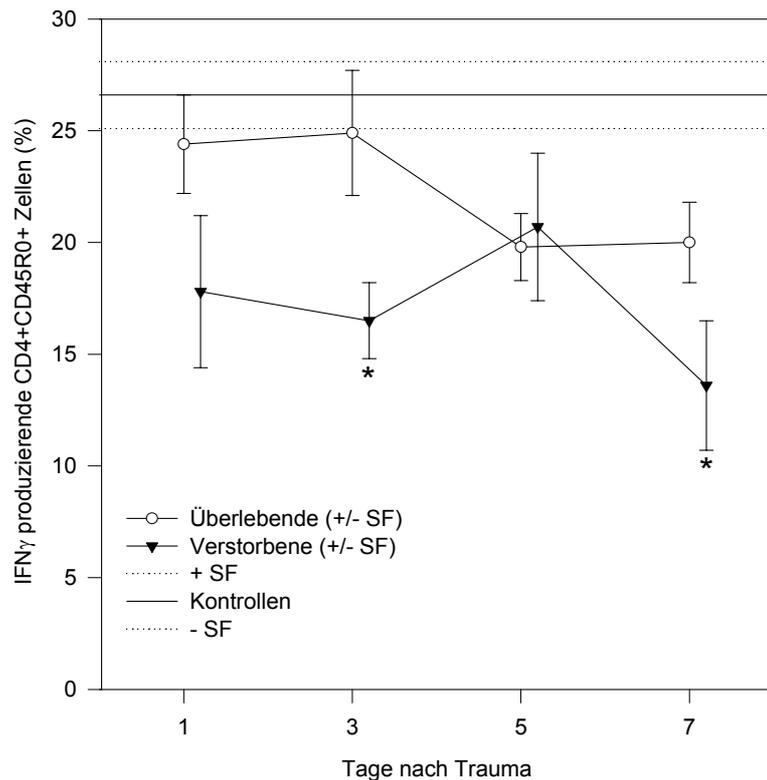


Abb. 53 Differenzierte Darstellung der IFN- γ Synthese von T-Gedächtniszellen (CD4+CD45RO+) nach schwerer Verbrennungsverletzung. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Betrachtet man die IFN- γ Synthese dieser naiven T-Helferzellen getrennt nach klinischem Verlauf, ist zu erkennen, dass beide Kollektive über den Beobachtungszeitraum prozentual kontinuierlich zulegen, die verstorbenen Patienten etwas stärker als die Überlebenden mit einem signifikanten Spitzenwert von $4,0 \pm 1,5\%$ am Tag 7 (Abb. 52). Eine eindeutige Beurteilung der Beteiligung verstorbenen oder überlebender Patienten an der signifikant gesteigerten IFN- γ Produktion der naiven T-Helferzellen (Abb. 51) ist somit nicht möglich. Auch bei den T-Gedächtniszellen partizipieren beide Gruppen am zahlenmäßigen Rückgang IFN- γ positiver Zellen nach Trauma (Abb. 53). Die Syntheserate der überlebenden Patienten wurde am Tag 1 mit $24,4 \pm 2,2\%$ und am Tag 3 mit $24,9 \pm 2,8\%$ im Bereich gesunder Kontrollen ($26,6 \pm 1,5\%$) bestimmt und sank dann bis auf $19,8 \pm 1,5\%$ am Tag 5 und $20,0 \pm 1,8\%$ am Tag 7 ab. Bei den verstorbenen Patienten hatten am Tag 1 lediglich $17,8 \pm 3,4\%$ und am Tag 3 nur noch signifikant reduzierte $16,5 \pm 1,7\%$ der T-Gedächtniszellen die Kapazität zur IFN- γ Synthese, die am Tag 5 kurzfristig auf $20,7 \pm 3,3\%$ anstieg um schließlich bis auf signifikante

13,6±2,9% am Tag 7 abzusinken. Die teilweise signifikante Zunahme der IFN- γ synthesefähigen CD8+ Zellen nach schwerer Verbrennungsverletzung (Abb. 50) veranlasste uns weitere detaillierte Analysen durchzuführen. Abb. 54 veranschaulicht den verglichen mit den Kontrollen bis zu 80% höheren Anteil IFN- γ produzierender CD8+ Zellen in der Gruppe der Überlebenden.

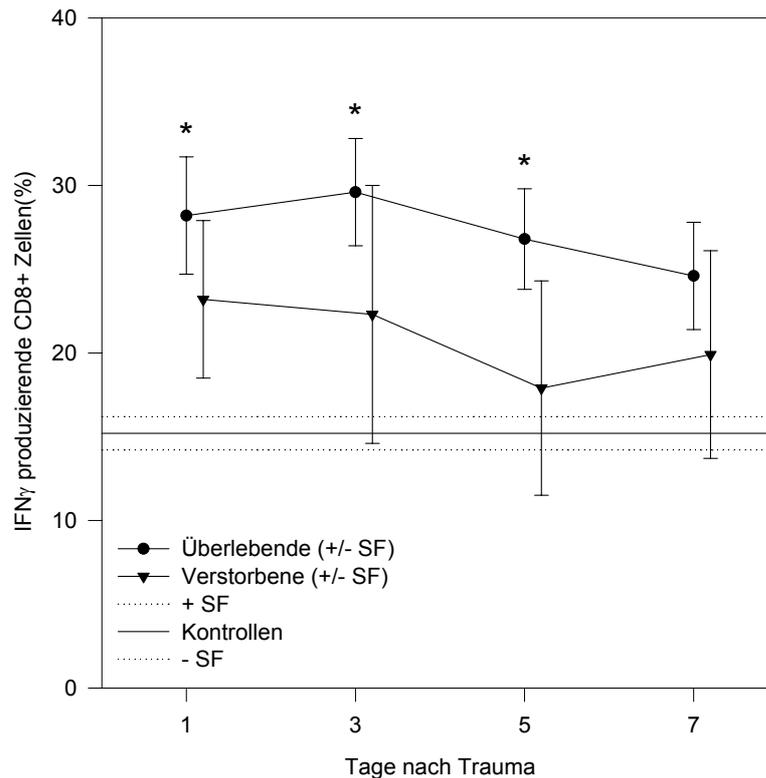


Abb. 54 Differenzierte Darstellung der IFN- γ Synthese von T-Suppressor/zytotoxischen Zellen (CD8+) nach schwerer Verbrennungsverletzung. *p<0,05 vs. Kontrolle.

Die signifikanten Spitzenwerte wurden mit 28,2±3,5% am Tag 1 und 29,6±3,2% am Tag 3 ermittelt, um ab Tag 5 mit 26,8±3,0% auf schließlich 24,6±3,2% am Tag 7 zu sinken. Die Zahl der IFN- γ synthesefähigen CD8+ Zellen in der Gruppe der Verstorbenen bewegte sich an allen Untersuchungstagen im Bereich der Kontrollen (16,1±1,4%).

Die weitere Differenzierung der CD8+ Suppressor/zytotoxischen Zellen in die zwei Subpopulationen mit den Phänotypen CD8+CD45RO+ und CD8+CD45RA+ zeigte, dass im Kontrollkollektiv der CD8+CD45RO+ Subtyp ungefähr die

achtfache IFN- γ Synthesekapazität der CD8+ Zellen mit dem CD45RA+ Phänotyp besitzt (Abb. 55). Bei den Patienten lag nach Verbrennungstrauma die IFN- γ Antwort der CD8+ CD45RO+ Zellen von geringfügigen Schwankungen abgesehen im Bereich des Referenzwertes mit $39,5\pm 3,5\%$. Interessanterweise war die Zahl der IFN- γ produzierenden Zellen des CD8+CD45RA+ Subtyps an allen Studientagen in der ersten Woche nach Trauma konstant und signifikant erhöht. Der kumulative Wert über alle Tage betrug $16,3\pm 1,9\%$, verglichen mit $5,6\pm 0,6\%$ der Kontrollen.

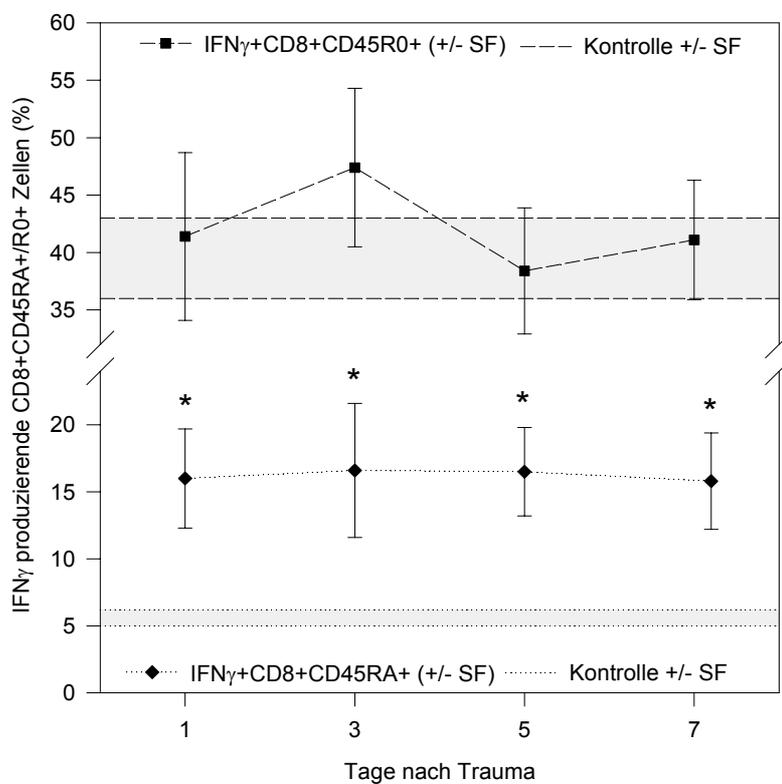


Abb. 55 IFN- γ Syntheseleistung von CD8+CD45RO+ und CD8+CD45RA+ Zellen nach Verbrennungstrauma. *p<0,05 vs. Kontrolle.

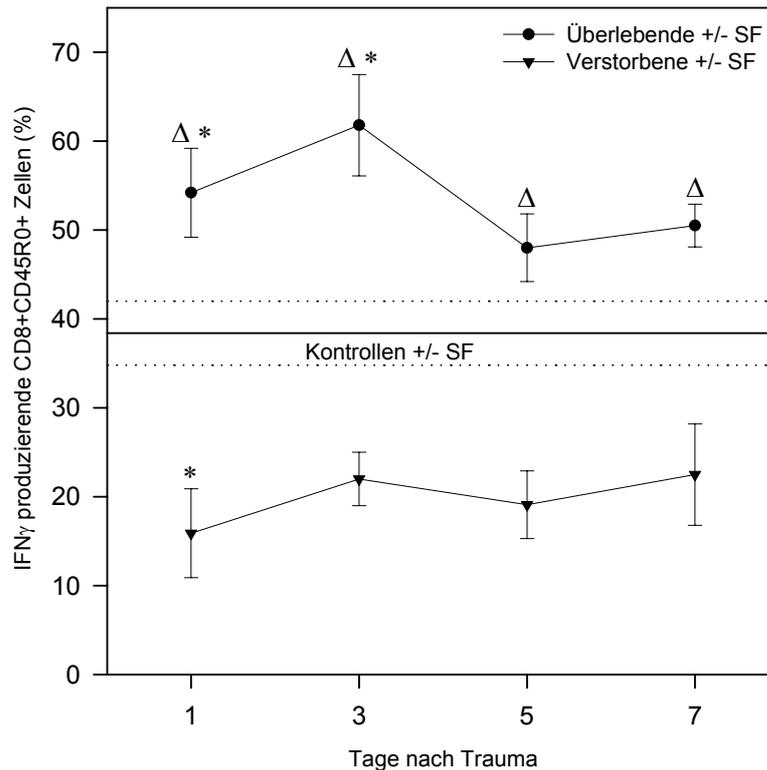


Abb. 56 Differenzierte Darstellung der IFN- γ Synthese von CD8+CD45RO+ Zellen nach Verbrennungstrauma. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $\Delta p < 0,05$ vs. Verstorbene.

Die weitere Unterscheidung in überlebenden und verstorbenen Patienten brachte ein überraschendes Ergebnis. Zeigte sich bei undifferenzierter Betrachtung des CD8+CD45RO+ Subtyps kein Unterschied in der IFN- γ Syntheseleistung zwischen Patienten und Kontrollen (Abb. 55), konnten wir bei verstorbenen Patienten eine signifikante Abnahme IFN- γ produzierender CD8+CD45RO+ Zellen zwischen Tag 1 und 7 post Trauma mit $15,9 \pm 5,0\%$ bis $22,5 \pm 5,7\%$ nachweisen, verglichen mit den überlebenden Patienten deren Werten zwischen $54,2 \pm 4,9\%$ (Tag 1) und $50,5 \pm 2,4\%$ (Tag 7) lagen (Abb. 56). Die IFN- γ Syntheserate der Überlebenden lag zudem an den Tagen 1 und 3 nach Verbrennung signifikant über dem Kontrollwert ($38,4 \pm 3,6\%$). Aus Abb. 55 wissen wir, dass in der ersten Woche nach Trauma eine signifikant höhere Zahl CD8+CD45RA+ Zellen IFN- γ produzieren. Wird dieses Ergebnis getrennt nach Verstorbenen (kumulativ $23,8 \pm 4,4\%$) und

Überlebenden (kumulativ $12,2 \pm 1,2$) analysiert, finden wir eine signifikante Beteiligung beider Patientenkollektive an der gesteigerten IFN- γ Antwort gegenüber den Kontrollen mit $5,6 \pm 0,6\%$ (Abb. 57).

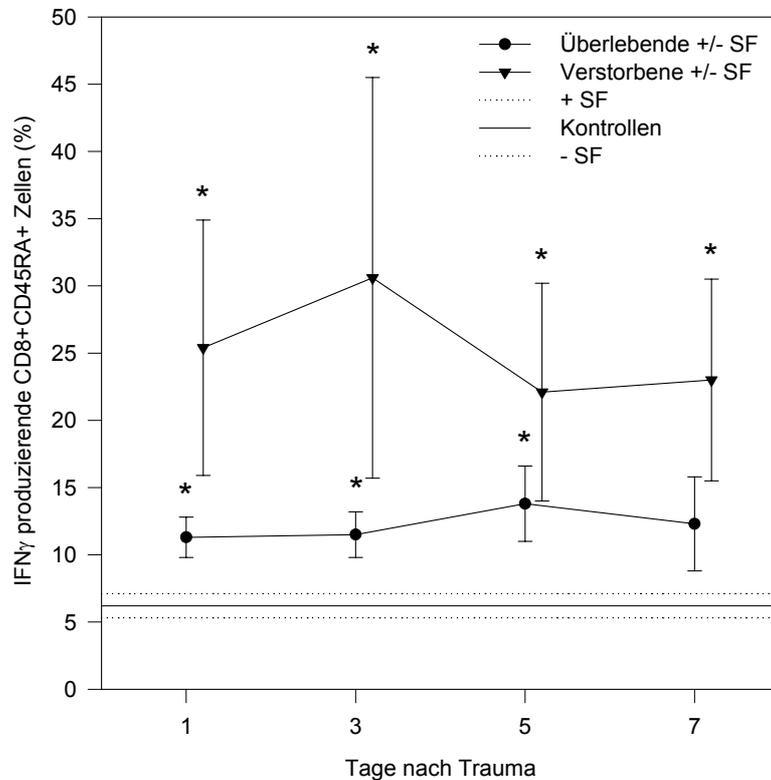


Abb. 57 Differenzierte Darstellung der IFN- γ Synthese von CD8+CD45RA+ Zellen nach schwerer Verbrennungsverletzung. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.4.6 Koexpression von IL-2 und IFN- γ

Die Einzellzellanalyse der IL-2 und IFN- γ de novo Synthese zeigte, dass die beiden Zytokine in der individuellen Zelle nur mit geringer Frequenz koexprimiert werden. Nach Kurzzeitstimulation mit Ionomycin und PMA konnten im Kontrollkollektiv $3,49 \pm 0,33\%$ der CD4+ und $1,06 \pm 0,37\%$ der CD8+ Zellen doppelt positiv für IL-2 und IFN- γ nachgewiesen werden. Auch im Verlauf nach schwerer Verbrennungsverletzung blieb die Häufigkeit IL-2 und IFN- γ koproduzierender Zellen mit kumulativen $3,75 \pm 0,28\%$ der CD4+ Zellen und $1,57 \pm 0,37\%$ der CD8+ Zellen statistisch unverändert auf dem Niveau der Gesundkontrollen (Abb. 58).

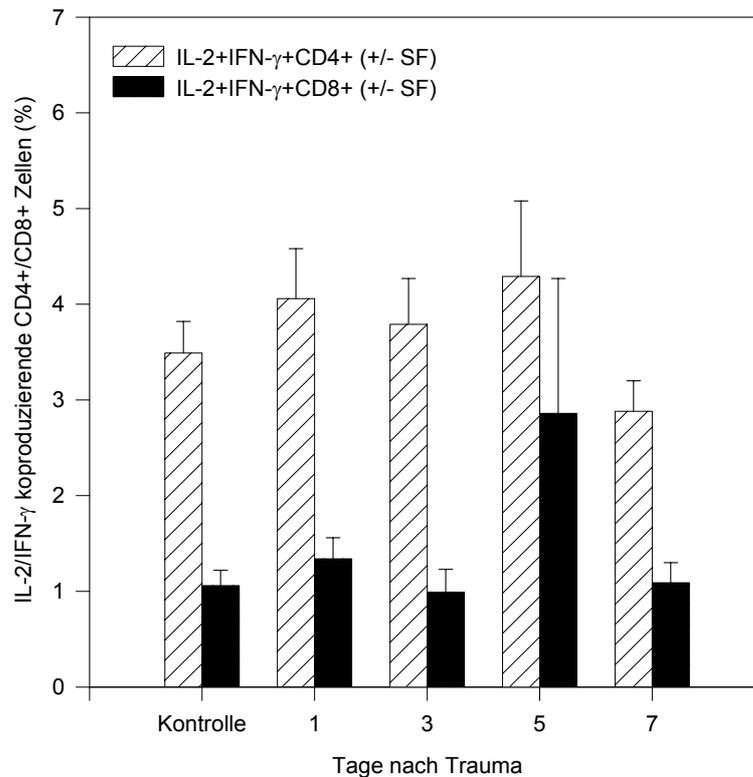


Abb. 58 Frequenz IL-2 und IFN- γ koproduzierender CD4+ und CD8+ Zellen im posttraumatischen Verlauf.

4.4.7 Interleukin-4

Die Ionomycin und PMA induzierte IL-4 Freisetzung war nach 24-stündiger Stimulation in den Überständen von PBMC-Kulturen stark erhöht. Bereits an den Tagen 1 (438 ± 137 pg/ml) und 3 (414 ± 105 pg/ml) nach Verbrennung betrug der IL-4 Gehalt mehr als das Fünffache dessen, was wir bei Kontrollen messen konnten (82 ± 16 pg/ml). Ein weiterer exzessiver Anstieg auf Maximalwerte folgte an den Tagen 5 mit 1456 ± 687 pg/ml und 7 mit 1334 ± 533 pg/ml, so dass die Sekretion am Tag 7 nach Trauma das 3-fache des ersten Tages und sogar das 16-fache des Basiswertes der gesunden Kontrollen erreichte (Abb. 59).

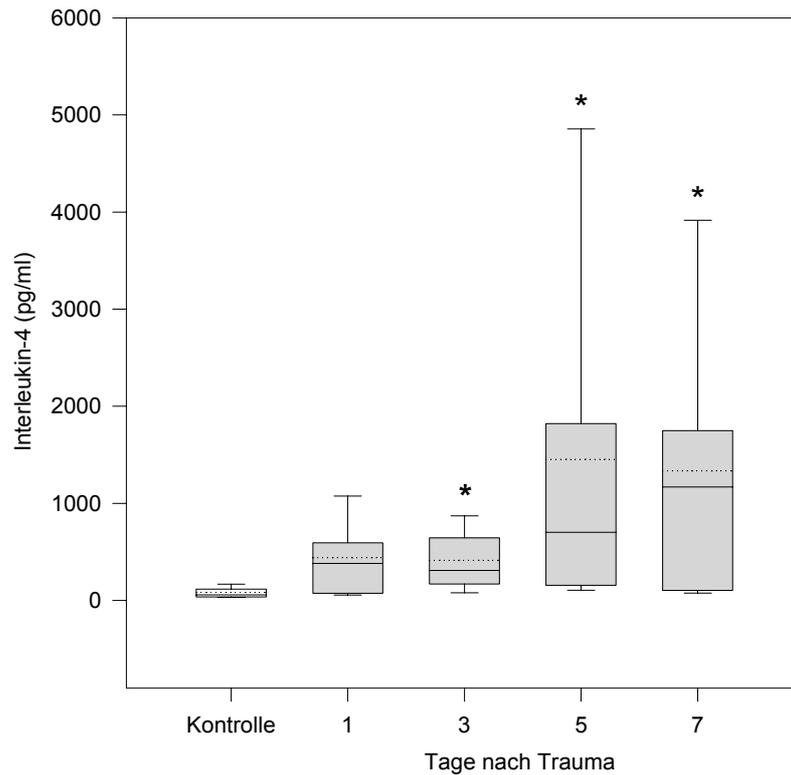


Abb. 59 Posttraumatischer Verlauf der IL-4 Freisetzung von PBMC nach 24-stündiger Stimulation mit 1µM Ionomycin und 5ng/ml PMA. *p<0,05 vs. Kontrolle.

Beide T-Lymphozytensubpopulationen, die T-Helferzellen (CD4+) und die T-Suppressor/zytotoxischen Zellen (CD8+) sind an der de novo Synthese von IL-4 beteiligt. Im Kontrollkollektiv synthetisierten und akkumulierten mit 2,3±0,3% mehr CD4+ Zellen IL-4 als CD8+ Zellen mit 1,5±0,4%. Nach Verbrennungsverletzung ist genau das Gegenteil zutreffend. Der Prozentsatz der IL-4 produzierenden CD4+ Zellen im posttraumatischen Verlauf bewegte sich leicht erhöht auf statistischem Referenzniveau mit einem Spitzenwert von 4,4±1,1% am Tag 5. Der prozentuale Syntheseverlauf der IL-4+CD8+ Zellen übertraf an allen Tagen nach Trauma deutlich die Kapazität der CD4+ Zellen und lag klar über dem der Kontrollen (1,5±0,4%) mit einem signifikanten Höchstwert von 7,2±2,6% am Tag 5 (Abb. 60). Bei differenzierter Betrachtung der T-Helferzellpopulation (CD4+) zeigten die IL-4 Syntheseverläufe beider Kollektive trotz leichter prozentualer Zuwächse keinen wesentlichen Unterschied zu den Kontrollen (2,3±0,3%), wobei in der Gruppe der Verstorbenen mit kumulativen 4,4±0,5% etwas mehr Zellen zur IL-4 de novo

Synthese befähigt waren, als bei den Überlebenden mit über alle Tage gemittelten $3,2\pm 0,6\%$ (Abb. 61).

Innerhalb der CD8+ Suppressor/zytotoxischen Population fanden wir nach getrennter Analyse der beiden Patientengruppen eine positive Korrelation zwischen der IL-4 Synthesekapazität und dem klinischen Ergebnis (Abb. 62).

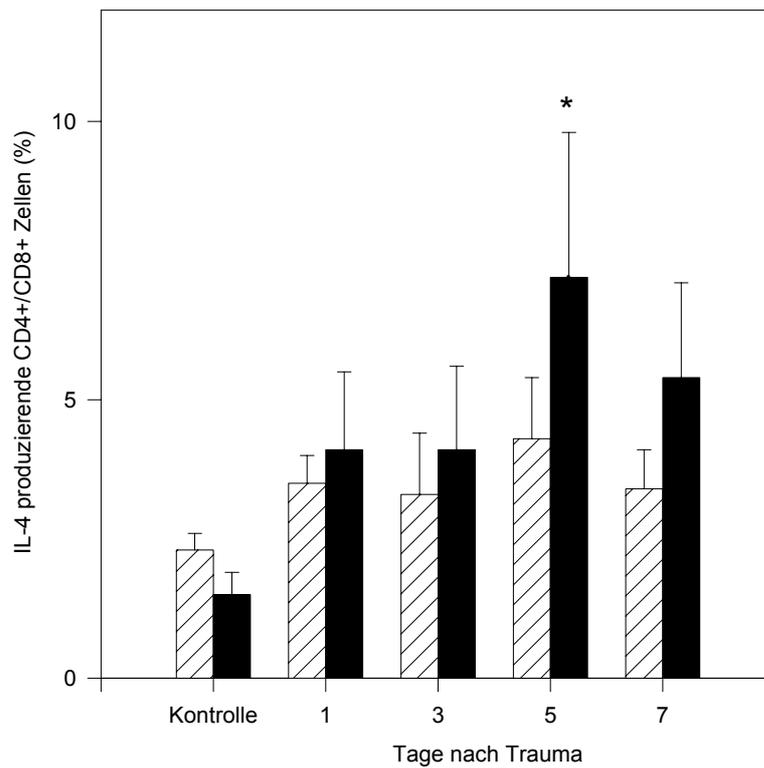


Abb. 60 Kinetik der IL-4 Antwort von CD4+ und CD8+ PBMC an konsekutiven Tagen nach schwerem Verbrennungstrauma. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

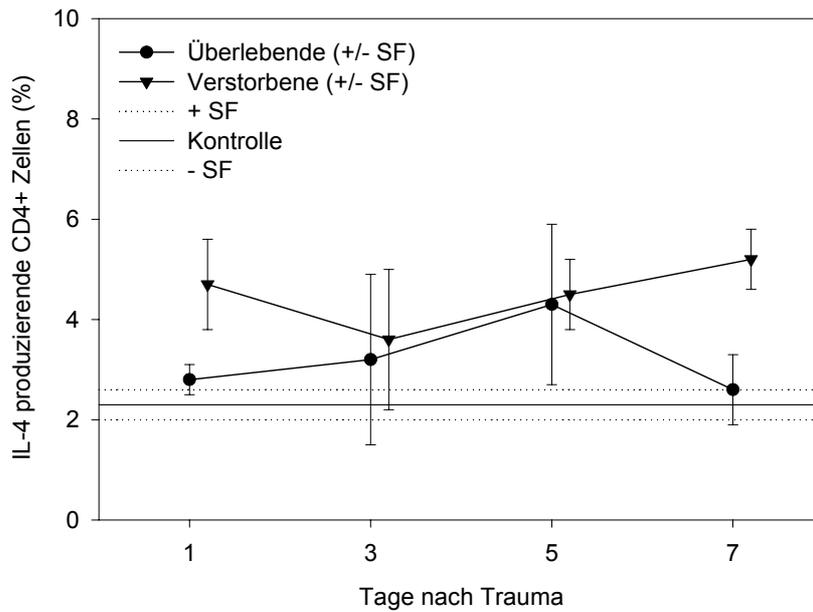


Abb. 61 Differenzierte Darstellung der IL-4 de novo Synthese von CD4+ T-Helferzellen nach schwerer Verbrennungsverletzung.

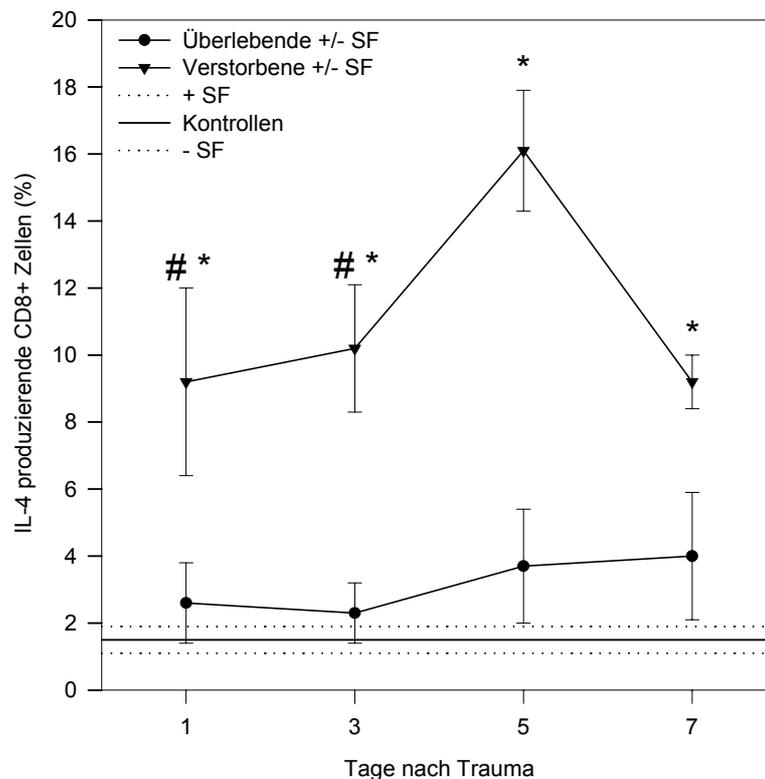


Abb. 62 Differenzierte Darstellung der IL-4 de novo Synthese von CD8+ T-Suppressor/zytotoxische Zellen nach schwerer Verbrennungsverletzung. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. Überlebende.

Die Zahl der IL-4 produzierenden CD8+ Zellen war bei den Verstorbenen während des gesamten Beobachtungszeitraumes signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht und erreichte am Tag 5 post Trauma in qualitativer Übereinstimmung mit dem Ergebnis aller Patienten dieses Tages (Abb. 60) einen Spitzenwert mit $16,1 \pm 1,8\%$. Abb. 62 veranschaulicht bereits an den Tagen 1 ($9,2 \pm 2,8\%$) und 3 ($10,2 \pm 1,9\%$) nach Verbrennung einen doppelt signifikanten Anstieg IL-4 positiver Zellen bei den nicht überlebenden Patienten, sowohl gegenüber dem Kontrollwert ($1,8 \pm 0,3\%$), als auch im Vergleich mit den überlebenden Patienten ($2,6 \pm 1,2\%$ [Tag 1] und $2,3 \pm 0,9\%$ [Tag 3]). Nach dem Maximum der Proteinsynthese am Tag 5 fiel sie bei den Verstorbenen bis zum Tag 7 auf immer noch signifikante $9,2 \pm 1,1\%$ gegenüber den Kontrollen ab. Die IL-4 Syntheserate der CD8+ Zellen überlebender Patienten war während der ersten Woche nach Trauma, obwohl mit kumulativen $3,1 \pm 0,7\%$ leicht gesteigert, statistisch nicht von der Kontrollgruppe ($1,8 \pm 0,3\%$) zu unterscheiden.

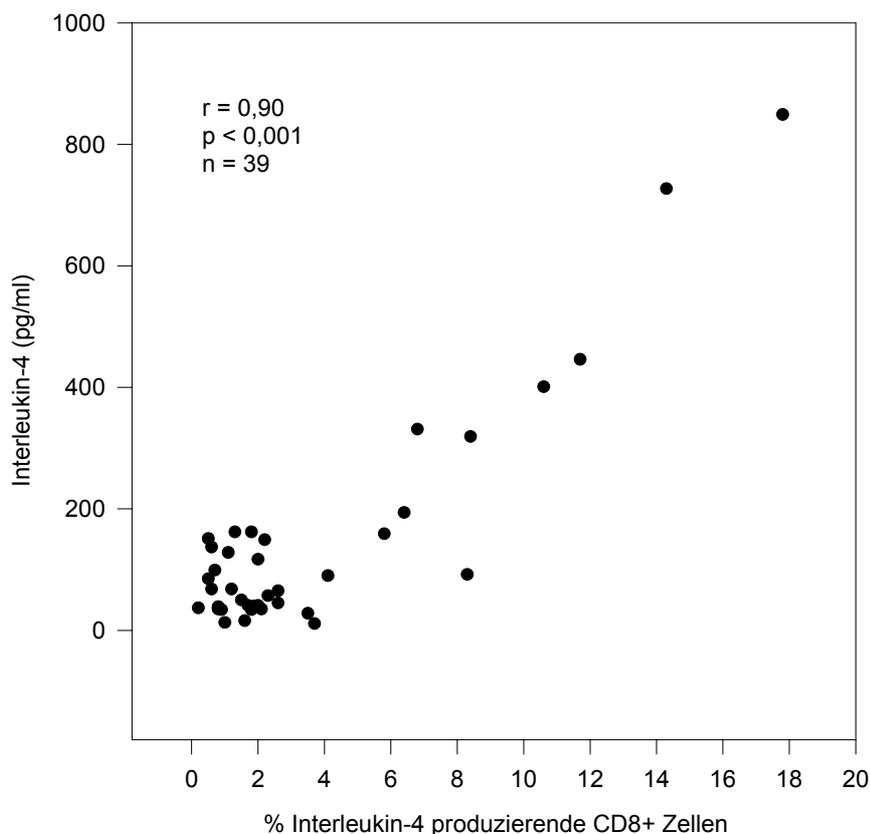


Abb. 63 Korrelation des prozentualen Anteils IL-4 produzierender CD8+ Zellen mit dem aus PBMC freigesetzten IL-4 in den Kulturüberständen. ($r=0,90$, $p<0,001$; Pearson Test).

Die durchflusszytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils IL-4 synthese-fähiger Zellen innerhalb der CD8+ Suppressor/zytotoxischen Population und der mittels ELISA-Technik quantitativen Bestimmung von IL-4 in den Kulturüberständen nach 24-stündiger Stimulation mit Ionomycin und PMA, ergab eine signifikante qualitative Korrelation ($r=0,90$), wenn Patienten und Kontrollen als eine Gruppe analysiert wurden (Abb. 63).

4.4.8 Interleukin-10

Die Verlaufskurven der IL-10- (Abb. 64) und der IL-2-Sekretion (Abb. 41) zeigen eine auffallend qualitative Ähnlichkeit. In den Kulturüberständen PMA und Ionomycin stimulierter PBMC konnte nach 48-stündiger Inkubationszeit ohne Monensinzugabe an den Tagen 1 und 3 nach Verbrennung eine zunächst auf Kontrollebene (10580 ± 1612 pg/ml) verlaufende IL-10 Sekretion festgestellt werden. An den posttraumatischen Tagen 5 (63163 ± 5892 pg/ml) und 7 (36527 ± 4488 pg/ml) fanden wir gegenüber den Kontrollen eine signifikant erhöhte IL-10-Freisetzung innerhalb des verstorbenen Patientenkollektivs, wogegen die IL-10-Synthese der überlebenden Patienten mit über alle Tage post Trauma gemittelten 16403 ± 1864 pg/ml zwar leicht erhöht, aber dennoch statistisch auf Kontrollniveau lag (Abb. 64).

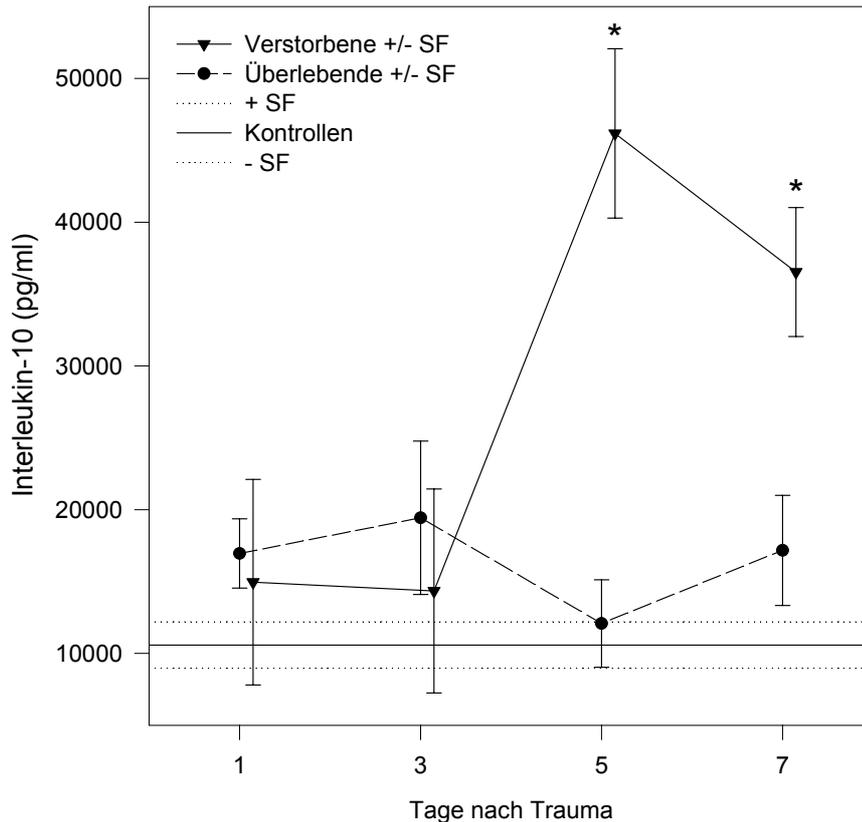


Abb. 64 Die PBMC verstorbener und überlebender Patienten zeigten eine signifikant unterschiedliche IL-10-Synthesekapazität gegenüber der Kontrollgruppe nach 48-stündiger Stimulation mit 1µM Ionomycin und 5 ng/ml PMA. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Die beiden getesteten biotinylierten anti-human IL-10 mAk B-N10 (Maus) und JES3-19F1 (Ratte) lieferten in der intrazellulären Anfärbung nach 12 bzw. 24-stündiger Stimulation mit Ionomycin und PMA, unter Monensinzugabe über die jeweils letzten 5 Stunden unbefriedigende, uneinheitliche und z. T. widersprüchliche Ergebnisse und konnten deswegen im Studienprotokoll nicht berücksichtigt werden. Aus genannten Gründen wurde an dieser Stelle auch auf die grafische Darstellung der Daten verzichtet.

5 DISKUSSION

Nach schwerem Trauma sind Infektion und Sepsis hauptsächlich für die hohe Morbidität und Mortalität der Patienten verantwortlich. Dabei handelt es sich um ein interessantes Paradox, zumal das hoch aktivierte Immunsystem teilweise für die Entstehung eines Sepsissyndroms verantwortlich ist, während derselbe Patient eine hohe Empfänglichkeit für Infektionen zeigt. Die Sepsis ist trotz verbesserter Versorgung die häufigste Todesursache unter Patienten, die eine initiale Verbrennungsverletzung überlebt haben (Baker 1979). Derartige septische Komplikationen werden einer signifikanten Immunsuppression zugeschrieben, wie sie nach schwerer Verletzung beobachtet wird. Die supprimierten humoralen und zellvermittelten Immunantworten betreffen die Funktion von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und von Neutrophilen. In vorliegender Studie wurden deshalb mögliche Alterationen der Expression von Oberflächenantigenen bei schwerverbrannten Patienten in der ersten Woche nach Verletzung und einem gesunden Kontrollkollektiv vergleichend untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse der mononukleären Blutfraktionen von Patienten nach schwerer Verbrennungsverletzung ergab einerseits Veränderungen in der prozentualen Verteilung von Lymphozyten(sub)populationen und der Expressionsdichte verschiedener Oberflächenrezeptoren, andererseits lagen Dichteverteilung und Prozentanteil meistens im Bereich der Referenzwerte gesunder Kontrollen, so dass die klinische Relevanz fraglich sein dürfte. Die physikalisch-immunologische Dreizelldifferenzierung der mononukleären Leukozyten ergab im Patientenkollektiv eine relative Lymphopenie, die bei leicht steigendem Monozytenanteil eine relative Granulozytose zur Folge hatte. Diese relative Verschiebung der Leukozytenanteile nach Trauma ist offensichtlich methodisch bedingt durch den erhöhten Anteil unreifer Granulozyten in der Zirkulation, die veränderte Dichteeigenschaften aufweisen und bei der Dichtegradientenzentrifugation zusammen mit den mononukleären Zellen im Interphasering angereichert werden. Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass beim Brandverletzten eine Verschiebung im Verhältnis zirkulierender NK-, B- und T-Zellen gegenüber Normalspendern zu finden ist. NK-Zellen sind lymphoide nicht-B- und nicht-T-Zellen, die keine bekannten antigenspezifischen Rezeptoren tragen, aber eine bedeutende Rolle in der Abwehr gegen virusinfizierte und transformierte maligne Zellen spielen. Möglicherweise

handelt es sich um evolutive Vorläufer zytotoxischer T-Zellen. Obwohl der Mechanismus wie diese Zellen ohne einen klonal verbreiteten Rezeptor ihre Zielzellen erkennen nicht komplett verstanden ist, töten zytokinaktivierte NK-Zellen anscheinend selektiv Zielzellen, die MHC-Klasse I-Moleküle in niedriger Dichte auf ihrer Oberfläche tragen (Malnati 1995). NK-Zellen können auch infizierte Zellen, die an Antikörper gebunden sind abtöten, ein Phänomen, das unter antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC) bekannt ist und vermutlich über den Fc γ RIII-Rezeptor (CD16) auf NK-Zellen vermittelt wird (Lanier 1988). Wir konnten innerhalb der ersten 7 Tage nach schwerer Verbrennungsverletzung eine kontinuierliche prozentuale Abnahme CD16- und CD56-positiver NK-Zellen verzeichnen, die ab dem 5. Tag post Trauma statistische Signifikanz erreichte. Nach schwerem thermischem Trauma ist von Blazar et al. (Blazar 1986) eine signifikant supprimierte NK-Zellaktivität beschrieben worden, die zumindest teilweise für die abnehmende Zahl von NK-Zellen verantwortlich sein könnte. Da NK-Zellen über Zytokine, die sie selbst nach Stimulation sezernieren (Leite-de-Moraes 1997), auch immunregulatorisch von Bedeutung sind, dürften sowohl eine supprimierte Funktion, als auch eine zahlenmäßige Reduktion ihren Anteil an der Immundefizienz haben, die Patienten für septische Komplikationen empfänglich macht. Die Epitopdichte des α -Integrins CD11b, einem Polypeptid, das in Adhäsionsprozesse involviert (Gahmberg 1997) und mit der zytolytischen Aktivität der NK-Zellen assoziiert ist (Kohl 1986), war trotz tendenzieller Abnahme auf der Oberfläche von NK-Zellen statistisch nicht signifikant verändert.

Der prozentuale Anteil von Zellen die CD19, ein Lymphozytenantigen exprimieren, das auf allen normalen und Prä-B-Zellen vorkommt, nahm in der ersten Woche nach Verbrennung stark zu. Allerdings lässt dieser isolierte Befund keine Rückschlüsse auf den Aktivierungsgrad, eine supprimierte Proliferationsleistung oder eine veränderte Immunglobulinproduktion zu, wie sie trotz stagnierender oder auch steigender Zahlen antigenspezifischer B-Zellen im schwerverbrannten Patienten nachgewiesen wurden (Schluter 1991; Molloy 1994). Vielmehr könnten die Verschiebungen im Verhältnis zwischen B- und T-Zellen das Resultat einer verstärkten Prostaglandin E₂- (PGE₂) Aktivität nach Trauma sein (Faist 1987). Dieser aus Monozyten stammende Metabolit des Arachidonsäurestoffwechsels zeigt immuninhibitorische Effekte auf die zellvermittelte Immunität und induziert als

wichtiger kostimulatorischer Faktor einer T_H2 -gerichteten Immunantwort verminderte IL-2- und IFN- γ -Aktivitäten (Faist 1996). Andererseits beeinflussen T_H2 -Lymphozyten über IL-4 prinzipiell die Differenzierung und Antikörperproduktion der B-Zellen, wobei die IL-4-Synthese von T_H2 -Lymphozyten durch PGE₂ nicht beeinflusst wird (Roper 1990; Snijdwint 1993).

Der relative Anteil von T-Lymphozyten (CD3+) in den PBMC-Fractionen an konsekutiven Tagen nach Verbrennungsverletzung war tendenziell, nicht jedoch signifikant, rückläufig. Eine absolute Lymphopenie der CD3+ T-Lymphozyten, wie sie in verschiedenen Studien beschrieben wurde (O'Mahony 1985; Gadd 1989), konnten wir zwar nicht ausschließen, aber aufgrund der methodisch eingeschränkten Aussage auch nicht bestätigen (Analysefenster auf der Lymphozytenpopulation). Bei der Ermittlung des Quotienten von CD4+ zu CD8+ Lymphozyten wurde der prozentuale Anteil der CD8+ NK-Zellen (CD16+CD8+) nicht berücksichtigt. Wir konnten keine signifikante Abnahme von Helfer-/Inducer-T-Zellen, also CD4+-Zellen, gegenüber den Suppressor-/zytotoxischen T-Zellen, also CD8+-Zellen, feststellen, die als typische Verschiebung der Zusammensetzung von peripheren T-Lymphozytenpopulationen bei Brandverletzten beschrieben wurde und den immunsupprimierten Status dieser Patienten dokumentieren sollte (Schluter, König et al. 1991). Andererseits berichteten Antonacci et al. (Antonacci 1984) einen Anstieg des CD4/CD8-Verhältnisses bei überlebenden Patienten mit drittgradigen Verbrennungen. Mit Einbeziehung aller CD8+ Zellen in die Berechnung dieser Ratio ergibt sich auch bei der Auswertung unserer Daten eine relative Zunahme der Helfer-/Inducer-T-Zellen, da die NK-Zellen (z. T. CD8+) im posttraumatischen Verlauf prozentual signifikant abnehmen. Aufgrund uneinheitlicher Ergebnisse in der Literatur bleibt eine verletzungsassoziierte Änderung des CD4+/CD8+ - Verhältnisses gegenwärtig umstritten. Bisher konnte zwischen dem Verhältnis von CD4+/CD8+-Zellen und dem Auftreten septischer Komplikationen keine Korrelation nachgewiesen werden (Ertel and Faist 1993). Außerdem ist unklar, ob im Kontext einer Infektion eine alterierte Ratio die Ursache oder das Ergebnis ist. Feeney et al. (Feeney 1995) berichteten über eine reduzierte Zahl CD4+ und CD8+ Zellen bei intensivpflichtigen Patienten, die allerdings keinen prädiktiven Wert hinsichtlich der Sterblichkeit hatte und auch nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierte. Diese offensichtliche Diskrepanz der zahlenmäßigen Veränderung

bestimmter Phänotypen nach Verbrennungstrauma zwischen den verschiedenen Studien kann unterschiedliche Gründe haben. Einerseits werden häufiger Prozentsätze positiver Zellen, als deren absolute Zahl zur Analyse herangezogen, andererseits liefern Zellpräparationsmethoden, wie Vollblutansatz oder separierte Zellen (Ashmore 1989), sowie manuelle oder automatische Zählmethoden inklusive diverser Selektionsstrategien differente Resultate. Ein Vergleich der Studienergebnisse dürfte somit in vielen Fällen nur bedingt möglich sein.

Der T-Zellrezeptor (TCR) α/β stellt den prinzipiellen Marker aller CD3+ Lymphozyten im peripheren Blut dar und konnte in vorliegender Studie, bei Kontrollen und Patienten, auf rund 93% aller T-Zellen nachgewiesen werden. Die Expressionsdichte dieses quantitativ dominierenden Antigenrezeptors auf T-Lymphozyten war an den Tagen 5 und 7 post Trauma bei steigender Tendenz deutlich aber nicht signifikant erhöht. Das könnte für eine primäre Aktivierung der T-Zellen über den TCR sprechen, wobei die Signalwege des Ca^{2+} -Einstroms und der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) in Gang gesetzt werden, die wiederum die Kinasierung der DNA-Bindungsfaktoren und Initiierung der Gentranskription zur Folge haben. Während die PKC-Aktivierung oder der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} alleine für die IL-2R-Expression (CD25) ausreichend sein dürften, sind für die IL-2 Produktion und Proliferation beide Signale erforderlich (Isakov 1987).

Die Befunde einer supprimierten Lymphozytenproliferation auf mitogene Stimulation nach Schock (Stephan 1986), Trauma (Faist, Kupper et al. 1986) und Verbrennung (Wood 1984) deuten auf eine gestörte Aktivierung von T-Zellen auch beim Schwerbranntverletzten hin. Deshalb untersuchten wir die Expression des Lymphozytenaktivierungsantigens CD25. CD25 ist vornehmlich ein Marker für aktivierte T-Zellen und Bestandteil des Rezeptors für Interleukin-2. Wir fanden eine deutliche Steigerung der spontanen CD25-Expression auf T-Lymphozyten nach Verbrennung, was per se für eine in vivo Aktivierung spricht, die aber mit einer defizienten IL-2 Biosynthese korreliert ist (Faist 1993). Mittlerweile ist bekannt, dass es sich bei den vermehrt exprimierten CD25-Komponenten, aufgrund offensichtlicher Entkoppelungen im Signaltransduktionssystem um nicht-funktionelle IL-2-Rezeptoren handelt (Schluter, König et al. 1991).

Die alleinige Bindung von TCR-Peptid-MHC ist jedoch nicht ausreichend für eine Stimulation der T-Zelle und die Zytokinproduktion (hauptsächlich IL-2). Erst die

Anwesenheit eines kostimulatorischen Signals kann die Zelle aus ihrem anergen Stadium in ein aktiviertes überführen und, unter anderem, die Zytokinsynthese einleiten (Weiss 1987). Ein sehr potentes derartiges Signal wird über CD28 auf T-Zellen vermittelt. CD28 hat als Liganden CD80 (B7-1/BB1) und CD86 (B7-2) auf APC, einschließlich aktivierter B-Zellen, aktivierter Makrophagen und dendritischer Zellen und kann Signaltransduktionsereignisse induzieren, die deutlich verschieden sind von denen, die über den TCR vermittelt werden (June 1990; Van Lier 1991). Der inhibitorische Gegenspieler von CD28 ist CTLA-4 (CD152), der die gleichen Liganden bindet, so dass die T-Zellaktivierung über CD28 und CTLA-4 feinmoduliert werden kann. Nach Verbrennungsverletzung stieg die Zahl der CD28-Moleküle auf der Oberfläche von CD4+ und CD8+ T-Zellen z.T. signifikant gegenüber den Kontrollen an. Das kostimulatorische Signal über CD80/CD28 ist notwendig, um die IL-2 Produktion in antigenstimulierten, naiven T-Zellen durch Stabilisierung der IL-2 mRNA zu fördern (June 1989). Antigenerkennung in Abwesenheit eines kostimulatorischen Signals inaktiviert naive T-Zellen; sie werden anergisch, d.h. sie können kein IL-2 produzieren (June 1987). Nach ausgedehnter Traumatisierung des Organismus kann ein verlängerter Zustand der Anergie als wichtiger Indikator für möglicherweise auftretende infektiöse Komplikationen gewertet werden (Christou 1983). Auch beeinflussen kostimulatorische Signale während der T-Zellaktivierung die Differenzierung zu T_H1- oder T_H2-Zellen. Der gängigen Theorie zufolge entscheidet die Stärke des über CD28 vermittelten Signals sowohl über das Überleben als auch über die Ausrichtung der Differenzierung einer T-Zelle, und zwar mit höherer Signalstärke in Richtung auf die T_H2-Entwicklung (Sperling 1996).

Von besonderem Interesse ist der Befund, dass aktivierte T-Zellen das Adhäsionsmolekül B7 (CD80) exprimieren, dessen Liganden CD28 und CTLA-4 auf T-Zellen sind und damit eine wichtige kostimulatorische Funktion für ruhende T-(Gedächtnis-)zellen ausüben. Auf CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten nahm der prozentuale Anteil von CD80+ T-Lymphozyten in der ersten Woche nach Verbrennungstrauma kontinuierlich, nicht aber signifikant, zu, wobei die Expressionsstärke weitgehend unverändert blieb. CD80 wird vornehmlich von aktivierten T-Zellen exprimiert, die Gewebe infiltrieren, nicht aber von T-Zellen in der Zirkulation (Barnaba 1994). Damit können aktivierte T-Zellen als APCs für MHC-Klasse II restringierte T-Zellen dienen. Allerdings ist die Funktion von

solchen T-APCs anscheinend eine „negative“, die, vermutlich über Zell-Zell-Interaktionen, Anergie kürzlich aktivierter T-Zellen oder Zytotoxizität induziert. Die Fähigkeit von T-Zellen als „negative“ APCs zu fungieren dürfte zur Homöostase des Immunsystems beitragen (Pichler 1994).

Wir konnten weitere deutliche Veränderungen der Oberflächeneigenschaften von T-Lymphozyten nach schwerer Verbrennungsverletzung nachweisen, die hauptsächlich Adhäsionsmoleküle und andere akzessorische Moleküle der T-Zellaktivierung betreffen.

Das Adhäsionsmolekül CD2 (LFA-2), auf nahezu 100% der T-Zellen in Kontrollen und Patienten nachweisbar, wurde nach Verbrennungsverletzung verstärkt exprimiert. Mit seinem natürlichen Hauptliganden CD58 (LFA-3) ist das CD2-Molekül physisch und funktional dem TCR assoziiert und abhängig vom Bindungsmodus können entweder stimulatorische oder inhibitorische Signale an T-Zellen übermittelt werden. Außerdem wird CD2 im Gegensatz zu CD28 und anderen kostimulatorischen T-Zellmolekülen, deren Signale die noch nicht induzierte Anergie verhindern können, die anscheinend einzigartige Fähigkeit zugeschrieben, den bereits eingetretenen Zustand der Anergie umzukehren (Bell 1995). Die CD2–Ligandeninteraktion ermöglicht den T Zellen gegenüber niedrigeren Antigenkonzentrationen zu reagieren, möglicherweise über eine Optimierung der T-Zell-/APC- bzw. Zielzeldistanz zur Verarbeitung des Peptid-MHC-Komplexes. Damit trägt CD2 über quantitative Schwellenwerte zu einer Feinabstimmung der T-Zellaktivierung in vitro und in vivo bei (Bachmann 1999).

Der Anteil CD7+ T-Lymphozyten lag bei gesunden Kontrollen und schwerverbrannten Patienten relativ unverändert zwischen 85% und 92%. Die Expressionsstärke dieses einzelkettigen Moleküls aus der Ig-Superfamilie nahm jedoch posttraumatisch kontinuierlich und signifikant zu. Eine Reihe von Arbeiten haben gezeigt, dass CD7, dessen Ligand bis heute nicht identifiziert ist, ein starkes komitogenes Signal für T-Zellen liefert und sowohl die IL-2R α -Expression (Carrera 1988; Jung 1992), als auch die Produktion von IL-2, TNF α , TNF β und GM-CSF induziert (Carrel 1991). Lazarovits et al. vermuteten, dass CD7 als oligomerer Komplex mit CD3/TCR, der Protein Tyrosinphosphatase CD45, und einer Tyrosinkinase vorliegt und damit eine physische Basis für die akzessorische Rolle des CD7 Moleküls bei der T-Zellaktivierung liefert (Lazarovits 1994).

Ruhende (naive) T-Zellen exprimieren CD45RA, während aktivierte T-Zellen die Isoform der tyrosinspezifischen Phosphatase CD45 mit dem niedrigsten Molekulargewicht, nämlich CD45RO exprimieren, die durch alternatives Spleißen des RNA-Transkripts entsteht (Streuli 1987). Liganden von CD45 sind bis auf CD22, einem B-Zell-Adhäsionsmolekül das an CD45RO bindet, noch nicht identifiziert (Stamenkovic 1991) und verschiedene Isoformen von CD45 sind anscheinend mit CD3, CD2 CD4 oder CD8 auf derselben Zelle assoziiert (Dianzani 1992). Die Aktivierung von T-Lymphozyten ist mit markanten Veränderungen im Expressionsmuster dieser CD45 Isoformen verknüpft. Die Induktion der CD45RO Isoform und der Verlust von CD45RA sind hierbei besonders auffällig (Merkenschlager 1988). Mit der Frage, inwieweit diese Veränderungen auch bei traumatisierten Patienten auftreten, untersuchten wir Lymphozyten von Patienten im Verlauf nach schwerer Verbrennungsverletzung. Der Anteil von CD45RA+Zellen innerhalb der CD4+ Subpopulation war deutlich niedriger, als bei den Kontrollen und dementsprechend der Anteil von CD45RO+ Zellen, der reziproken Verteilung folgend, deutlich höher. Allerdings erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz. Die Bezeichnungen „naive“ T-Zellen für CD4+CD45RA+ und „Gedächtniszellen“ für CD4+CD45RO+ Zellen werden in vorliegender Arbeit weiterhin verwendet, obwohl nach heutiger Meinung die Expression von CD45RO auf CD4+ T-Helferzellen mehr für den Zustand der Aktivierung relevant ist (Aktivierungsmarker) (Young 1997). Deshalb lassen sich „naive“, „Gedächtnis“- und Effektor T-Zellen auch aufgrund der Signalintensität und –qualität unterscheiden, die es braucht, um T-Lymphozyten zu aktivieren (Iezzi..1998); Effektor-T-Lymphozyten haben die niedrigste Aktivierungsschwelle. Im Vergleich mit den CD4+ Zellen fanden sich in der CD8+ Subpopulation tendenzielle Übereinstimmungen der Expression von CD45 Isoformen, jedoch hier mit signifikant verminderter Frequenz von CD8+CD45RA+ Zellen und erhöhtem Anteil von CD8+CD45RO+ Zellen in der ersten Woche nach Trauma gegenüber den Kontrollen. Auch bei den CD8+ Zellen hat sich gezeigt, dass die Unterscheidung zwischen „naiven“ und „Gedächtniszellen“ alleine aufgrund der Expression von CD45 Isoformen unzuverlässig ist, da in der CD45RA+ Population Zellen mit phänotypischen Merkmalen aktivierter Zellen vorkommen (Okumura 1993; Roederer 1995; Hoflich 1998). Die Bedeutung der oben genannten Verschiebungen von CD45 Subpopulationen für den Reaktionszustand des

Immunsystems von Patienten nach Verbrennungsverletzung wird anhand funktioneller Analysen später diskutiert.

Die Population der CD4+CD45RO+ Zellen deckt sich praktisch mit denjenigen CD4+ Zellen, die das β 1-Integrin CD29, einen Fibronektinrezeptor, auf der Oberfläche exprimieren (Smith 1986). Nach Verbrennungsverletzung fanden wir den prozentualen Anteil der CD4+CD29+CD45RA- Population in guter Übereinstimmung mit der Quote der CD4+CD45RO+ Zellen leicht erhöht, im Vergleich mit Kontrollen. Die Expressionsdichte von CD29 auf CD4+CD45RA-Zellen stieg zwischen den Tagen 3 und 7 post Trauma deutlich, nicht jedoch signifikant an, was als eine aktivierungsinduzierte Zunahme dieses Adhäsionsmoleküls verstanden werden könnte. Baars et al. (Baars 1995) berichteten von einer unterschiedlichen Expression der Integrine β 1 (CD29) und β 2 (CD11b) auf einer Subpopulation von CD4+ T-Helferzellen, die differenzierte und spezialisierte „Gedächtniszellen“ beinhalten.

Die Verteilung des CD11b Antigens, einem Mitglied der β 2-Integrin-Familie auf humanen CD8+ Zellen ist nicht sehr gut charakterisiert. Ursprünglich wurde bei CD8+CD11b+ und CD8+CD28+ T-Zellen von reziproken Populationen ausgegangen, die entweder zytotoxische (CD8+CD11b-CD28+) oder suppressorische Aktivität (CD8+CD11b+CD28-) ausüben (Yamada 1985). Neuere Befunde dokumentieren Suppressorzellen mit zytolytischer Aktivität, unabhängig von dem Zytokinmuster (T_H2 -ähnlich), so dass die klassische Trennung zwischen den Begriffen „zytotoxisch“ und „Suppressor“ grundsätzlich nicht mehr sinnvoll erscheint (Seder 1995). De Panfilis (De Panfilis 1997) geht sogar noch einen Schritt weiter und schlägt vor, den Begriff „Suppressorzelle“ gänzlich zu vermeiden, weil die Suppression ein Phänomen der gegenseitigen Kontrolle der vier T-Zellsubpopulationen, T_H1 , T_H2 , T_H1 -ähnlich CD8+ und T_H2 -ähnlich CD8+ ist. In einer weiteren Studie wurde CD11b als Aktivierungsmarker für murine CD8+ CTL beschrieben (McFarland 1992). In diesem Kontext untersuchten wir die CD8+ T-Zellpopulationen nach Verbrennungstrauma hinsichtlich der Verteilung des CD11b Antigens, wobei wir die CD16+ NK-Zellen (z. T. CD11b+) von der Analyse ausschlossen. Wir konnten keine Veränderung der CD11b+ und CD11b- Zellen feststellen, weder in der Frequenz noch in der Expressionsdichte beim Vergleich mit den gesunden Kontrollen. Der unveränderte Anteil an CD56+ T-

Lymphozyten (CD3+) spricht ebenfalls nicht für eine Aktivierung zytotoxischer T-Zellen nach Verbrennungstrauma und steht in gutem Einklang mit dem Ergebnis der CD11b Verteilung auf CD8+ T-Zellen.

Zytokine spielen eine kritische Rolle in den systemischen Reaktionen des schweren SIRS und tragen wesentlich zum Bild der Ganzkörperentzündung („whole body inflammation“) bei (Bone 1996) (Molloy 1993). Sowohl die zellvermittelte Immunität (CMI), als auch die humoralen Immunantworten werden über verschiedene Zytokine reguliert, die von T-Lymphozyten (CD4+ und CD8+) sezerniert werden. Es war deshalb ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie bei Patienten nach schwerer Verbrennungsverletzung T-Zellsubpopulationen durchflusszytometrisch zu identifizieren und aufgrund ihrer individuellen T_H1 / T_H2 - Zytokinsekretionsmuster funktionell zu charakterisieren. Entscheidend für die Induktion einer T_H1 - oder T_H2 -Antwort ist das lokale Zytokinmilieu, wobei IL-12 und IL-18 starke Induktoren einer T_H1 -Antwort sind, die zur IFN- γ Produktion führen (Alzona 1995; Robinson 1997). IL-4 und IL-10 fördern dagegen entscheidend die Ausprägung einer T_H2 -Antwort.

Die Technik individuelle Zellen über Fluoreszenzparameter einzeln anzusprechen und ihren Phänotyp und ihr Zytokinprofil zu identifizieren hat den enormen Vorteil ohne physikalische Zellseparationstechniken wie Säulen oder Dichtegradienten etc. auszukommen, die nur selten zu ausreichend reinen Zellpopulationen führen. Unserer Meinung nach stellt heutzutage die alleinige Bestimmung von Zytokinen in Überständen von PBMC-Kulturen keine adäquat präzise Methode dar, um vermutete Änderungen der T-Zellreaktivität zu prüfen. Einerseits setzen sich PBMC-Fraktionen nicht ausschließlich aus T-Zellen zusammen und auch andere mononukleäre Leukozyten wie B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten sind potentiell in der Lage auf gleiche Stimulantien Zytokine zu sezernieren. Andererseits variiert das Verhältnis der verschiedenen Zelltypen in der posttraumatischen Phase (vgl. Abb. 15-17) von Patient zu Patient entsprechend dem Verletzungsgrad. Um diese Probleme zu umgehen war vorliegende Studie darauf ausgelegt, die de novo Synthesepprofile polyklonal aktivierter PBMC mit den korrespondierenden extrazellulären Proteinen zu korrelieren. Die Einteilung von CD4+ T-Zellen in T_H1 und T_H2 Subpopulationen beruht auf unterschiedlichen Zytokinsekretionsmustern, die verschiedene funktionelle Eigenschaften vermitteln (Mosmann 1986). Wir

wählten die beiden charakteristischen T_H1 -Produkte $IFN-\gamma$ (Leitzytokin der T_H1 -Antwort) und IL-2, die essentielle Komponenten der zellvermittelten Immunantwort darstellen und wesentlich an der Aktivierung von Makrophagen beteiligt sind. Aus methodischen Gründen (Kurzzeitaktivierung) wurde die T_H2 -Antwort über ihr Leitzytokin IL-4 definiert, das immunsuppressive Eigenschaften besitzt und aktivierte Makrophagen sogar in Gegenwart von $IFN-\gamma$ herunterreguliert (Parronchi 1992). Sowohl die Kurzzeitstimulation über 5 Stunden ex vivo, als auch die Verwendung des Na-Ionophores Monensin zur Sekretionsinhibition sollten eine mögliche Modulation der Zytokinsynthesemuster von T-Zellen durch Zytokine aus anderen T-Zellen oder akzessorischen Zellen weitgehend verhindern (Picker 1995). Die T-Zellen wurden unter Umgehung der transmembranösen Signalkaskade durch Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels mit dem Ca-Ionophor Ionomycin und direkter Aktivierung der Proteinkinase C mit PMA stimuliert. Diese Kombination hat sich als äußerst zuverlässiges Stimulans für T-Zellen bewährt (Schauer 1996). Die Verwendung von Ionomycin und PMA steht jedoch hinsichtlich der Glaubhaftigkeit als Stimulus für die T-Zellaktivierung oftmals in der Kritik, da es sich mehr um einen pharmakologischen, als einen physiologischen Aktivator handelt. Hierbei stellt sich jedoch die Frage, was ein wirklich physiologischer Stimulus ist. Zellstimulationen mit supraoptimalen Konzentrationen von Antigen oder Antikörper sind ebenso in der Lage artifizielle Syntheseantworten, verglichen mit den in vivo Konditionen zu induzieren. Obwohl es sich bei Ionomycin und PMA um potente Stimuli handelt, werden nicht alle Zellen zufällig oder generalisiert aktiviert, sondern absolvieren ihr spezifisches Zytokinproduktionsprogramm, unabhängig davon, ob sie mit Antigen oder Ionomycin und PMA stimuliert wurden (Openshaw 1995). Vielmehr repräsentieren die Zytokinphänotypen, die Ionomycin/PMA induziert entstehen, das physiologische Potenzial der zellulären Zytokinproduktion (Prussin 1997). Ein kritischer Parameter für die Detektion zytokinproduzierender Zellen über die intrazelluläre Zytokinfärbung ist die Verwendung eines Proteintransportinhibitors während der ex vivo Zellaktivierung. Das Na-Ionophor Monensin ist ein lipophiler Metabolit aus *Streptomyces cinnamomensis* (Liu 1982), der als Hemmstoff die Funktionen im trans-Bereich des Golgiapparates blockiert und damit die Sekretion intrazellulärer Proteine aus verschiedenen Zelltypen. Dieser monovalente Polyether-Ionophor tauscht Na^+ gegen H^+ Ionen aus, mit der Folge einer

Unterbrechung der Ionengradienten in biologischen Membranen (Mollenhauer 1990). Der Proteintransport zur Zellmembran wird durch Störung des Golgikomplexes blockiert, ohne die Protein de novo Synthese zu beeinträchtigen. Die in vorliegender Studie verwendete Monensinkonzentration von 3 μ M erwies sich in früheren Studien als nicht toxisch für Zellen, sofern die Kulturzeit 15 Stunden nicht überstieg (Jung 1993). Darüberhinaus kommt es durch Monensin zu keiner Veränderung von Zelloberflächenmarkern, was eine simultane Detektion von intrazellulären und Membranantigenen erlaubt.

In früheren Studien unseres Labors konnte eine progressive Verschlechterung der Kapazität von PBMC nach schwerer Verbrennungs- und Mehrfachverletzung beobachtet werden, auf mitogene Stimuli adäquat zu reagieren (Faist, Kupper et al. 1986; Faist 1989; Faist, Schinkel et al. 1993). Diese Ergebnisse ließen uns vermuten, dass die reduzierte Produktion von IFN- γ und IL-2 mit erhöhten IL-4-Konzentrationen korreliert sein könnte. Tatsächlich war die IL-4-Syntheserate in den Kulturüberständen Ionomycin/PMA-stimulierter PBMC über den gesamten Beobachtungszeitraum von 7 Tagen nach Verletzung dramatisch bis auf das 16-fache gegenüber Kontrollen erhöht. Für IFN- γ konnten wir eine nur leichte Sekretionssteigerung nachweisen, wogegen die IL-2 Konzentrationen vor allem in der Gruppe der Verstorbenen zunahm. Diese Daten finden sich in teilweiser Übereinstimmung mit Befunden von O'Sullivan et al. (O'Sullivan, Lederer et al. 1995), die nach schwerer Verbrennungsverletzung in PHA-stimulierten PBMC eine 90%ige Steigerung von IL-4 bei gleichzeitiger Reduktion der IFN- γ Produktion um 45% nachweisen konnten. Im Gegensatz zu den Beobachtungen in vorliegender Studie wurde nach Verbrennung eine nachhaltig verminderte IL-2 Synthese und Genexpression beschrieben (O'Riordain 1993), die mit steigender Mortalität korrelierte (Demling 1993). PHA entwickelt seine mitogene Wirkung bekannterweise über den T-Zellrezeptorkomplex, so dass der PHA-induzierten IFN- γ und IL-2 Defizienz nach Trauma eher ein inhärentes transmembranöses Signaltransduktionsproblem in T-Zellen zugrunde liegen dürfte, als alleinige Insuffizienzen in der Ca^{2+} -Mobilisierung oder der PKC-Aktivierung. Faist et al. (Faist, Schinkel et al. 1993) konnten durch Zugabe von PMA die Wirkung essentieller „second messengers“ nachahmen und damit in Kokultur mit PHA die verminderte IL-2 Freisetzung nach Trauma normalisieren.

Sowohl in der oben erwähnten Studie von O'Sullivan (O'Sullivan, Lederer et al. 1995), als auch in tierexperimentellen Untersuchungen mit dem Nachweis einer dominierenden T_H2-ähnlichen Zytokinsyntheseantwort nach hämorrhagischem Schock (Ayala 1994), musste unklar bleiben, welche T-Zellsubpopulationen in welchem Maße zu erhöhten oder erniedrigten Zytokinspiegeln nach Trauma beitragen.

Erstmalig und überraschend zugleich gelang es uns mit der durchflusszytometrischen Einzelzellanalyse die CD8⁺ Zelle als primären zellulären Ursprung der stark erhöhten IL-4 Syntheserate in der ersten Woche nach Verbrennungsverletzung zu identifizieren. Die gesteigerte Zahl IL-4⁺ CD8⁺ T-Zellen korrelierte positiv mit dem löslichen IL-4 aus den Zellkulturüberständen und darüber hinaus mit der Mortalitätsrate. Obwohl humane und murine CD8⁺ T-Zellen das Potenzial haben IL-4 zu produzieren war dieses Ergebnis unerwartet, zumal gewöhnlich deutlich mehr CD4⁺ Zellen IL-4 synthetisieren, als CD8⁺ Zellen (Paliard 1988). Die Existenz funktionell verschiedener CD8⁺ T-Zellen ist wohl bekannt und sie wurden als Suppressor (T_S) bzw. zytotoxische (T_C) T-Zellen definiert, wobei die Majorität der humanen T-Zellklone ein T_H1-ähnliches Profil zeigt. Solche zytotoxischen CD8⁺ Zellen produzieren IFN- γ und IL-10, aber kein IL-4, wogegen CD8⁺ Suppressorklone substantielle Mengen an IL-4 synthetisieren (Salgame 1991). Aufgrund unserer Beobachtungen, dass IL-4 und IFN- γ in der individuellen CD8⁺ Zelle kaum koexprimiert werden (nicht dargestellt), könnte es sich bei IL-4 produzierenden CD8⁺ Lymphozyten um Zellen handeln, die regulatorische Aktivitäten vermitteln. Die Polarisierung von CD8⁺ T-Zellen ist nicht nur ein in vitro Phänomen, sondern wurde auch mit verschiedenen humanen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. So ist das Auftreten von T_H2-ähnlichen CD8⁺ Zellen bei HIV Patienten für eine nachteilige Krankheitsprogression verantwortlich (Maggi 1994). Außerdem sind auch IL-4 sezernierende CD8⁺ Klone aus dem Blut von Patienten mit der lepromatösen Form der Lepra isoliert worden (Salgame, Abrams et al. 1991). Der initiale Auslöser für die Änderungen der funktionellen Charakteristika von CD8⁺ Zellen ist gegenwärtig unklar. Da T-Zellen anscheinend ohne IL-4 nicht in der Lage sind zu IL-4 produzierenden Zellen zu differenzieren (Weinberg 1990; Paul 1992), müssen nicht-T-Zellen, wahrscheinlich Mastzellen oder Basophile, in die IL-4 Synthese involviert sein (Piccinni 1991).

Auch für die gesteigerte IL-2 und IFN- γ de novo Synthese nach Trauma ist die CD8+ Zelle entscheidend verantwortlich. Ähnlich den Kontrollen synthetisierten nach Verbrennung mehr CD8+ T-Zellen IFN- γ als CD4+ T-Helferzellen, aber mehr CD4+ T-Helferzellen IL-2 als CD8+ T-Zellen. Allerdings korrelierten zunächst nur die IL-2 und IFN- γ Syntheseantworten der CD8+ T-Zellen mit dem klinischen Ergebnis. In Übereinstimmung mit Arbeiten von de Jong et al. (de Jong 1991) konnten wir in unserer Studie bei Verbrennungspatienten in CD8+CD45RO+ Zellen deutlich mehr IL-2 Produzenten nachweisen, als in der CD8+CD45RA+ Population. Die weiter differenzierte Analyse der IL-2 Antwort in der CD8+CD45RA+ Population zeigte eine signifikante Steigerung gegenüber den Kontrollen, ohne aber mit der Überlebensrate zu korrelieren. In der CD4+ und auch in der CD8+ Subpopulation partizipieren zahlenmäßig deutlich mehr CD45RO+ Zellen an der IFN- γ Synthese, als in der weitgehend reziproken Subpopulation der CD45RA+ Zellen (Chipeta 1998). Das ist unseren Beobachtungen zufolge auch nach Verbrennungstrauma der Fall. Aber im Gegensatz zur CD8+CD45RA+ Subpopulation ist eine zahlenmäßig signifikante Erhöhung IFN- γ sezernierender T-Zellen in der CD8+CD45RO+ Population prädiktiv für das Überleben.

Die schnelle Zunahme der Zahl von IL-2 synthetisierenden CD8+CD45RA+ Zellen in der ersten Woche nach Trauma könnte bestätigen, dass es sich bei dieser Subpopulation hauptsächlich um kürzlich aktivierte Effektorzellen T-Zellen handelt und nicht um vermeintlich „naive“ T-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten (Hoflich, Docke et al. 1998). Diese Vermutung wird ferner unterstützt durch die weiteren Ergebnisse einer signifikant zunehmenden Zahl IFN- γ produzierender CD8+CD45RA+ Zellen nach Trauma, die aber wie schon bei IL-2 bemerkt, ebenfalls kein klinisches Überlebenskorrelat darstellten. Offensichtlich passen CD8+ Zellen nicht in die gängige Klassifikation „naive“/ruhende Zellen bzw. „Gedächtnis-“/(präaktivierte) Effektorzellen, die auf CD4+ Zellen angewandt wird. Möglicherweise unterscheidet sich auch das Verhältnis von CD45RA+ zu CD45RO+ Zellen in der CD8+ Population mehr von dem der CD4+ Zellen, wenn sie auf gleicher Basis differenziert werden, und stellt sich nicht so einfach dar, wie es im ersten Moment den Anschein hatte (Adamthwaite 1994). Zudem lassen sich humane CD8+ Zellen phänotypisch und funktionell in zwei diskrete, zur erhöhten

Aktivität konditionierte (allgemein als „priming“ bezeichnet) Subpopulationen der „Gedächtnis-“ und Effektorzellen differenzieren (Hamann 1997). Aufgrund von Experimenten an TCR-transgenen Mäusen konstatierten Kavanagh et al. eine verbrennungsinduzierte Aktivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in Richtung einer T_H1-Antwort mit erhöhter IFN- γ Produktion und geringfügig reduzierter IL-2 Synthese (Kavanagh 1998). Auch wir fanden in Patienten nach Trauma eine signifikant erhöhte Zahl von IFN- γ produzierenden „naiven“ T-Helferzellen (CD4⁺CD45RA⁺), die allerdings keine prognostische Relevanz hatte, ebenso wenig wie die Frequenz der nach Verbrennungsverletzung wenig beeinflussten IL-2 bildenden CD4⁺CD45RA⁺ T-Helferzellen.

Obwohl das Zytokinsynthesepotenzial individueller, echter Effektorzellen weitgehend unbekannt ist, ist dennoch die T_H1/T_H2-Terminologie soweit akzeptiert, dass in Ausweitung auf komplexe in vivo Immunantworten das Überwiegen von IFN- γ oder IL-4 produzierenden Zellen mit T_H1- bzw. T_H2-Antworten bezeichnet wird (Picker, Singh et al. 1995). Es ist aber wichtig, darauf hinzuweisen, dass derartig polarisierte Immunantworten vor allem gegen Infektionserreger besonders in der Inzuchtmaus beobachtet wurden und hier stark vom genetischen Hintergrund der verwendeten Maus abhängig waren (Grzych 1991; Pearce 1991; Velupillai 1994). Beim Menschen kommen ausschließlich durch T_H1- oder T_H2-Zellen vermittelte Antworten nur in besonderen Fällen vor. Meist handelt es sich eher um eine Verstärkung der Produktion von T_H1- gegenüber T_H2-Zytokinen oder umgekehrt, so dass besser von T_H1- oder T_H2-artigen Antworten gesprochen werden sollte (Fleischer 1999). Vorliegende Daten lassen dementsprechend eine Verschiebung der Zytokinantwort nach schwerer Verbrennungsverletzung in Richtung eines vorherrschend immunsuppressiven T_H2 Phänotyps erkennen. Insbesondere die Zunahme der Expressionsdichte von CD28 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und die verstärkte IL-4 Synthese der CD8⁺ Zellen unterstützen diese Vermutung. Die T_H2-Antwort wurde alleine über das Leitzytokin IL-4 definiert, weil auch wir die Erfahrung machen mussten, dass es bis heute kaum möglich ist, IL-10 intrazellulär in heterogenen PBMC-Kulturen zuverlässig nachzuweisen. Das liegt weniger daran einen geeigneten Antikörper zu finden, sondern vielmehr an der geringen Frequenz von T_H2-Zellen und dem späten Beginn der IL-10 Produktion zur Hemmung aktivierter T-Zellen und Makrophagen

(Schauer, Jung et al. 1996). Zusammen mit IL-4 inhibiert IL-10 besonders die Synthese der T_H1 -Zytokine IL-2, IFN- γ und IL-12 (de Waal Malefyt 1991; Fiorentino 1991). Es sind außerdem nur sehr wenige Daten zur Frequenz IL-10 produzierender T-Zellen verfügbar. In Mäusen exprimieren bis zu 4,6% der CD4+ Zellen IL-10 intrazytoplasmatisch (Assenmacher 1994). Im humanen System zeigte die Häufigkeit IL-10 produzierender Zellen nach 36-stündiger Stimulation mit Ionomycin und PMA ein Maximum mit 4% (Rostaing 1999). Unsere Schlussfolgerung einer Verstärkung der Zytokinantwort vom T_H2 -Typ bei simultanem Anstieg der Produktion von IL-2 und IFN- γ ist nicht unbedingt ein Widerspruch in sich. Vielmehr sprechen diese Ergebnisse für eine exklusive Synthese von T_H1 -artigem IFN- γ und IL-2, sowie von T_H2 -artigem IL-4 in der individuellen Zelle, was weiter vermuten lässt, dass diese Zytokine nicht eng koreguliert sind. Ferner deutet die exzessive IL-4 Freisetzung und die verstärkte IL-10 Sekretion in den Kulturüberständen bei eher moderater Steigerung der IL-2 und IFN- γ Synthese auf eine präferenziell T_H2 gerichtete Immunantwort hin. In Übereinstimmung mit Untersuchungen von O'Sullivan et al. (O'Sullivan, Lederer et al. 1995) und O'Suilleabhain et al. (O'Suilleabhain 1996) konnten wir nach Verbrennungsverletzung den Anstieg von IL-10 in Zellkulturüberständen mit der Mortalitätsrate korrelieren. Trotz eines größeren Anstieges von IFN- γ und IL-2 produzierenden CD4+ und CD8+ Zellen nach Verbrennungstrauma, verglichen mit der relativ geringen, aber signifikanten Zunahme IL-4 synthetisierender Zellen, wird von uns eine Imbalance durch Überwiegen eines T_H2 -artigen Zytokinprofils favorisiert. Wir interpretieren diese Ergebnisse zum einen mit der nur vorübergehenden IL-4 Synthese durch T-Zellen, die einen asynchronen Zellzyklus haben und zum anderen IL-4 nach primärer Stimulation sequentiell exprimieren. In einer Serie von Experimenten haben Openshaw et al. (Openshaw, Murphy et al. 1995) in Ionomycin und PMA stimulierten T_H1 Klonen eine prolongierte IFN- γ Synthese gezeigt, die mit fast 100% positiver Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden konnte. Die Stimulation von T_H2 Klonen dagegen resultierte in einer vorübergehenden IL-4 Synthese mit maximal 40% IL-4 produzierender Zellen zu jedem Zeitpunkt. Während die IFN- γ Synthese persistierte, nahm die IL-4 Produktion mit dem Erreichen des Synthesemaximums nach 4 Std. sehr schnell ab. Da Säugetierzellen, wie humane T-Zellen keinen synchronen Zellzyklus

haben, ist es auch nicht zu erwarten, dass ein transitorisch exprimiertes Zytokin, wie IL-4, simultan in 100 % der Zellen detektierbar ist. Somit stellt unserer Meinung nach die exzessive IL-4 Freisetzung in den Kulturüberständen stimulierter PBMC und die vergleichsweise „nur“ moderate Steigerung der IL-4 de novo Synthese nach Trauma keinen Widerspruch dar.

Die Durchflusszytometrie hat sich in den letzten Jahren zur Technik der Wahl entwickelt, um die Zytokinproduktion auf Einzelzellebene zu studieren. Diese Fusion von intrazellulärer Färbetechnik mit der Multiparameterdurchflusszytometrie hat unserer Meinung nach das Potenzial eine neue Standardmethode zur immunologischen Überwachung von Hochrisikopatienten zu werden. Fortschritte in der Behandlung von Patienten mit Sepsissyndrom sind nur mit einem verbesserten Verständnis der Pathogenese zu erwarten. Die Einführung einer neuen Terminologie mit SIRS, CARS und MARS führte zu einer Definition der Sepsis als immunologischer Dyshomöostase des Patienten. Eine frühe und definitive Diagnose einer Infektion, die Bestimmung des Immunstatus (pro- oder antiinflammatorisch) sowie klinischer und biochemischer Parameter ist deshalb unabdingbar, um die systemische inflammatorische Antwort und ihre Progression möglichst zeitgerecht beurteilen zu können.

6 ZUSAMMENFASSUNG DER WICHTIGSTEN ERGEBNISSE

Die Immunantwort auf ein Verbrennungstrauma beginnt im Moment der Verletzung und resultiert in einer Monozytenaktivierung, die mit einer vermehrten Synthese und Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren einhergeht. Unter physiologischen Bedingungen dient ein ausgewogenes Zusammenspiel von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen der Homöostase, wohingegen das Immunsystem nach massivem Trauma mit einer oft exzessiven Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren reagiert. Patienten mit schwerer Verbrennungsverletzung sind daher hochgradig gefährdet ein ausgedehntes „systemic inflammatory response syndrome, (SIRS)“, d. h. eine maligne Ganzkörperinflammation, eine Sepsis oder eine Multiorgandysfunktion, assoziiert mit einer hohen Letalität, zu entwickeln. Eine überwiegend antiinflammatorische Immunantwort dagegen manifestiert sich als systemische Immundefizienz und Anergie mit einer signifikant erhöhten Infektionsanfälligkeit. Es besteht eine eindeutige Ursache-Effekt-Beziehung zwischen Trauma und Zytokinsystem. Mechanischer Stress führt zu schweren Störungen der Interaktion von Monozyten und T-Zellen mit der Folge einer schwerwiegenden Immundysfunktion, wobei PGE₂ als einer der Hauptmediatoren der traumainduzierten Immundepression angesehen wird. Erhöhte PGE₂-Spiegel sind mit einer reduzierten T-Zellmitogenese, IL-2-Produktion und IL-2-Rezeptorexpression korreliert und für eine Verschiebung der T-Helfer-Aktivität in Richtung eines dominierenden T_H2 Phänotyps mit erhöhter Synthese der immunsuppressiven Zytokine IL-4 und IL-10 verantwortlich. Zytokine sind für die Kommunikation im Immunsystem, vor allem bei der Koordination einer Immunantwort durch T-Lymphozyten, von entscheidender Bedeutung. Als sezernierte Proteine waren sie bis vor kurzem der durchflusszytometrischen Analyse nur begrenzt zugänglich. Wir konnten sie wie in vorliegender Arbeit beschrieben in fixierten Zellen intrazellulär nachweisen, d. h. vor der Sekretion. Dieses Verfahren erlaubte es uns, die Expression der Zytokingene quantitativ, kinetisch, korreliert mit Oberflächenproteinen und auf die Einzelzelle bezogen analytisch zu erfassen, zumindest bis zur posttranslationalen Ebene.

In peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von 10 Patienten mit schwerer Verbrennungsverletzung (KOF >30%) und 15 gesunden Kontrollpersonen wurde die

Zytokinsynthese mit Ionomycin und PMA polyklonal induziert und die Zellen anschließend mit fluorochromkonjugierten monoklonalen Antikörpern gegen IL-2, IL-4 und IFN- γ , sowie gegen CD4-, CD8-, CD45RA- und CD45RO-Zelloberflächenantigene in unterschiedlichen Kombinationen gefärbt.

Massives Verbrennungstrauma führte nach polyklonaler Stimulation der T-Lymphozyten zu teils signifikanten systemischen Veränderungen der Zytokinexpression in den Kulturüberständen. Verglichen mit einer exzessiven IL-4 Freisetzung und stark erhöhter IL-10 Sekretion zeigten die IFN- γ - und die IL-2 Synthese eine nur mäßige Steigerung gegenüber den gesunden Kontrollen. Wir sahen somit eine traumatisch induzierte Veränderung des Zytokinprofils in Richtung eines überwiegend T_H2-artigen, immunsuppressiven Phänotyps. Diese Verschiebung von einer eher zytotoxischen (T_H1) zu einer weitgehend humoralen und daher abgeschwächten Immunantwort ist mit einer erhöhten Infektionsanfälligkeit verbunden. Mit der durchflusszytometrischen Einzelzellanalyse gelang uns dann erstmalig die Identifikation der CD8+ Zelle, die ursächlich für die gesteigerten Syntheseantworten im posttraumatischen Verlauf verantwortlich ist. Die Synthesekapazität der CD4+ T-Helferzellen blieb nahezu unverändert. Eine Ausnahme bildete die prozentuale Abnahme IFN- γ positiver Gedächtniszellen (CD45RO+) zugunsten einer zunehmenden Zahl IFN- γ produzierender naiver T-Helferzellen (CD45RA+). In der CD8+ Subpopulation kam es in der ersten Woche nach Verbrennungsverletzung zu einer signifikanten Steigerung der IL-2, IL-4 und IFN- γ de novo Synthese, die interessanterweise bei weiterer, differenzierter Analyse eine positive Korrelation mit dem klinischen Verlauf ergab. Patienten, die verstarben, zeigten im Vergleich zu den Überlebenden signifikant erhöhte IL-4 und IL-2 Syntheseraten der CD8+ Zellen. Betrachtet man die IL-2 Synthese dieser CD8+ Zellen genauer, nahm nur die Zahl IL-2-produzierender CD8+CD45RA+ Zellen signifikant zu, verglichen mit dem Kontrollkollektiv, wobei beide Patientenkollektive an dieser Entwicklung partizipierten. Auch die IFN- γ Synthese der CD8+CD45RA+ Subpopulation zeigte an allen Tagen post Trauma eine signifikante Zunahme gegenüber den Kontrollen ohne aber mit der Überlebensrate zu korrelieren. Dagegen war der prozentuale Anteil IFN- γ produzierender CD8+ CD45RO+ Zellen von Verstorbenen signifikant gegenüber den Überlebenden reduziert und blieb auch

an allen Untersuchungstagen deutlich hinter dem Kontrollniveau zurück, das von den überlebenden Patienten z. T. signifikant übertroffen wurde.

Neben der funktionellen Charakterisierung über die Zytokinexpression (intrazellulär) kann der Aktivierungsstatus des Immunsystems durchflusszytometrisch auch über eine Oberflächenphänotypisierung ermittelt werden, ohne aber damit funktionell unterschiedliche Subpopulationen von T-Zellen definieren zu können. Einen ersten Hinweis auf die Aktivierung des Immunsystems von Verbrennungspatienten erhielten wir über die signifikante Zunahme von IL-2R α (CD25) tragenden T-Zellen in der ersten Woche nach Trauma. Aktivierte T-Zellen exprimieren darüberhinaus MHC-Klasse II-Moleküle und verschiedene Adhäsionsmoleküle, denen bei der Wechselwirkung der Zellen entscheidende Bedeutung zukommt. Akzessorische Moleküle erhöhen beispielsweise die Avidität der T-Zell-APC Interaktion und wirken kostimulatorisch. Wir konnten nach schwerer Verbrennungsverletzung eine verstärkte Expression des vorherrschenden T-Zellrezeptors (TCR) α/β und der akzessorischen T-Zellmoleküle CD2, CD7, CD28, CD29 und CD80 nachweisen. Die Zunahme von CD28-Molekülen auf der Oberfläche von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ist besonders bemerkenswert, da mit zunehmender Signalstärke des über CD28 vermittelten Signals die Differenzierung einer T-Zelle auf die T_H2-Entwicklung ausgerichtet wird. Die Aktivierung von T-Lymphozyten ist außerdem mit markanten Veränderungen im Expressionsmuster einzelner CD45 Isoformen verknüpft. Die Induktion der CD45RO Isoform und der Verlust von CD45RA waren beim Schwerstverbrannten besonders auffällig.

Die durchflusszytometrische Bestimmung des Aktivierungsstatus des Immunsystems hat unseres Erachtens das Potenzial einer Standardmethode zur Ermittlung von Hochrisikopatienten mit deren Hilfe immunsupprimierte Patienten und solche mit SIRS und Sepsis unterschieden werden können. Die zentrale Vorbedingung für eine effektivere Sepsistherapie stellt eine verbesserte Diagnostik im Sinne kontinuierlicher zellbiologischer Informationen („Online-Monitoring“) am Krankenbett dar, um die meist sehr schnell wechselnden immuninflammatorischen Zustandsbilder direkt zu erkennen und einer zeitgerechten, individuell adaptierten Behandlungsintervention zuzuführen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, A. K. (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-93.
- Adamthwaite, D. (1994). "CD8+ T-cell subsets defined by expression of CD45 isoforms differ in their capacity to produce IL-2, IFN-gamma and TNF-beta." Immunology **81**(2): 253-60.
- Akira, S. (1990). "Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF)." Faseb J **4**(11): 2860-7.
- Alzona, M. (1995). "IL-12 activates IFN-gamma production through the preferential activation of CD30+ T cells." J Immunol **154**(1): 9-16.
- Antonacci, A. C. (1984). "Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations after thermal injury in human beings." Surg Gynecol Obstet **159**(1): 1-8.
- Ashmore, L. M. (1989). "Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage." J Immunol Methods **118**(2): 209-15.
- Assenmacher, M. (1994). "Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells." Eur J Immunol **24**(5): 1097-101.
- Ayala, A. (1994). "Mechanism of enhanced susceptibility to sepsis following hemorrhage. Interleukin-10 suppression of T-cell response is mediated by eicosanoid-induced interleukin-4 release." Arch Surg **129**(11): 1172-8.
- Baars, P. A. (1995). "Heterogeneity of the circulating human CD4+ T cell population. Further evidence that the CD4+CD45RA-CD27- T cell subset contains specialized primed T cells." J Immunol **154**(1): 17-25.

- Bachmann, M. F. (1999). "CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation." J Exp Med **190**(10): 1383-92.
- Baker, C. C. (1979). "Predicting fatal sepsis in burn patients." J Trauma **19**(9): 641-8.
- Barber, L. D. (1993). "Peptide binding to major histocompatibility complex molecules." Annu Rev Cell Biol **9**: 163-206.
- Barnaba, V. (1994). "Professional presentation of antigen by activated human T cells." Eur J Immunol **24**(1): 71-5.
- Baue, A. E. (1994). "Multiple organ failure, multiple organ dysfunction syndrome, and the systemic inflammatory response syndrome-where do we stand? [editorial]." Shock **2**(6): 385-97.
- Bell, G. M. (1995). "CD2 and the regulation of T cell anergy." J Immunol **155**(6): 2805-7.
- Bevan, M. J. (1978). "The influence of thymus H-2 antigens on the specificity of maturing killer and helper cells." Immunol Rev **42**: 3-19.
- Blazar, B. A. (1986). "Suppression of natural killer-cell function in humans following thermal and traumatic injury." J Clin Immunol **6**(1): 26-36.
- Bone, R. C. (1996). "Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS)." Ann Intern Med **125**(8): 680-7.
- Bone, R. C. (1996). "Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS." Crit Care Med **24**(7): 1125-8.
- Bone, R. C. (1992). "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus

- Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." Chest **101**(6): 1644-55.
- Bone, R. C. (1989). "Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group." Crit Care Med **17**(5): 389-93.
- Bonnard, C. (1984). The streptavidin-biotin bridge technique: Application in light and electron microscope immunocytochemistry. Immunolabeling for electron microscopy. J. M. Polak, Varndell, I. M., Elsevier Science Publishers B. V.: 95-112.
- Bounous, G. (1990). "The intestinal factor in multiple organ failure and shock." Surgery **107**(1): 118-9.
- Boyum, A. (1968). "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g." Scand J Clin Lab Invest Suppl **97**: 77-89.
- Carrel, S. (1991). "Direct involvement of CD7 (gp40) in activation of TcR gamma/delta+ T cells." Eur J Immunol **21**(5): 1195-200.
- Carrera, A. C. (1988). "Triggering of co-mitogenic signals in T cell proliferation by anti-LFA-1 (CD18, CD11a), LFA-3, and CD7 monoclonal antibodies." J Immunol **141**(6): 1919-24.
- Cheadle, W. G. (1989). Role of monocyte HLA-DR expression following trauma in predicting clinical outcome. Immune consequences of trauma, shock and sepsis. N. J. Faist E, Green D. Berlin-Heidelberg-New York, Springer: 119.
- Chipeta, J. (1998). "CD4+ and CD8+ cell cytokine profiles in neonates, older children, and adults: increasing T helper type 1 and T cytotoxic type 1 cell populations with age." Cell Immunol **183**(2): 149-56.

- Christou, N. V. (1981). "The predictive role of delayed hypersensitivity in preoperative patients." Surg Gynecol Obstet **152**(3): 297-301.
- Christou, N. V. (1983). "Anergy testing in surgical patients." Infect Surg **1**: 691-700.
- Cox, F. E. (1992). "T-cell subsets and cytokines in parasitic infections." Immunol Today **13**(11): 445-8.
- De Camp, M. M. (1988). "Posttraumatic multisystem organ failure." Jama **260**(4): 530-4.
- de Jong, R. (1991). "Human CD8+ T lymphocytes can be divided into CD45RA+ and CD45RO+ cells with different requirements for activation and differentiation." J Immunol **146**(7): 2088-94.
- De Panfilis, G. (1997). "Do T 'suppressor' cells exist?" Int J Immunopathol Pharmacol **10**(1): 107-109.
- de Waal Malefyt, R. (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." J Exp Med **174**(5): 1209-20.
- Del Prete, G. (1994). "The role of TH1 and TH2 subsets in human infectious diseases." Trends Microbiol **2**(1): 4-6.
- Demling, R. H. (1993). "Pathophysiology, prevention and treatment." Curr Probl Surg **30**: 347-414.
- Dianzani, U. (1992). "Isoform-specific associations of CD45 with accessory molecules in human T lymphocytes." Eur J Immunol **22**(2): 365-71.
- Ertel, W. (1993). "[Immunologic monitoring after severe trauma]." Unfallchirurg **96**(4): 200-12.

- Ertel, W. (1989). "Dynamics of immunoglobulin synthesis after major trauma. Influence of recombinant lymphokines." Arch Surg **124**(12): 1437-41; discussion 1441-2.
- Ertel, W. (1991). "Anti-TNF monoclonal antibodies prevent haemorrhage-induced suppression of Kupffer cell antigen presentation and MHC class II antigen expression." Immunology **74**(2): 290-7.
- Faist, E. (1989). Trauma-induced alterations of the lymphokine cascade. Immune consequences of Trauma, Shock and Sepsis. E. Faist et al. Berlin-Heidelberg, Springer-Verlag: 79-94.
- Faist, E. (1986). "Depression of cellular immunity after major injury. Its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation." Arch Surg **121**(9): 1000-5.
- Faist, E. (1992). "[The effect of extensive surgical intervention on cellular immune response]." Internist (Berl) **33**(6): 370-8.
- Faist, E. (1987). "Prostaglandin E2 (PGE2)-dependent suppression of interleukin alpha (IL-2) production in patients with major trauma." J Trauma **27**(8): 837-48.
- Faist, E. (1988). "Alteration of monocyte function following major injury." Arch Surg **123**(3): 287-92.
- Faist, E. (1996). "Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation." World J Surg **20**(4): 454-9.
- Faist, E. (1993). "Inadequate interleukin-2 synthesis and interleukin-2 messenger expression following thermal and mechanical trauma in humans is caused by defective transmembrane signalling." J Trauma **34**(6): 846-53; discussion 853-4.

- Faist, E. (1990). "Die Korrelation von in-vitro und in-vivo Immunparametern zur Charakterisierung von Risikopatienten bei elektivem Operationstrauma." Langenbecks Arch Chir [Suppl], Chir Forum **90**: 181.
- Feeney, C. (1995). "T-lymphocyte subsets in acute illness." Crit Care Med **23**(10): 1680-5.
- Fiorentino, D. F. (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." J Exp Med **170**(6): 2081-95.
- Fiorentino, D. F. (1991). "IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages." J Immunol **147**(11): 3815-22.
- Fleischer, B. (1999). Spezifische Mechanismen der immunologischen Infektabwehr. Handbuch der molekularen Medizin. D. Ganten, Ruckpaul, K. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **4**: 341-366.
- Fong, T. A. (1990). "Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines." J Immunol **144**(5): 1744-52.
- Friedl, H. P. (1992). "[Multiple trauma: definition, shock, multiple organ failure]." Unfallchirurgie **18**(2): 64-8.
- Fukaura, H. (1996). "Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients." J Clin Invest **98**(1): 70-7.
- Gadd, M. A. (1989). "Defective T-cell surface antigen expression after mitogen stimulation. An index of lymphocyte dysfunction after controlled murine injury." Ann Surg **209**(1): 112-8.

- Gahmberg, C. G. (1997). "Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules." Curr Opin Cell Biol **9**(5): 643-50.
- Goldberg, A. L. (1992). "Proteolysis, proteasomes and antigen presentation." Nature **357**(6377): 375-9.
- Goris, R. J. (1983). "The injury severity score." World J Surg **7**(1): 12-8.
- Goris, R. J. (1985). "Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation?" Arch Surg **120**(10): 1109-15.
- Green, D. R. (1988). "Trauma and the immune response [news]." Immunol Today **9**(9): 253-5.
- Greenspan, L. (1985). "Abbreviated Injury Scale and Injury Severity Score: a scoring chart." J Trauma **25**(1): 60-4.
- Groux, H. (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-42.
- Grzych, J. M. (1991). "Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni." J Immunol **146**(4): 1322-7.
- Guesdon, J. L. (1979). "The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques." J Histochem Cytochem **27**(8): 1131-9.
- Guo, Y. (1990). "Increased levels of circulating interleukin 6 in burn patients." Clin Immunol Immunopathol **54**(3): 361-71.
- Hamann, D. (1997). "Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells." J Exp Med **186**(9): 1407-18.
- Hoflich, C. (1998). "CD45RA(bright)/CD11a(bright) CD8+ T cells: effector T cells." Int Immunol **10**(12): 1837-45.

- Howard, M. (1982). "Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2." J Exp Med **155**(3): 914-23.
- Hoyt, D. B. (1990). "Head injury: an immunologic deficit in T-cell activation." J Trauma **30**(7): 759-66; discussion 766-7.
- Hsieh, C. S. (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages." Science **260**(5107): 547-9.
- Iezzi, G. (1998). "The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells." Immunity **8**(1): 89-95.
- Isaacs, A. (1957). "The interferon." Proc R Soc Lond B **147**: 258-267.
- Isakov, N. (1987). "Human T lymphocyte activation by tumor promoters: role of protein kinase C." J Immunol **138**(10): 3100-7.
- Isakson, P. C. (1982). "T cell-derived B cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells." J Exp Med **155**(3): 734-48.
- Jacob, L. (1909). "Über Allgemeininfektion durch Bacterium coli commune." Deutsches Arch. f. klin. Med. **97**: 303-347.
- June, C. H. (1989). "Two distinct mechanisms of interleukin-2 gene expression in human T lymphocytes." J Autoimmun **2 Suppl**: 55-65.
- June, C. H. (1987). "T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression." Mol Cell Biol **7**(12): 4472-81.
- June, C. H. (1990). "Role of the CD28 receptor in T-cell activation." Immunol Today **11**(6): 211-6.
- Jung, L. K. (1992). "CD7 augments T cell proliferation via the interleukin-2 autocrine pathway." Cell Immunol **141**(1): 189-99.

- Jung, T. (1993). "Detection of intracellular cytokines by flow cytometry." J Immunol Methods **159**(1-2): 197-207.
- Kavanagh, E. G. (1998). "Burn injury primes naive CD4+ T cells for an augmented T-helper 1 response." Surgery **124**(2): 269-76.
- Keel, M. (1999). "Veränderte Lymphozytenfunktionen in der systemischen Inflammation (SIRS)." Anästhesiologie und Intensivmedizin **40**(1): 28-30.
- Knight, S. C. (1993). "Antigen-presenting cell types." Curr Opin Immunol **5**(3): 374-82.
- Kohl, S. (1986). "The genetic deficiency of leukocyte surface glycoprotein Mac-1, LFA-1, p150,95 in humans is associated with defective antibody-dependent cellular cytotoxicity in vitro and defective protection against herpes simplex virus infection in vivo." J Immunol **137**(5): 1688-94.
- Lanier, L. L. (1988). "Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes." J Immunol **141**(10): 3478-85.
- Lanzavecchia, A. (1996). "Mechanisms of antigen uptake for presentation." Curr Opin Immunol **8**(3): 348-54.
- Lazarovits, A. I. (1994). "CD7 is associated with CD3 and CD45 on human T cells." J Immunol **153**(9): 3956-66.
- Leite-de-Moraes, M. C. (1997). "Natural killer T cells: a potent cytokine-producing cell population." Eur Cytokine Netw **8**(3): 229-37.
- Liu, C. M. (1982). Naturally Occuring Acid Ionophores. Polyether Antibiotics. J. W. Westley. New York, Marcel Dekker. **1**: 43-102.
- Livingston, D. H. (1988). "Depressed interferon gamma production and monocyte HLA-DR expression after severe injury." Arch Surg **123**(11): 1309-12.

- Maggi, E. (1994). "Th2-like CD8+ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection." J Exp Med **180**(2): 489-95.
- Malnati, M. S. (1995). "Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones." Science **267**(5200): 1016-8.
- Marshall, J. (1990). "Microbial infection and the septic response in critical surgical illness. Sepsis, not infection, determines outcome." Arch Surg **125**(1): 17-22; discussion 22-3.
- McFarland, H. I. (1992). "CD11b (Mac-1): a marker for CD8+ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection." J Immunol **149**(4): 1326-33.
- Merkenschlager, M. (1988). "Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by the monoclonal antibody UCHL1: implications for differential CD45 expression in T cell memory formation." Eur J Immunol **18**(11): 1653-61.
- Mollenhauer, H. H. (1990). "Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity." Biochim Biophys Acta **1031**(2): 225-46.
- Molloy, R. G. (1993). "Cytokines, sepsis and immunomodulation." Br J Surg **80**(3): 289-97.
- Molloy, R. G. (1994). "The humoral immune response after thermal injury: an experimental model." Surgery **115**(3): 341-8.
- Morgan, D. A. (1976). "Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows." Science **193**(4257): 1007-8.

- Mosmann, T. R. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-57.
- Mosmann, T. R. (1989). "Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells." Adv Immunol **46**: 111-47.
- Mosmann, T. R. (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
- O'Sullivan, S. T. (1995). "Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection." Ann Surg **222**(4): 482-90; discussion 490-2.
- Oberholzer, A. (2000). "Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states." Crit Care Med **28**(4 Suppl): N3-12.
- Okumura, M. (1993). "Both CD45RA+ and CD45RA- subpopulations of CD8+ T cells contain cells with high levels of lymphocyte function-associated antigen-1 expression, a phenotype of primed T cells." J Immunol **150**(2): 429-37.
- O'Mahony, J. B. (1985). "Changes in T lymphocyte subsets following injury. Assessment by flow cytometry and relationship to sepsis." Ann Surg **202**(5): 580-6.
- Openshaw, P. (1995). "Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations." J Exp Med **182**(5): 1357-67.

- O'Riordain, D. S. (1993). "Molecular mechanisms of decreased interleukin-2 production after thermal injury." Surgery **114**(2): 407-14; discussion 414-5.
- O'Suilleabhain, C. (1996). "Interleukin-12 treatment restores normal resistance to bacterial challenge after burn injury." Surgery **120**(2): 290-6.
- Paliard, X. (1988). "Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones." J Immunol **141**(3): 849-55.
- Parronchi, P. (1992). "IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones." J Immunol **149**(9): 2977-83.
- Paul, W. E. (1992). IL-4 determines lymphokine producing phenotype of antigen-specific CD4+ cells. New Advances on Cytokines. S. Romagnani, Abbas, A. K., Mosmann, T. R. New York, Raven Press.
- Paul, W. E. (1987). "B-cell stimulatory factor-1/interleukin 4." Annu Rev Immunol **5**: 429-59.
- Pearce, E. J. (1991). "Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*." J Exp Med **173**(1): 159-66.
- Piccinni, M. P. (1991). "Human bone marrow non-B, non-T cells produce interleukin 4 in response to cross-linkage of Fc epsilon and Fc gamma receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(19): 8656-60.
- Pichler, W. J. (1994). "T cells as antigen-presenting cells." Immunol Today **15**(7): 312-5.
- Picker, L. J. (1995). "Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry." Blood **86**(4): 1408-19.

- Polk, H. C., Jr. (1986). "A systematic study of host defense processes in badly injured patients." Ann Surg **204**(3): 282-99.
- Pories, S. E. (1991). "The epidemiologic features of nosocomial infections in patients with trauma." Arch Surg **126**(1): 97-9.
- Prussin, C. (1997). "Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level." J Clin Immunol **17**(3): 195-204.
- Quattrocchi, K. B. (1991). "Severe head injury: effect upon cellular immune function." Neurol Res **13**(1): 13-20.
- Robinson, D. (1997). "IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB." Immunity **7**(4): 571-81.
- Roederer, M. (1995). "CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults." J Clin Invest **95**(5): 2061-6.
- Romagnani, S. (1994). "Lymphokine production by human T cells in disease states." Annu Rev Immunol **12**: 227-57.
- Roper, R. L. (1990). "Prostaglandin E2 promotes IL-4-induced IgE and IgG1 synthesis." J Immunol **145**(8): 2644-51.
- Rostaing, L. (1999). "Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells." Cytometry **35**(4): 318-28.
- Sad, S. (1995). "Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines." Immunity **2**(3): 271-9.
- Salgame, P. (1991). "Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones." Science **254**(5029): 279-82.

- Schauer, U. (1996). "Measurement of intracellular cytokines." Immunol Today **17**(7): 305-6.
- Schluter, B. (1991). "Interleukin 6--a potential mediator of lethal sepsis after major thermal trauma: evidence for increased IL-6 production by peripheral blood mononuclear cells." J Trauma **31**(12): 1663-70.
- Schluter, B. (1991). "Differential regulation of T- and B-lymphocyte activation in severely burned patients." J Trauma **31**(2): 239-46.
- Seder, R. A. (1995). "The functional role of CD8+ T helper type 2 cells [comment]." J Exp Med **181**(1): 5-7.
- Smith, S. H. (1986). "Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1." Immunology **58**(1): 63-70.
- Snijdewint, F. G. (1993). "Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes." J Immunol **150**(12): 5321-9.
- Sperling, A. I. (1996). "The complexities of T-cell co-stimulation: CD28 and beyond." Immunol Rev **153**: 155-82.
- Stamenkovic, I. (1991). "The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells." Cell **66**(6): 1133-44.
- Stephan, R. N. (1986). "Decreased interleukin-2 production following simple hemorrhage." Surg Forum **37**: 73.
- Streuli, M. (1987). "Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens." J Exp Med **166**(5): 1548-66.

- Talmadge, K. W. (1986). "Identity between human interferon-gamma and "macrophage-activating factor" produced by human T lymphocytes." Eur J Immunol **16**(12): 1471-7.
- Van Lier, R. A. (1991). "T cell receptor/CD3 and CD28 use distinct intracellular signaling pathways." Eur J Immunol **21**(7): 1775-8.
- Velupillai, P. (1994). "Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 18-22.
- Vincent, J. L. (2000). The Immune Response in Critical Illness: Excessive, Inadequate or Dysregulated. Immune Response in the Critically Ill. J. C. Marshall et al. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag. **31**: 12-21.
- Virtanen, I. (1980). "Subcellular compartmentalization of saccharide moieties in cultured normal and malignant cells." J Cell Biol **85**(2): 429-34.
- Volk, H. D. (1996). "Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis." Intensive Care Med **22 Suppl 4**: S474-81.
- Watts, C. (1999). "Pathways of antigen processing and presentation." Rev Immunogenet **1**(1): 60-74.
- Weinberg, A. D. (1990). "Distinct regulation of lymphokine production is found in fresh versus in vitro primed murine helper T cells." J Immunol **144**(5): 1800-7.
- Weiss, A. (1987). "Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation." Adv Immunol **41**: 1-38.
- Wood, J. J. (1984). "Immunoglobulin production and suppressor T cells after thermal injury." Surg Forum **35**: 619.

- Yamada, H. (1985). "Monoclonal antibody 9.3 and anti-CD11 antibodies define reciprocal subsets of lymphocytes." Eur J Immunol **15**(12): 1164-8.
- Yates, D. W. (1990). "ABC of major trauma. Scoring systems for trauma." Bmj **301**(6760): 1090-4.
- York, I. A. (1996). "Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex." Annu Rev Immunol **14**: 369-96.
- Young, J. L. (1997). "In vitro responses of human CD45R0brightRA- and CD45R0-RAbright T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells." Eur J Immunol **27**(9): 2383-90.
- Zinkernagel, R. M. (1974). "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." Nature **248**(450): 701-2.

8 ABKÜRZUNGEN

Aq. iniect.	Aqua ad iniectabilia
ADCC	antibody dependant cell-mediated cytotoxicity
ANOVA	analysis of variance
APC	antigen presenting cell
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalzium
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CD	cluster of differentiation
CMI	cell mediated immunity
CO ₂	Kohlendioxid
CTL	cytotoxic T-lymphocyte
CTLA	cytolytic T-lymphocyte-associated antigen
DMF	Dimethylformamid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony stimulating factor
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISS	Injury Severity Score
K	Kontrolle
kDA	Kilodalton
KOF	Körperoberfläche
LFA	leukocyte function associated antigen
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
μ	mikro
m	milli
M	molar
ml	Milliliter
Mφ	Monozyt
MAk	monoklonaler Antikörper
MFI	mean fluorescence intensity
MG	Molekulargewicht
MHC	major histocompatibility complex
Min.	Minute
MODS	Multiorgan dysfunktionssyndrom
MOV	Multiorganversagen
MW	Mittelwert
N	nano
NaN ₃	Natriumazid

NK	natural killer
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyan 5
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PHA	Phytohämagglutinin
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbolmyristatazetat (Phorbolester)
R	Rezeptor
RNA	ribonucleicacid
RT	Raumtemperatur
RT PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
Std.	Stunden
SF	Standardfehler
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
T _C	T-cytotoxic
T _H	T-helper
T _R	T-regulatory
T _S	T-suppressor
TCR	T-cell receptor
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiozyanat
vs.	versus
WKA	Weizenkeimagglutinin
z.T.	zum Teil

9 DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlichst bei allen bedanken, die mir beim Zustandekommen und Realisieren dieser Arbeit geholfen haben.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Eugen Faist, danke ich ganz besonders für die langjährig bestehende Beschäftigung in seinem Forschungslabor, die Heranführung an das umfangreiche und vielseitige Gebiet der posttraumatischen Immunalterationen und die Überlassung des außerordentlich interessanten Themas. Unter seiner Anleitung und engagierten Betreuung erlernte ich das kritische Interpretieren, Präsentieren und Publizieren wissenschaftlicher Daten auf internationaler Ebene. Sein Optimismus half mir nach manchen von Fehlschlägen geprägten Versuchswochen nie die Freude an der Forschung zu verlieren. Ich bin ihm für all das zu großem Dank verbunden.

Zu ganz besonders großem Dank bin ich auch Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Mempel aus der Medizinischen Klinik III verpflichtet, der mir das Messen der Proben am Durchflusszytometer des Blutdepots zu jeder Tages- und Nachtzeit ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. med. Georg Enders vom Institut für Chirurgische Forschung gilt mein besonderer Dank, der mir ein Epifluoreszenzmikroskop mit Fotoeinrichtung zur Verfügung stellte.

Herrn Oberarzt Dr. med. Guido Henckel von Donnersmarck (Intensivstation des Zentrums für Schwerbrandverletzte, Städtisches Krankenhaus München-Bogenhausen) und seinen Mitarbeitern möchte ich für die freundliche Unterstützung bei dem klinischen Teil der Studie danken.

Herrn Veit Hölzel von der Hölzel Diagnostika GmbH in Köln sei für die kostenlose Überlassung der beiden monoklonalen anti human IL-10 Antikörper B-N10 und JES3-19F1 und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft herzlich gedankt.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Rainer Riesenberg aus der Urologischen Klinik bedanke ich mich für den regen Gedankenaustausch, viele nützliche Ratschläge und die Unterstützung bei der Biotinylierung des monoklonalen anti CD80 Antikörpers.

Ganz herzlichen Dank möchte ich Frau Judith Scholz für die Einführung in die labortechnischen Methoden der Zellkultivierung aussprechen.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Frau Elfi bedanken, die bei jeder Gemütsschieflage für den notwendigen seelischen Ausgleich sorgte und ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

10 LEBENSLAUF

Name: Siegfried Zedler

Geburtsdatum: 4. Mai 1961

Geburtsort: Waiblingen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Wohnort: Rosenbuschstr. 2
80538 München

Eltern: Dr. med. vet. Wilhelm Zedler, Veterinärmediziner
Ruth Zedler, geb. Schwede

Schulbildung: 1967-1971 Grundschule Haimhauserstraße in München
1971-1972 St. Anna Volksschule in München
1972-1982 Luitpoldgymnasium in München – Abitur

Wehrdienst: 01.07.1982 – 30.06.1984 Zeitsoldat an der
Pionierschule und Fachschule des Heeres für
Bautechnik (Prinz-Eugen Kaserne) in München

Studium: 11/1984-11/1990 Studium der Biologie an der Ludwig-
Maximilians-Universität München

25.01.1991: Verleihung des akademischen Grades eines Diplom-
Biologen (Note: „sehr gut“)

- 08/1991 – 09/1991: Faunistische und floristische Kartierungsarbeiten auf Grundstücken der Wildland Gesellschaft mbH
- 01.10.1991 – 30.04.1992: Beschäftigung als Röntgenhelfer an der Chirurgischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 01.07.1992 – 30.06.1993: Beschäftigung als Diplom-Biologe an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München – Klinikum Großhadern (Dr. med. W. Ertel)
- seit 01.07.1993: Beschäftigung als Diplom-Biologe an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München – Klinikum Großhadern (Prof. Dr. med. E. Faist)
Neben dieser Tätigkeit wurde vorliegende Dissertation im gleichen Labor angefertigt.
- 20.03.1995: Promotionsvorprüfung im Rahmen des Promotionsverfahrens zum Doktor der Humanbiologie
- 22.12.1997: Ernennung zum Strahlenschutzbeauftragten der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München – Klinikum Großhadern