

Aus dem Städt. Krankenhaus München-Harlaching

Akademisches Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilians-Universität,  
II. Medizinische Abteilung

Vorstand: Prof. Dr. med. J.E. Scherberich

Monozytäre Expression von CD 14 („Endotoxin-Rezeptor“)  
und proinflammatorische Subpopulationen  
antigenpräsentierender Leukozyten

Durchflusszytometrische Analysen bei Gesunden, Patienten  
mit chronischem Nierenversagen und nach  
Nierentransplantation sowie Patienten mit infektiösen  
Komplikationen

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

vorgelegt von

Heidi Luise Estner

aus

München

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. J. E. Scherberich

Mitberichterstatter: Prof. Dr. S. Endres  
Prof. Dr. H. Ostermann

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: ---

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

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2002

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und spezifische Fragestellung	6
1.1	Grundlagen zu Monozyten und deren Marker	8
1.1.1	CD14 – ein funktionelles Hauptantigen auf Antigen-präsentierenden Zellen	8
1.2	CD14 <sup>++</sup> /16 <sup>+</sup> APC – eine neue Monozytensubpopulation	10
2	CD14	15
2.1	Membrangebundenes CD 14 (mCD14)	15
2.1.1	Membranproteine	15
2.1.2	Hydrophobizität des CD 14-Proteins	16
2.1.3	Zusammenfassung:	17
3	Funktionen des membrangebundenen CD14 (mCD14)	19
3.1	Endotoxin (LPS)- Bindung	19
3.1.1	Klinischer Ausblick:	21
3.2	LBP: das LPS bindende Protein	21
3.3	CD14: Rezeptor für LBP und LPS	23
3.3.1	Spezifische Funktionen des CD14	23
3.3.2	Reduktion der TNF $\alpha$ -Synthese durch anti-LPS-Antikörper	24
3.3.3	CD14 aktiviert TLR-2 undTLR-4-Rezeptoren	26
3.3.4	Eosinophile Granulozyten und CD14	26
3.3.5	Toleranz gegenüber LPS und die Rolle von CD14 bei ihrer Entwicklung	26
3.3.6	LPS-Bindedomäne des CD14-Moleküls	29
3.3.7	Erkennung und Clearance apoptotischer Zellen durch CD14	31
3.3.8	CD14 und grampositive Bakterien	33
4	Lösliches CD14 (sCD14)	39
4.1	sCD14-Formen	39
4.2	Biochemische Charakterisierung und Unterscheidung der sCD14-Formen	40
4.2.1	Elektrophorese	40
4.2.2	Glykosilierung des sCD14	40
4.2.3	Herkunft	42
4.3	Bildungsmechanismen	42
5	Funktionen des löslichen CD14 (sCD14)	44
5.1	Vermeintlich mCD14-negative Zellen?	44
5.1.1	Endothelzellen	44
5.1.2	Zellen der glatten Gefäßmuskulatur	45
5.1.3	Fibroblasten	45
5.1.4	Epithelzellen	45
5.2	Transfer des LPS zum sCD14	46
5.2.1	Die unterschiedlichen Dömänen des sCD14	46
5.3	Direkter und indirekter Aktivierungsweg von Endothelzellen durch LPS	46
5.4	LPS-Bindung an ein 80-kDa-Membranprotein?	47
5.5	Neutralisierung von LPS durch sCD14 in vitro	48
5.6	Lösliches CD14 im Gesamtzusammenhang der Sepsis	48
5.6.1	Lösliches CD14 induziert das Wachstum von B-Lymphozyten	48
5.6.2	Lösliches CD14 im Liquor	49
5.6.3	Lösliches CD14 und humanes Laktoferrin	49
5.6.4	Lösliches CD14 in der Muttermilch	49

	5.6.5	SCD14 im Fruchtwasser	49
6		CD 14 <sup>low</sup> -CD16 <sup>high</sup> -Monozyten	53
	6.1	Phänotypische und funktionelle Analyse	54
	6.2	Reifegrad	55
	6.2.1	CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup> -Zellen als dendritische Zellen	57
	6.2.2	M-DC8-positive Leukozyten sind eine Subpopulation der CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup> -Zellen	57
7		Funktion der CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup> -Monozyten	60
	7.1	Besondere Charakteristika	60
	7.2	Klinische Relevanz von CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup> -Monozyten	61
	7.2.1	CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup> -Monozyten während einer Sepsis	61
	7.2.2	CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup> -Monozyten während einer Hämodialysebehandlung	62
	7.2.3	Das Verhalten der CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup> -Monozyten unter Glukokortikoidtherapie	63
8		Material	65
	8.1	Antikörper	65
	8.2	Chemikalien	65
	8.3	Geräte	65
9		Methoden	66
	9.1	Durchflusszytometrie (FACS)	66
	9.2	Zellsortierung am FACS	66
	9.3	Isolierung und Markierung der Zellen	70
	9.4	Statistische Methoden	71
10		Patienten	72
	10.1	Kontrollkollektiv	72
	10.2	Patienten mit chronischem Nierenversagen	72
	10.3	Patienten nach Nierentransplantation (ntx-Patienten)	73
	10.3.1	Ntx-Patienten mit Mycophenolat (MMF) – Monotherapie	74
	10.3.2	Ntx-Patienten mit Cyclosporin A (CyA) – Monotherapie	74
	10.3.3	Ntx-Patienten mit MMF-CyA-Kombinationstherapie	74
	10.3.4	Verlauf während einer Sepsis	75
11		Ergebnisse	76
	11.1	Kreatinin	76
	11.2	Leukozyten	78
	11.3	C-reaktives Protein	80
	11.4	mCD14-Expression	82
	11.5	CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup> -Monozyten	85
	11.6	Gegenüberstellung der einzelnen Immunsuppressionstherapien	88
	11.6.1	MMF-Monotherapie	88
	11.6.2	Cyclosporin A Monotherapie	92
	11.6.3	Immunsuppression mit Cyclosporin A und Mycophenolat Mofetil-Kombitherapie	96
	11.6.4	Systematische Gegenüberstellung	100
	11.7	Monozytenanzahl	104
	11.7.1	Gesamtzahl der Monozyten	104
	11.7.2	Absolutzahl der CD14+/16+ positiven Monozyten	105
	11.8	Abhängigkeit vom Alter des Transplantates	106
	11.8.1	Leukozyten	107
	11.8.2	C-reaktives Protein	108

---

11.8.3	mCD14-Expression	109
11.8.4	CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup> -Monozyten	110
11.9	Der Verlauf während einer Sepsis	111
	Leukozyten	111
11.9.2	Der Verlauf des C-reaktiven Proteins während einer Sepsis	113
	Der Verlauf der mCD14-Expression während einer Sepsis	115
11.9.4	Der Verlauf der CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup> -Monozyten während einer Sepsis	117
12	Besprechung der Ergebnisse	119
12.1	Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz	119
12.1.1	Ursachen der Mikroinflammation bei chronisch niereninsuffizienten Patienten	119
12.1.2	SCD14 und CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup> - Monozyten	120
12.1.3	Interpretation unserer Ergebnisse	121
12.2	Patienten nach Nierentransplantation	122
12.2.1	Abstoßung des Transplantates	123
12.2.2	Interpretation unserer Ergebnisse	128
12.3	Grundlagen zum Mycophenolat-Mofetil ( <i>Cell Cept</i> <sup>®</sup> )	129
12.3.1	Interpretation unserer Ergebnisse	132
12.4	Grundlagen zum Cyclosporin A (Sandimmun <sup>®</sup> )	133
12.4.1	Interpretation unserer Ergebnisse	135
12.5	Immunsuppression mit Ciclosporin A und Mycophenolat	135
12.5.1	Interpretation unserer Ergebnisse	136
12.6	Patienten mit Sepsis	137
12.6.1	Interpretation unserer Ergebnisse	140
12.7	Kasuistiken (Infekt-Patienten)	143
12.7.1	Kasuistik Harnwegsinfektion	143
12.7.2	Kasuistik Pneumonie	148
12.7.3	Kasuistik Harnwegsinfektion	154
12.7.4	Kasuistik: Pneumonie bei Morbus Wegener	157
12.7.5	Oberflächenmarker auf Monozyten	164
13	Zusammenfassung	169
13.1	Fragestellung	169
13.2	Untersuchungsaufbau	170
13.3	Ergebnisse	171
13.4	Schlußfolgerungen	171

## 1 Einleitung und spezifische Fragestellung

Das „Sepsis-Syndrom“ [SIRS im angloamerikanischen „systemic inflammatory response syndrome] ist die systemische Antwort des Organismus auf eine (bedrohliche) Infektion [Bone 1991]. Der septische Schock ist die schwerwiegendste Manifestation dieses Krankheitsbildes. Die Prävalenz des „Sepsis-Syndroms“ liegt bei etwa 33% stationärer Patienten und bei über 50% der Patienten auf Intensivstationen [Brun-Buisson 2000]. Obwohl die 28-Tage-Mortalität zwischen 10% beim SIRS und 40-60% beim Septischen Schock erreicht, ist der Pathomechanismus dieser Erkrankung bis heute lückenhaft erforscht [Brun-Buisson 2000]. Die Therapie der Sepsis ist um so effizienter, je früher die Patienten behandelt werden. Deshalb muss das Sepsis-Syndrom frühestmöglich erkannt werden. Zu den Parametern zählen Leukozytenzahl, Körpertemperatur und C-reaktives Protein im klinischen Alltag. Dennoch sind alle genannten Meßgrößen störanfällig. So ist beispielsweise das C-reaktive Protein bei Lebererkrankungen nicht verwertbar [Olubuyide, 1997]. Die Leukozytenanzahl wird erheblich durch Grunderkrankungen z.B. Leukämie verändert.

Patienten nach einer Organtransplantation sind besonders infektgefährdet und unterliegen einer erhöhten Morbidität durch das „Sepsis-Syndrom“. Im Anschluss an eine Transplantation ist der Patient auf eine lebenslange Immunsuppression angewiesen, ansonsten würde der Organismus das Spender-Organ abstoßen. Die Medikamente müssen sowohl zelluläre, als auch humorale Abwehrmechanismen unterdrücken. Die Suppression der Immunabwehr des Patienten bedingt aber auch eine erhöhte Infektionsrate. Die Tumorraten bei immunsupprimierten Patienten ist aufgrund der Nebenwirkungen der Medikamente ebenfalls deutlich erhöht. Um das Ausmaß der Immunsuppression zu beschreiben, bedient man sich indirekter Marker (z.B. Serumspiegel eines Immunsuppressivums oder Leukozytenzahl).

**Direkte zelluläre Marker wurden bisher noch nicht hinreichend erforscht und fehlen**

**völlig in der Beurteilung:** Ein „Biomarker“ der Immunsuppression fehlt im klinischen Alltag. Unser Ansatz war, Monozyten und deren Subpopulationen als „zellbiologische Marker“ daraufhin zu untersuchen.

Monozyten spielen eine wesentliche Rolle als Ziel- und Effektorzellen der Antigenerkennung und Infektabwehr. Auf ihnen befinden sich definierte Muster an funktionell wichtigen Oberflächenantigenen. Werden Monozyten aktiviert, so kann sich das Muster der Oberflächenantigene ändern. Daher unterscheidet man funktionell unterschiedliche Phänotypen. Der **proinflammatorische Phänotyp** exprimiert auf seiner Oberfläche CD14 und zusätzlich FcγIIIR (CD16). Im peripheren Blut zirkulieren zum größten Teil Monozyten mit einem CD14<sup>++</sup>-CD16<sup>+</sup>-Phänotyp. Eine kleine Subpopulation von 10 % zeigt aber CD14<sup>+</sup>-CD16<sup>++</sup>-Oberflächenantigene und diese Subpopulation steigt während einer Sepsis rasant an (bis > 30 %).

Uns beschäftigte die Frage, ob diese Subpopulation mit definierten Oberflächenantigenen hilft, eine Infektionskaskade besser zu beschreiben und als „Bio-Marker“ bei immunsupprimierten Patienten hilfreiche Zusatzinformationen liefert. Wir untersuchten deshalb CD14<sup>+</sup>-CD16<sup>++</sup>-Monozyten bei Gesunden und bei Langzeit-immunsupprimierten Patienten. Immunsupprimiert sind Patienten „physiologisch“ mit einer schweren Nierenerkrankung im funktionellen präterminalen Stadium und medikamentös nach einer Nierentransplantation (Jede Nierentransplantation endet nach durchschnittlich 10 Jahren wieder in einer chronischen Transplantatdysfunktion).

**Wir versuchten mit dieser Arbeit folgende Fragen zu beantworten:**

- 1. Wie groß ist der Anteil proinflammatorischer CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>-Monozyten bei Gesunden und Kranken?**

- 2. Leiden Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz im Endstadium unter einer latenten Mikroinflammation und wie wird sie am besten beschrieben?**
- 3. Wie groß ist der Anteil der CD14+CD16++-Monozyten bei immunsupprimierten Patienten (nach Nierentransplantation) ?**
- 4. Wie verhalten sich proinflammatorische Blut-Monozyten im Verlauf einer akuten, infektiösen Komplikation?**

## 1.1 Grundlagen zu Monozyten und deren Marker

### 1.1.1 CD14 – ein funktionelles Hauptantigen auf Antigen-präsentierenden Zellen

Das CD14-Antigen wurde erstmalig während des I. Leukozytenworkshops 1982 beschrieben. Zehn monoklonale Antikörper zeigten eine starke Affinität gegenüber einer homogenen Antigenbande menschlicher Blutmonozyten. Diese Reagenzien wurden in einem „provisorischem Cluster“, CDw14, zusammengefasst [Bernard et al. 1984]. Durch monoklonales Klonen fand man ein kleines Gen von ungewöhnlicher Struktur: 1125 Nukleotide codieren für 375 Aminosäuren, von denen 19 eine N-terminale Signalsequenz bilden [Simmons et al. 1989; Goyert et al. 1988]. Nach Prozessierung, Anlagerung einer PI (Phosphatidylinositol)-Gruppe und Glykosilierung wird CD 14 als Zelloberflächenmolekül exprimiert [Haziot et al. 1988]. CD14 ist über einen „GPI-Linker“ (Glykosylphosphatidylinositol-Anker) an die Membranoberfläche gebunden.



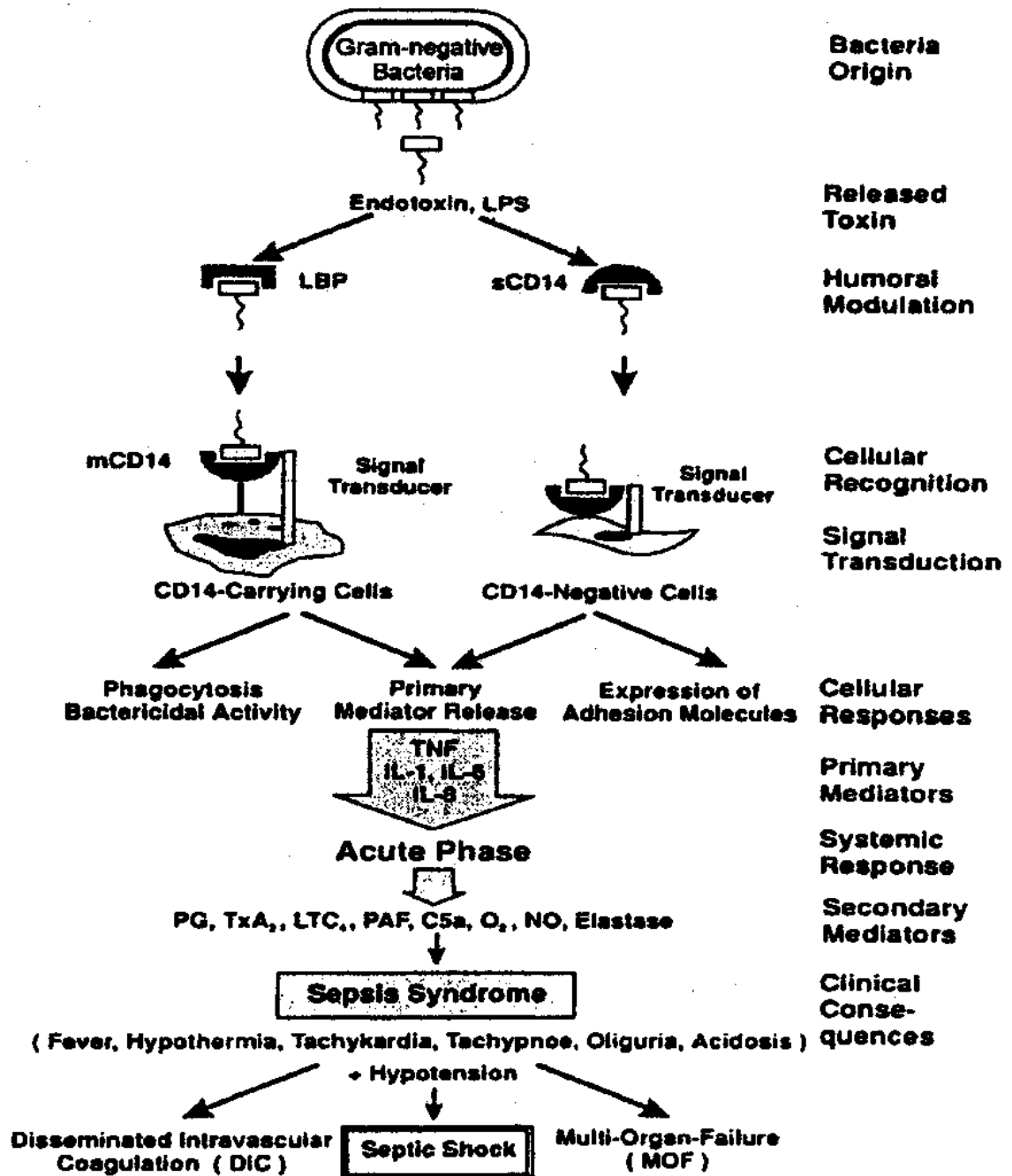


Abbildung 1: Endotoxin-induzierte Signalübertragungswege bei Monozyten (nach Rietschel und Wagner. Pathology of septic shock. Current topics in Microbiology and Immunology, Springer Verlag, Vol. 26, 1996). Es werden schon sehr früh sCD14 und mCD14 aktiviert.

CD 14 wird auf der Zelloberfläche von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert. [ Bernard et al. 1984b ; Bernard et al. 1984c; McMichael 1986]. Auf peripheren Blutmonozyten werden ca. 50000-100000 CD 14-Moleküle pro Zelle exprimiert [Van Voorhis et al. 1983; Couturier et al. 1991]. Auf peripheren Blutneutrophilen ist die Ausprägung vergleichsweise zehnmal niedriger [Wright et al.1991].

Über 10 Jahre wurde CD14 ausschließlich aufgrund seiner Lokalisierung auf myeloiden Zellen als Zellmarker definiert. 1990 wiesen Wright et al. erstmals auf eine Rezeptorfunktion von CD14 für LPS (Lipopolysaccharid, Syn.: Endotoxin), ein Bestandteil gramnegativer Bakterien, hin [Wright et al. 1990]. Bei gramnegativen Infektionen löst LPS oder Endotoxin in vivo eine lange unspezifische Kaskade von Vorgängen aus, die zur Sekretion verschiedener potenter Mediatoren und Zytokine primär durch aktivierte Monozyten und Makrophagen führt. Die Überproduktion dieser Effektormoleküle trägt wesentlich zur Pathophysiologie des endotoxinvermittelten Kreislaufschocks bei.

Die vorgelegte Arbeit hat zum Ziel, diese Theorie zu bestätigen und CD14 als verwertbaren Parameter des „immunologischen Aktivitätszustandes“ zu verifizieren. Die Frage, ob CD14 zum „immunologischen Monitoring“ verwendet werden kann, soll zum ersten Mal klinisch untersucht werden.

## 1.2 CD14<sup>++</sup>/16<sup>+</sup>APC – eine neue Monozytensubpopulation

CD 16 ist der funktionell wichtige Fc –Rezeptor Typ III (Fc $\gamma$ RIII, IgG-Rezeptor Typ III). Er existiert in zwei verschiedenen Formen, die jeweils von einem eigenen Gen codiert werden [van de Winkel et Anderson 1991; van de Winkel et Capel 1993]:

1. als Transmembranprotein, wie es auf Makrophagen und NK-Zellen vorliegt,
2. als GPI-verankertes Protein, wie es auf Granulozyten vorliegt.

CD 16 ist ein Rezeptor mit niedriger Affinität für monomeres IgG, bindet aber polymeres IgG oder Immunkomplexe sehr effizient [Clarkson, 1988]. Er vermittelt wichtige immunphysiologische Funktionen wie antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität [Fanger, 1989], Beseitigung zirkulierender Immunkomplexe, Superoxidbildung [Trezzini et al., 1990] und ist auch an der Signaltransduktion beteiligt [Wirthmüller et al. 1992; Masuda et al., 1993]. Die Blockade dieses Rezeptors durch einen anti-CD16 mAK hemmt in vivo die Beseitigung opsonierter Zellen, was auf den Einfluss dieses Membranrezeptors bei der Beseitigung von Immunkomplexen bei Infektionen hinweist [Clarkson et al., 1986].

Etwa 90 % der Monozyten zeigen eine starke CD14- und eine schwache CD16-Expression ( $CD14^{high}CD16^{low}$ ) und repräsentieren die Hauptpopulation zirkulierender „Blut-Monozyten“. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorter (FACS)-Analyse) und der Zweifarben-Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 und CD16 konnten Ziegler-Heitbrock et al. [1993;1996] eine kleine Monozyten-Population identifizieren, die eine niedrigere CD14- und einen höhere CD16 –Expression aufweist als die Hauptfraktion der peripheren Monozyten ( $CD14^{low}CD16^{high}$ ).  $CD14^{low}CD16^{high}$  –Zellen sind reifere Monozyten mit Eigenschaften von Gewebemakrophagen. [Ziegler-Heitbrock et al. 1994]. Diese Monozytensubpopulation wird mit etwa 5% [Passlick et al. 1989] bis 10 % [Ziegler-Heitbrock 1996] an der Gesamtpopulation angegeben. Bei unserer eigenen Untersuchung fanden wir bei Gesunden etwa 8% dieser Subpopulation, wobei diese bei Infektionen stark ansteigen kann (>30%). Wir untersuchten, ob CD14/16 als Parameter zum „immunologischen Monitoring“ geeignet ist.

## Literatur

- Bernard, A., Boumsell, L., Dausset, J., Milstein, C., Schlossman, S.F. Leucocyte typing: Human leucocyte differentiation antigens detected by monoclonal antibodies. Specification- Classification- Nomenclature. Springer-Verlag, New York, S. 82, 1984a
- Bernard, A., Boumsell, L., Dausset, J., Milstein, C., Schlossman, S.F. Leucocyte typing: Human leucocyte differentiation antigens detected by monoclonal antibodies. Specification- Classification- Nomenclature. Springer-Verlag, New York, S. 424-433, 1984b
- Bernard, A., Boumsell, L., Dausset, J., Milstein, C., Schlossman, S.F. Leucocyte typing: Human leucocyte differentiation antigens detected by monoclonal antibodies. Specification- Classification- Nomenclature. Springer-Verlag, New York, S. 404-410, 1984c
- Bone, R.C. The pathogenesis of sepsis. *Ann. Intern. Med.* 115:457-469, 1991
- Brun-Buisson, C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 26 Suppl 1: S.64.74, 2000
- Clarkson, S.B., Kimberley, R.P., Valinsky, J.El, Witmer, M.D., Bussel, J.B., Nachman, R.L., Unkeless, J.C. Blockade of clearance of immune complexes by an anti-FcR monoclonal antibody. *J.Exp. Med.* 164: 474-489,1986
- Clarkson, S.B., Ory, P.A. Developmentally regulated IgG Fc receptors on cultured human monocytes *J. Exp. Med.* 167: 408-417, 1988
- Fanger, M.W., Shen, S., Graziano, R.F., Guyre, P.M. Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol. Today* 10: 92-99, 1989
- Goyert, S.M., Ferrero, E., Rettig, W.J., Yenamandra, A.K., Obata, F., Le Beau, M.M. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science* 239:497-500, 1988

- Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M.G., Silber, R., Goyert, S.M. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J. Immunol.* 141:547-552, 1988
- Masuda, M., Verhoeven, A.J., Roos, D. Tyrosine phosphorylation of a  $\gamma$ -chain homodimer associated with Fc $\gamma$ RIII (CD16) in cultured human monocytes. *J. Immunol.* 151:6382-6388, 1993
- McMichael, A.J. *Leucocyte typing III: White cell differentiation antigens.* Oxford Univ. Press, S. 576-602, 1986
- Olubuyide, I.O., Festing, M.F., Chapman, C., Higginson, J., Whicher, J.T. Discriminant analysis of biochemical parameters in liver disease. *Trop. Gastroenterol.* 18(1):15-9, 1997
- Passlick, B., Flieger, D., Ziegler-Heitbrock, H.W.L. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74: 2527-2534, 1989
- Rietschel, E.T., Wagner, H. *Pathology of septic shock. Current topics in Microbiology and Immunology*, Springer Verlag, Vol. 26, 1996
- Simmons, D.L., Tan, D.G., Nicholson-Weller, A., Seed, B. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 73:284-289, 1989
- Trezzini, C., Jungi, T.W., Spycher, M.O., Maly, F.E., Rao, P. Human monocyte CD36 and CD16 are signaling molecules. Evidence from studies using antibody-induced chemiluminescence as a tool to probe signal transduction. *Immunology* 71:29-37, 1990
- Van de Winkel, J.G.J., Anderson, C.L. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J. Leuk. Biol.* 49: 511-524, 1991
- Van de Winkel, J.G.J., Capel, P.J.A. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol. Today* 14:215-221, 1993

- Van Voorhis, W.C., Steinmann, R.M., Hair, L.S., Luban, J., Witmer, M.D., Koide, S., Cohn, Z.A. Specific antimononuclear phagocyte monoclonal antibodies. Application to the purification of dendritic cells and the tissue localization of macrophages. *J. Exp. Med.* 158:126-145, 1983
- Wirthmüller, U., Kurosaki, T., Murakami, M.S., Ravetch, J.V. Signal transduction of Fc $\gamma$  (CD16) is mediated through the  $\gamma$  chain. *J. Exp. Med.* 175:1381-1390, 1992
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Hermanowski-Vosatka, A., Rockwell, P., Detmers, P.A. Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: Dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J. Exp. Med.* 173:1281-1286, 1991
- Ziegler-Heitbrock, H.W.L. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> subpopulation. *Immunol. Today* 17: 424-428, 1996
- Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Schraut, W., Wendelgaß, P., Strobel, M., Sternsdorf, T., Weber, C., Aepfelbacher, M., Ehlers, M., Schütt, C., Haas, J.G. Distinct patterns of differentiation induced in the monocytic cell line Mono Mac 6. *J. Leukoc. Biol.* 55: 73-80, 1994
- Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Fingerle, G., Ströbel, M., Stelter, F., Schütt, C., Passlick, B., Pforte, A., A novel subset of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur. J. Immunol.* 23: 2053-2058, 1993

## 2 CD14

CD 14 kommt im Organismus in zwei Formen vor: Neben der membrangebundenen Form auf myeloiden Zellen (mCD14) ist im Serum auch ein lösliches Molekül (sCD14) vorhanden. mCD14 ist an der LPS-induzierten Zellaktivierung von Monozyten/Makrophagen beteiligt, wohingegen sCD14 an der Aktivierung mCD14-negativer Zellen, wie z.B. Endothel- und Epithelzellen, partizipiert und wahrscheinlich an der Neutralisierung des LPS beteiligt ist.

### 2.1 Membrangebundenes CD 14 (mCD14)

#### 2.1.1 Membranproteine

Membranproteine können auf vielfältige Weise mit einer Zellmembran assoziiert sein. Sie können die gesamte Membran mit sogenannten transmembranen Domänen einmal oder auch mehrmals durchspannen. Auf der intra-, als auch auf der extrazellulären Seite finden sich daher unterschiedlich große Abschnitte des Proteins. Die Aminosäuren mit ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität geben vor, wo die Proteine innerhalb des Lipidbilayers gehalten werden.

In Ausrichtung des Zytosols oder zum Extrazellulärraum befinden sich Membranoberflächenproteine. Manche von ihnen werden während oder nach der Translation kovalent mit Lipiden verknüpft, die sie in der Membran verankern. Andere assoziieren sich über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit anderen Membranproteinen und werden so in Position gehalten (Membran-Domänen-Modell nach Singer).

Alle Proteine besitzen Signalsequenzen, die der Proteinsynthese- und Sortiermaschinerie ihren Bestimmungsort in der Zelle angeben. Bei den Membranproteinen befindet sich ein derartiges Signalpeptid am Aminoende: Es besteht aus einem hydrophoben Kern aus 7-13 Aminosäuren, der von einigen relativ hydrophilen und einer oder mehreren basischen Aminosäuren flankiert wird. Dieses Signalpeptid hat zwei Aufgaben: Es leitet das Ribosom, das gerade mit der Synthese des Proteins begonnen hat, zum Endoplasmatischen Retikulum (ER). Dort löst es als „Start-Transfer-Signal“ den Transfer des Proteins durch die ER-Membran aus. Dieses N-terminale Sequenzstück verbleibt im Translokator der rER-Membran, während die stetig wachsende Polypeptidkette durch diesen hindurch in das Innere des endoplasmatischen Retikulums geschoben wird. Ein hydrophobes „Stop-Transfer-Signal“ stoppt die Translokation und verankert das Protein in der rER-Membran. Das aminoterminal ER-Signalpeptid des Proteins wird nach Beendigung der Proteinsynthese von einem Enzym im ER abgespalten. Ist der Bestimmungsort die Plasmamembran, so wird es dort zu einem Membranprotein mit einer transmembranen Ebene. Vom rER schnüren sich „coated vesicles“ ab und transportieren die Proteine über den Golgiapparat zu ihrem endgültigen Bestimmungsort. Hier fusionieren die Vesikel mit der Membran, wobei sich das Aminoende des Proteins nun im Extrazellulärraum befindet [Stryer 1994; Alberts et al. 1995].

### 2.1.2 Hydrophobizität des CD 14-Proteins

Für das CD14-Protein wurde ein Hydrophobizitätsprofil erstellt. Am Aminoende des Proteins befindet sich eine hydrophobe Signalsequenz. Eine zweite hydrophobe Sequenz - wie sie sonst für transmembranale Domänen Voraussetzung ist - ließ sich nicht nachweisen. Dies bedeutet, dass CD14 kein Transmembranprotein sein kann, sondern über einen alternativen Mechanismus an die Monozyten-Membran gebunden sein muss [Haziot et al. 1988]. Haziot et al. [1988] zeigten, dass es sich hierbei um einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker handelt. Dieser Verankerungsmechanismus besteht aus der kovalenten Bindung des Proteins an ein Oligosaccharid und der glykosidischen Bindung dieses Oligosaccharides an ein Phosphatidylinositol (siehe Abbildung). Diese Membranglykophospholipide sind auch für die „Arretierung“ vieler anderer Oberflächenantigene verantwortlich [Low et al. 1988; Low 1987].

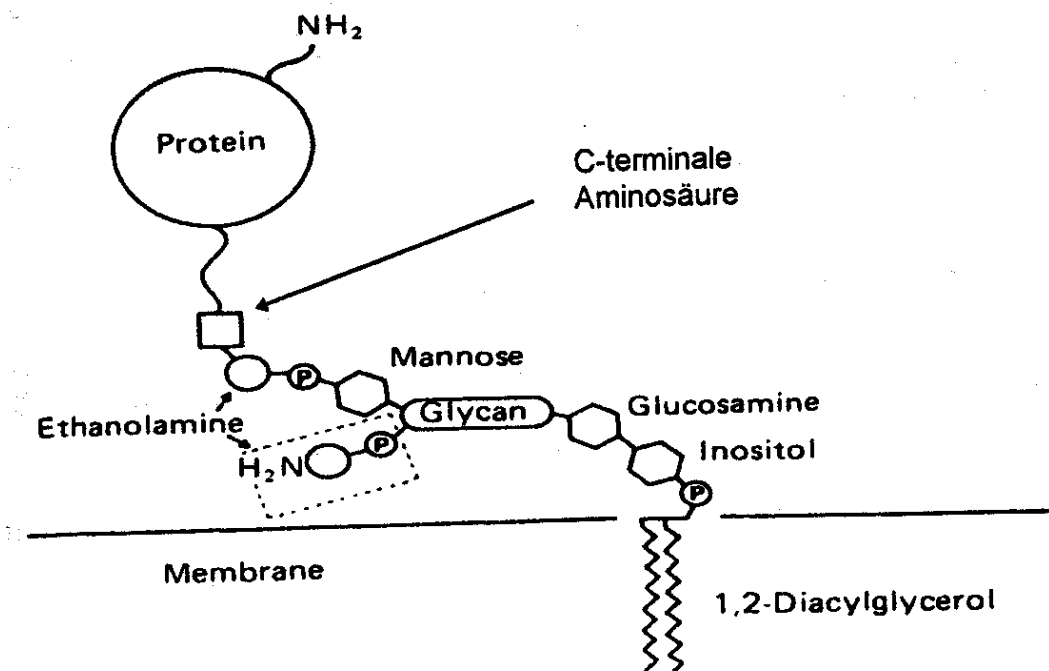


Abbildung 2: Aufbau des Glykosyl-Phosphatidylinositol - Ankers (aus Low, M.G., Saltiel, A.R. Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. Science 239:258-275, 1988)

Der GPI-Anker ist aus drei Regionen aufgebaut:

1. Phosphatidylinositol: Für die Verankerung in der Membrandoppelschicht ist der 1,2-Diacylglycerol-Anteil verantwortlich. Eine Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) kann das Protein von der Membran abspalten.
2. Glykan: Die Verbindung des Glykans an Phosphatidylinositol erfolgt über eine glykosidische Bindung an Glucosamin. Das nicht reduzierende Ende



des Glykans enthält Mannose-6-Phosphat, über dessen Phosphatgruppe der Kontakt zum Ethanolamin hergestellt wird.

3. Ethanolamin: Die  $\alpha$ -Carboxylgruppe der C-terminale Aminosäure des zu verankernden Proteins ist an der Aminogruppe des Ethanolamins gebunden.

CD14 kann durch Phosphatidylinositol-PhospholipaseC (PI-PLC) von der Membranoberfläche entfernt werden, wenn auch nicht vollständig [Haziot et al. 1988; Bazil et al. 1989]. Bazil et al. beobachteten eine Verringerung der CD14-Oberflächenexpression um das Fünffache. Mit Hilfe der ELISA-Sandwich Technik schätzten sie, dass durch PI-PLC pro Monozyt ungefähr  $2 \times 10^5$  CD14 Moleküle freigesetzt werden. Als Erklärung für die nur partielle CD14-Freisetzung von der Zelloberfläche werden Konformationsänderungen oder chemische Substitutionen vorgeschlagen, die die Zugänglichkeit des Enzyms zur Hydrolysestelle reduzieren [Low et Saltiel 1988]. Es könnten auch die Phosphatidylinositol-Phospholipase resistenten CD14-Moleküle durch eine transmembrane Domäne verankert sein, wie dies für die GPI-Proteine LFA-3 (Lymphocyte function-associated antigen 3) und NCAM (neutrales Zelladhäsionsmolekül) spekuliert wird [Haziot et al. 1988]. Diese beiden Proteine sind entweder über einen transmembranen Abschnitt oder einen GPI in der Membran verankert. Deshalb findet man in ihren Zellen zwei verschiedene mRNA-Spezies. Da im CD14 weder zwei verschiedene mRNA-Spezies, noch eine transmembrane Domäne gefunden werden konnten, scheint diese Theorie für CD 14 nicht zutreffend zu sein.

### 2.1.3 Zusammenfassung:

1. Hydrophobizität: Das CD14 Molekül hat nur eine stark hydrophobe Sequenz am N-terminalen Ende. Es ist kein Transmembranprotein.
2. Verankerung: CD14 ist über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker in die Membranmatrix integriert.

## Literatur:

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1995
- Bazil, V., Baudys, M., Hilgert, I., Stefanova, I., Low, M.G., Zbrozek, J., Horejsi, V. Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoproteine CD14. Mol.Immunol. 26:657-662, 1989
- Haziot, A., Goyert, S.M. Biosynthesis of CD14. Blood 74, Suppl. 1:335a, 1989
- Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M.G., Silber, R., Goyert, S.M. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol inkage. J. Immunol. 141:547-552, 1988
- Low, M.G. Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. Biochem. J. 244:1-13, 1987
- Low, M.G., Saltiel, A.R. Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. Science 239:258-275, 1988
- Stryer, L. Biochemie. Spektrum Akad. Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994

### **3 Funktionen des membrangebundenen CD14 (mCD14)**

#### **3.1 Endotoxin (LPS)- Bindung**

Breitet sich eine Infektion mit gramnegativen Erregern aus, so kann dies zum septischen Schock führen. Die Prävalenz der Sepsis ist vor allem bei Patienten auf Intensivstationen hoch und wird mit bis zu 50 % angegeben [Brun-Buisson2000]. Entsprechend hoch sind die Mortalitätsraten [Danner et al.1991; Rietschel und Wagner 1996]. Die klinischen Symptome sind immer ähnlich und unabhängig vom infizierenden Bakterium. Gemeinsames Merkmal der gramnegativen Sepsis ist die Gegenwart von Endotoxin (Lipopolysaccharid = LPS). LPS ist ein Glykoprotein der äußeren Membranschicht gramnegativer Bakterien.

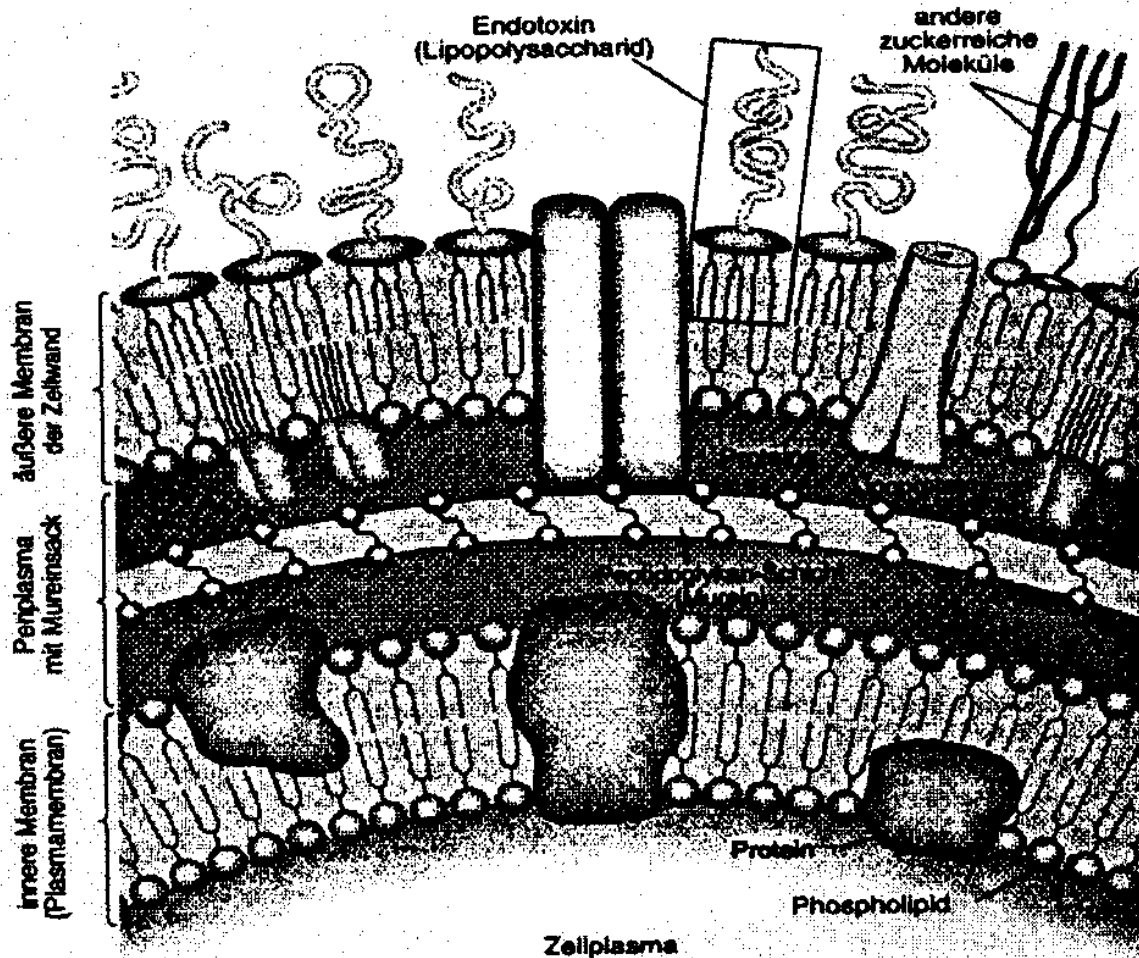


Abbildung 3: Aufbau der gramnegativen Bakterienwand (aus Rietschel, E.T., Brade, H. Bakterielle Endotoxine. Spektrum der Wissenschaft 1 : 34-42, 1993).

LPS besteht aus drei Teilen:

1. Lipid A: ein Glucosamindisaccharid, dessen OH-Gruppen mit C12-, C14, und C16-Fettsäuren verestert sind. Dieser Teil hat hydrophobe Eigenschaften und verankert das Molekül in der bakteriellen Membran. Außerdem ist er für die toxische Wirkung des LPS verantwortlich. Es wird untersucht, ob man einen spezifischen Lipid-A-Antagonisten (E5531) pharmakologisch nutzbar machen und ihn zur medikamentösen Therapie der Sepsis einsetzen kann [Asai1999].
2. Kernzone: Sie wird unterteilt in eine innere Kernzone mit Heptose und 2-Keto-Desoxy-Octonsäure und eine äußere Kernzone mit verzweigten Ketten aus Glucose, Galaktose und N-Acetylglukosamin.
3. O-spezifische Seitenketten: Lange Ketten sich wiederholender Oligosaccharide in einer Abfolge, die von Bakterienstamm zu Bakterienstamm variiert. Hieraus resultiert eine große Anzahl von Antigenvarianten. Diese Heteropolysaccharidketten sind stammspezifisch und repräsentieren die sogenannten O-Antigene.

LPS interagiert mit Zellen des Wirtes, besonders mit solchen monozytären Ursprungs (Monozyten, Makrophagen). Es kommt zur Induktion der Synthese und Freisetzung entzündlicher Mediatoren wie Zytokine (z.B.  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, IL-6), toxischen Sauerstoffverbindungen und hydrolytischen Enzymen [Nathan 1987]. Sie erhöhen die Leukozytenadhärenz an Endothelzellen, sie bewirken Gerinnungsstörungen und Fibrinogenablagerungen in vielen Organen. Auch Fieber, Hypotonie und Veränderungen im zellulären Energiestoffwechsel werden durch sie ausgelöst. Dies alles kann in das Vollbild des septischen Schocks oder in das „Multiorganversagen“ münden [Ziegler 1988a; 1988b]. Hochgereinigtes LPS kann Monozyten ab einer Konzentration, die noch im picogramm Bereich liegt, stimulieren. Während einer Sepsis steigt das LPS auf etwa 300 pg/ml an (Median). Nur bei nicht genesenden Patienten steigt im Beobachtungszeitraum von 28 Tagen die maximale Konzentration des LPS auf 515 pg/ml an [Opal 1999]. Dies macht LPS zu einem äußerst potenten Monozytenaktivator.

### 3.1.1 Klinischer Ausblick:

Van Oosten et al. [2001] konnten nachweisen, dass Apolipoprotein E (apoE) LPS binden kann, indem es LPS von den Makrophagen wieder zurück in die Hepatozyten dirigieren kann. ApoE ist ein Modulator im Lipidmechanismus. ApoE kann bei der Behandlung der Sepsis die LPS-induzierte Produktion von Zytokinen verhindern. Somit könnte in Zukunft ein rekombinant hergestelltes apoE therapeutisch genutzt werden [Van Oosten 2001].

## 3.2 LBP: das LPS bindende Protein

Das Akute-Phase Protein LBP wird in Hepatozyten synthetisiert. Es besteht aus einer Polypeptidkette mit 452 Aminosäuren, darunter vier Cysteine, fünf potentielle Glykosilierungsstellen und eine hydrophobe Signalsequenz am N-Terminus [Schumann et al. 1990]. Sein Molekulargewicht beträgt 60 kDa. Normales Serum enthält etwa 4,1 µg/mL LBP. Während einer Sepsis steigt der Wert auf 31,2 µg/mL an; verstirbt der Patient in der Sepsis, so steigt LBP nicht weiter an, so dass der Absolutwert der LBP-Konzentration nicht mit der Schwere der Erkrankung korreliert werden darf [Opal 1999].

LBP bildet mit LPS hochaffine Komplexe [Tobias et al 1989]. Die Bindungsstelle des LBP für LPS liegt aminoterminal im Molekül, während die Domäne für die Wechselwirkung eher carboxyterminal lokalisiert ist [Han et al. 1994]. Das LBP-Gen überspannt schätzungsweise 28,5 kb und es besteht aus 14 Exons. Das LPS bindende Motiv liegt auf Exon 3 und 4 [Hubacek 1997].

Die Synthese des LBP in den Hepatozyten wird reguliert durch LPS, IL-1,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 und Glucokortikoiden. Behandelt man die Hepatozyten in vivo mit LPS vor, so wird deren Synthese von LPS, TNF und IL-1 primiert, um die Synthese von LBP deutlich zu beschleunigen. Hierbei wird sowohl die Protein- als auch die mRNA-Ebene induziert [Wan 1995].

Einige kationische, antimikrobielle Peptide binden LPS. Scott et al. [2000] bestätigten, dass solche Peptide die Bindung von Lipopolysacchariden an LBP blockieren können. Die Fähigkeit solcher kationischen Peptide, die Bindung zwischen LBP und LPS verhindern zu können, korrelierte mit deren Fähigkeit, auch die LPS-induzierte TNF-alpha Produktion zu blockieren.

LBP bekommt damit die Funktion eines Trägerproteins für LPS im Serum. Es bringt LPS z.B. zur Oberfläche von Monozyten und kontrolliert somit die LPS-abhängige Antwort dieser Zellen.

Vreugdenhil et al. konnten 2001 zeigen, dass LBP bei Gesunden mit LDL/VLDL gebunden zirkuliert. Obwohl LBP in vitro mit hochgereinigtem apoA-I reagiert, so konnte im Serum keine Bindung mit apoA-I oder HDL nachgewiesen werden. Während einer Sepsis werden sowohl LBP-LPS-Komplexe an LDL/VLDL gebunden, als auch freies LPS und LBP. Der LBP-LDL/VLDL-Komplex ist wichtig für die Erkennung und Bindung von LPS.

#### Literatur

- Asai, Y., Nozu, Y., Ikeuchi, T., Narazaki, R., Iwamoto, K., Watanabe, S. The effect of the lipid A analog, E5531 on fever induced by endotoxin from Escherichia coli. *Biol. Pharm. Bull.* 22(4): 432-434, 1999
- Danner, R.L., Elin, R.J., Hosseini, J.M., Wesley, R.A., Reilly, J.M., Parillo, J.E. Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 99:169-175, 1991
- Hubacek, J.A., Buchler, C., Aslanidis, C., Schmitz, G. The genomic organization of the genes for human lipopolysaccharide binding protein (LBP) and bacteridial permeability increasing protein (BPI) is highly conserved. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236(2): 427-430, 1997
- Nathan, C.F. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79:319-323, 1987
- Opal, S.M., Scannon, P.j., Vincent, J.L., White, M., Carroll, S.F., Palsardy, J.E., Parejo, N.A., Pribble, J.P., Lemke, J.H. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J. Infect. Dis.*, 180(5): 1584-1589, 1999
- Rietschel, E.T., Brade, H. Bakterielle Endotoxine. *Spektrum der Wissenschaft* 1 : 34-42, 1993
- Rietschel, E.T., Wagner, H. Pathology of septic shock. *Current topics in Microbiology and Immunology*, Springer Verlag, Vol. 26, 1996
- Schumann, R.R., Leong, S.R., Flaggs, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D., Mathison, J.C., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249: 1429-1431, 1990
- Scott, M.G., Vreugdenhil, A.C., Buurman, W.A., Hancock, R.E., Gold, M.R. Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *J. Immunol.* 164(2):549-553, 2000
- Tobias, S.P., Soldau, K., Ulevitch, R.J. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein, *J. Biol. Chem.* 264: 10867-10871, 1989
- Van Oosten, M., Rensen, P.C., Van Amersfoort, E.S., Van Eck, M., Van Dam, A.M., Breve, J.J., Vogel, T., Panet, A., Van Berkel, T.J., Kuiper, J. Apolipoprotein E protects

against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. An new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis. *J.Biol. Chem.* 276(12):8820-8824, 2001

- Vreugdenhil, A.C., Snoek, A.M., Van't Veer, C., Greve, J.W., Buurman, W.A. LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhanced endotoxin –LDL/VLDL interaction. *J.Clin. Invest.*, 107(2):225-234, 2001
- Wan Y., Freeswick, P.D., Khemlani, L.s., Kispert, P.H., Wang, S.C., Su, G.L., Billiar, T.R. Role of lipopolysacchride (LPS), interleukin-1, interleukin-5, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats. *Infect. Immun.* 63(7): 2435-2442, 1995
- Ziegler, E.J. Perspective. Protective antibody to endotoxin core: the emperors new clothes? *J. Infect.Dis.* 158:286-290, 1988a
- Ziegler, E.J. Tumor necrosis factor in humans. *N. Engl. J. Med.* 318: 1533-1535, 1988b

### 3.3 CD14: Rezeptor für LBP und LPS

CD14 ist der wichtigste Rezeptor für gram-negative bakterielle Lipopolysaccharide. Das akute Phase Protein LBP katalysiert die Bindung von LPS oder Bakterien an CD14. Beide Proteine nehmen somit wichtige Rollen in der Aktivierung der Immunantwort und in der Erkennung einer Infektion ein. Die durch CD14 und LBP ausgelösten Interaktionen zwischen LPS und/oder Bakterien mit Monozyten/Makrophagen stimulieren eine immunologische Kaskade, die klinisch als „systemische Immunantwort“ (systemic inflammatory response syndrome =SIRS) imponiert. Da unter bestimmten Umständen das SIRS bis zum septischen Schock und Multiorganversagen fortschreiten kann, bleiben CD14 und LBP als mögliche Angriffsstellen für medikamentöses Eingreifen offen [Stelter 1999]

#### 3.3.1 Spezifische Funktionen des CD14

Wright et al. wiesen 1990 nach, dass das Monozytenoberflächenmolekül CD14 als Rezeptor für LBP-LPS besetzte Partikel dient. Besetzt man die CD14-Moleküle mit blockierenden anti-CD14 monoklonalen Antikörpern (also Antikörpern, die die Ligandenbindungsstelle des Rezeptors verdecken), so können keine LBP-LPS-Komplexe mehr gebunden werden. Verwendet man dagegen nichtblockierende anti-CD14 monoklonale Antikörper, so wird die Bindung der LBP-LPS-Moleküle nicht beeinträchtigt. Mit PI-PLC (Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C) können fast alle CD14 Moleküle von der Zelloberfläche entfernt werden; in gleichem Maße nimmt die Bindung gegenüber LBP-LPS-Komplexen ab.

LBP ist für die verstärkte Bindung von LPS an CD14 verantwortlich [Heumann 1992].

Monoklonale Antikörper gegen murines LPS-bindendes Protein schützen vor tödlicher Endotoxämie. Le Roy et al. führten hierzu Studien an Mäusen durch. In vivo schützten

dabei monoklonale Antikörper, die die Bindung von LPS an LBP verhindern und Antikörper, die die Bindung von LPS/LBP-Komplexe an CD14 unterbinden, vor einer Endotoxämie. Antikörper, die nur die LBP-Aktivität verhinderten, bewirkten hingegen keine Effekte [Le Roy et al. 1999]. Die selbe Arbeitsgruppe stellte die Wichtigkeit von LBP und CD14 nocheinmal mit einer Studie heraus: Mäuse, die mit monoklonalen Antikörpern vorbehandelt wurden, die zum einen CD14 und zum anderen LBP neutralisieren konnten, zeigten eine verzögerte TNF-alpha Produktion und starben innerhalb von 24 Stunden in einer Sepsis. Eine Blockade der TNF $\alpha$ -Produktion konnte den Tod der Tiere nicht verhindern, aber die Vorbehandlung mit TNF $\alpha$  schützte sie, sowohl mit LBP- als auch mit CD14-Blockade [le Roy 2001].

LPS induziert die Synthese und Sekretion verschiedener Entzündungsmediatoren wie z.B. TNF $\alpha$ . Wenn CD14 ein physiologischer Rezeptor für LPS ist, muss er zwangsläufig an der Induktion der TNF $\alpha$ -Synthese beteiligt sein. Versuche von Whright et al. [1990] zeigten, dass LPS in einer Konzentration von 1 ng/ml die TNF $\alpha$ -Synthese induzieren kann. Die Synthese kann durch die Zugabe blockierender anti-CD14 monoklonaler Antikörper (3C10 oder 60b) fast vollständig gehemmt werden.

Nach Eintritt von LPS in den Blutkreislauf wird es schnell an LBP gebunden, es entstehen LBP-LPS-Komplexe. Diese Komplexe werden von CD14-Molekülen auf mononukleären Zellen erkannt und die TNF $\alpha$ -Synthese und Sekretion wird induziert. Ohne LPS wird LBP nicht von den Phagozyten gebunden [Wright et al. 1989].

Dass die Funktion des CD14 weitreichender sein muss, als lediglich LPS an die Zelloberfläche zu bringen, bewiesen 1999 Tapping et al.: Sie kreierte ein transmembranes und glykosylphosphatidylinositol-beladenes Protein. Dieses konnte LPS binden und es zu anderen Molekülen transportieren. Es wurden Fibroblasten Chinesischer Hamsteroovarien (CHO) und Zellen der U373-Astrogliazelllinie einander gegenübergestellt, die zum einen mCD14 und zum anderen membrangebundenes LBP (mLBP) beinhalten. Unter Serum-freien Bedingungen reagierten CHO und U373-Zellen, die mCD14 trugen, bereits bei einer Konzentration von weniger als 0,1 ng/ml LPS. Die mLBP-tragenden Zellen reagierten unter Serum-freien Bedingungen selbst bei einer Konzentration von 100 ng/dl LPS nicht. Die Reaktion wurde definiert als Aktivierung von NF-kappaB und als Produktion von ICAM und IL-6. So konnte bewiesen werden, dass mLBP nicht die selben zellulären Antworten auslösen kann, unabhängig von CD14.

CD14 ist verantwortlich für die Interaktion von LPS mit Monozyten und mit Neutrophilen. Die Neutrophilen reagieren auf CD14 mit der Freisetzung von „Superoxid“ [Shapira 1995]. Monozyten setzen ihrerseits Sauerstoffradikale frei. LPS löst direkt die Freisetzung der Radikale aus [Landmann 1995].

### 3.3.2 Reduktion der TNF $\alpha$ -Synthese durch anti-LPS-Antikörper

Gibt man einem Serum anti-LPS-Antikörper zu, so wird die Bindung von LPS an Monozyten nicht vollständig verhindert. LPS scheint jedoch zusätzlich über andere Rezeptoren als CD14 zu reagieren. Dies bewirkt eine fast vollständige Abnahme der TNF $\alpha$ -Synthese. Bei Zugabe größerer Mengen (>10 ng/ml) waren die anti-LPS-Antikörper nicht mehr im Stande, die Synthese von TNF $\alpha$  herabzusetzen. In einem Serum mit anti-LPS-Antikörpern konkurrieren also LBP und anti-LPS-Antikörper um LPS. Nur wenn sich LBP-LPS-Komplexe bilden und den CD14-Rezeptoren präsentiert werden, erfolgt eine deutliche Induktion der TNF $\alpha$ -Synthese. Die Induktion unterbleibt dagegen, wenn LPS an anti-LPS-Antikörper bindet und zu anderen Rezeptoren auf der Monozytenoberfläche



dirigiert wird. Es könnte sich hier möglicherweise um einen Mechanismus handeln, mit dem Antikörper die  $TNF\alpha$ -Sekretion in vivo während einer gramnegativen bakteriellen Infektion unterdrücken. In Gegenwart von anti-LPS-Antikörpern, z.B. bei einem entsprechend konditionierten Menschen, kommt den Monozyten somit hauptsächlich eine „scavenger“-Funktion zu. Im Gegensatz hierzu würden Monozyten, die über den LBP-LPS-CD14-Weg aktiviert wurden, auf LPS mit der Produktion von  $TNF\alpha$  und anderen Zytokinen antworten, was wiederum Abwehrreaktionen gegen die Infektion in Gang setzt.

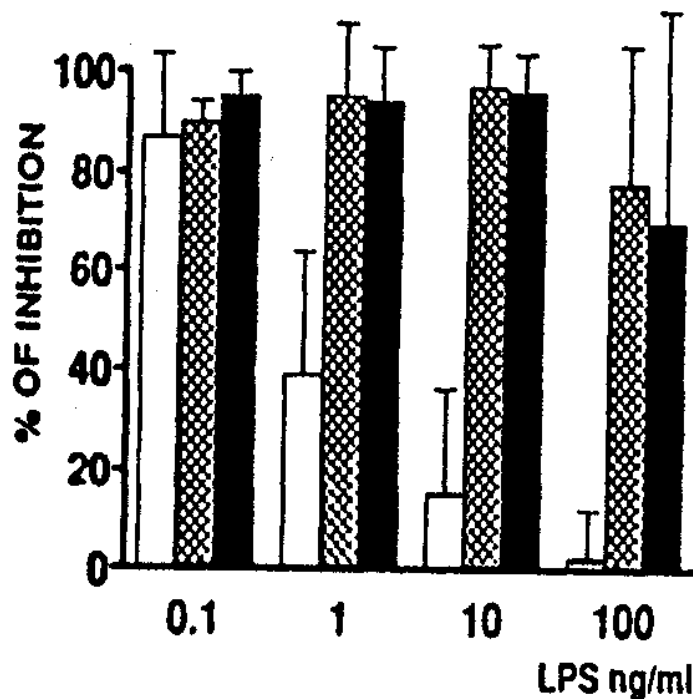


Abbildung 4:

Hemmung der  $TNF\alpha$ -Sekretion von menschlichen Monozyten durch anti-LPS und anti-CD14 Antikörper (aus Heumann D., Gally, P., Barras, C., Zaech, P., Ulevitch, R.J., Tobias, P.S., Glauser, M.P., Baumgartner, J.D. Control of lipopolysaccharide (LPS) binding and LPS-induced tumor necrosis factor secretion in human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 148: 3505-3512, 1992). PBMC wurden für 4 Stunden in 10%igem autologen menschlichem Serum mit bzw. ohne Antikörper bei verschiedenen LPS-Konzentrationen inkubiert. Die Wirkung der Antikörper wurde als %-Hemmung der  $TNF\alpha$ -Sekretion aufgetragen.

Weißer Säule: anti-0111 LPS-Antikörper

Schraffierte Säule: anti-CD14 mAK MY4

Schwarze Säule: Mischung aus beiden Antikörpern

### 3.3.3 CD14 aktiviert TLR-2 und TLR-4-Rezeptoren

Die Funktionen und Aufgaben des CD14 sind bis heute noch nicht gänzlich geklärt. Dass CD14 nicht nur LPS binden kann, ist heute unbestritten. Einen weiteren Schritt zur Aufklärung der Gesamtrolle des CD14 gelang 2001 Muta et al.. Er konnte nachweisen, dass CD14 und LPB auch für die Aktivierung des TLR (toll-like receptor)- 2 und TLR-4 nötig ist. TLR-2 und TLR-4 induzieren ihrerseits die NF-kappaB Aktivierung. Ihre Studien führten sie an der menschlichen, embryonalen 293-Nierenzelllinie durch. TLR-4 ist etwa 100-fach sensitiver gegenüber LPS, als TLR-2. Im Gegensatz zur Reaktion des TLR-2 auf kommerzielle LPS-Mischsubstrate, reagiert dieser Rezeptor nicht auf hochgereinigtes LPS-Konzentrat oder auf synthetisches Lipid A. Es müssen also ein oder mehrere andere Moleküle die Reaktion des Rezeptors auslösen. Polymyxin B, ein Lipid-A neutralisierendes Reagenz, blockiert die Reaktion auf LPS. Lipid A muss also an der Aktivierung des TLR-2 Rezeptors beteiligt sein. Die Funktion des TLR-2 und TLR-4 –Rezeptoren ist streng gekoppelt an die Anwesenheit von Serum und LPS-bindenden Protein. Beide Rezeptoren können aber mit CD14 interagieren [Muta T. 2001].

### 3.3.4 Eosinophile Granulozyten und CD14

LPS ist ein ubiquitäres Komponent in Staub und Luft. LPS wird verdächtigt, nach Inhalation in die Bronchien, eine Aktivierung der Eosinophilen bei Astma-bronchiale Patienten auszulösen.

Eosinophile Granulozyten werden durch LPS, Lipid A , sezerniertes  $TNF\alpha$  und durch eosinophiles-Kationisches Protein (ECP) stimuliert. LPS und Lipid A setzten die Sekretion von  $TNF$ -alpha und ECP dosisabhängig herab. Monoklonale anti-CD14-Antikörper und synthetisches Lipid A blockierten die Freisetzung von  $TNF\alpha$  und ECP aus LPS-stimulierten Eosinophilen. Studien mit radioaktiv markiertem LPS zeigten eine dosisabhängige Aufnahme von  $(3)H$ -LPS in eosinophile Granulozyten. Die Aufnahme von  $(3)H$ -LPS wird als spezifisch angesehen, weil die Vorinkubation mit unmarkiertem LPS, das bereits synthetisches Lipid A und CD14 gebunden hatte, eine weitere Aufnahme von  $(3)H$ -LPS verhinderte. Die CD14 Expression wurde gemessen. Außerdem wurde mRNA von TLR2 und TLR4 (Korezeptoren des CD14) nachgewiesen. Somit nehmen die eosinophilen Granulozyten LPS auf und können durch LPS in einem CD14-abhängigen Mechanismus aktiviert werden. Es konnte also nachgewiesen werden, dass Eosinophile Allergene und Endotoxin aufnehmen, ein Prozess der vielleicht entzündliche und allergische Prozesse exazerbieren lässt [Plotz 2001]

### 3.3.5 Toleranz gegenüber LPS und die Rolle von CD14 bei ihrer Entwicklung

LPS bewirkt die Freisetzung aus Monozyten, unabhängig davon, ob LPS künstlich durch Injektion oder natürlich während einer Infektion mit gramnegativen Bakterien zugesetzt wird. Die Regulation der Synthese und Sekretion dieses Zytokins ist weitgehend unbekannt (siehe Abschnitt 3.2). Bekannt ist jedoch, dass die Monozyten einer „Toleranz“ oder „Desensibilisierung“ gegenüber LPS unterliegen. Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch unklar. Da jedoch CD14 der LPS-Rezeptor auf der Oberfläche der Monozyten ist, erscheint naheliegend, dass CD14 an der Entstehung der LPS-Toleranz zumindest beteiligt ist.

Kultiviert man Monozyten (Mono-Mac-6-Zellen) in Medien mit verschiedenen LPS-Mengen, so ergeben sich folgende charakteristischen Ergebnisse:

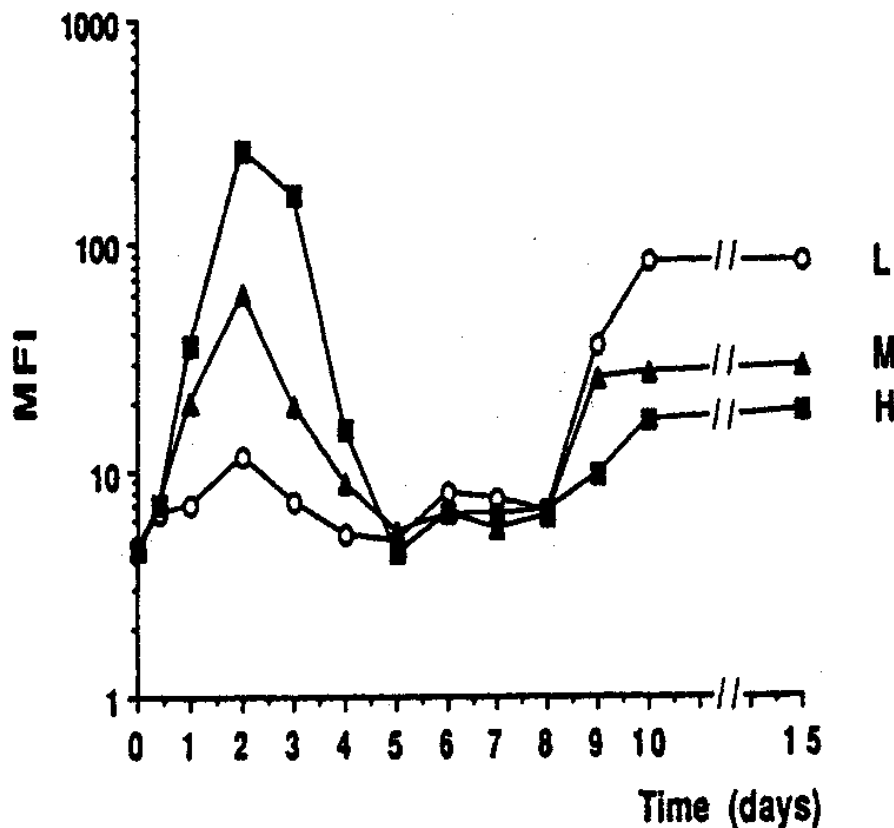


Abbildung 5: Kinetik der mCD14-Expression kultivierter Monozyten bei langfrisiger LPS-Inkubation (aus Labeta, M.O., Durieux, J.-J., Spagnoli, G., Fernandez, N., Wijdenes, J., Herrmann, R. CD14 and tolerance to Lipopolysaccharides: biochemical and functional analysis. *Immunology* 80: 415-423, 1993). Monozyten der Zelllinie Mono-Mac-6 wurden in drei verschiedenen Medien unterschiedlicher LPS-Konzentrationen kultiviert:

L-Medium (L=low): LPS-Gehalt <35 pg/ml

M-Medium (M=medium): LPS-Gehalt <55 pg/ml (L-Medium + 20 pg/ml LPS)

H-Medium (H=high): LPS-Gehalt <235 pg/ml (L-Medium + 200 pg/ml LPS)

Die Zellen und ihre Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt und die Zellen auf CD14-Expression (mCD14) untersucht.

- Die **CD14-Oberflächenexpression** steigt anfangs abhängig vom LPS-Gehalt im Serum an. Die Zahl der CD14-Moleküle auf der Oberfläche verhält sich proportional zur Menge des LPS im Kulturmedium. Nach etwa fünf Tagen fallen die Werte wieder bis auf den Ausgangswert. In den folgenden drei Tagen unterscheiden sich die CD14-Expressionen in allen Medien nicht signifikant voneinander. Nach dem achten Kulturtag kehrt sich die Anfangssituation um: Monozyten aus dem Medium mit dem

niedrigsten LPS-Gehalt zeigten die stärkste und die Zellen aus dem Medium mit der höchsten LPS-Konzentration die niedrigste mCD14-Expression [Labeta et al. 1993].

- Die **CD14-Syntheserate** verhält sich proportional zur CD14-Expression.
- Die Veränderungen bei der **Freisetzung von sCD14** ins Medium entsprachen im Wesentlichen der Modulation ihrer Oberflächenexpression und der Syntheserate. Monozyten, die ein oder zwei Tage in LPS-haltigem Medium kultiviert wurden, reagierten nur noch bedingt auf einen erneuten Kontakt mit LPS. Zellen, die während der Erststimulation nur kleinen LPS-Mengen ausgesetzt waren, reagierten am empfindlichsten, wohingegen die aus LPS-reichen Medien weitgehend unempfindlich waren, bzw. fast gar nicht mehr reagierten.

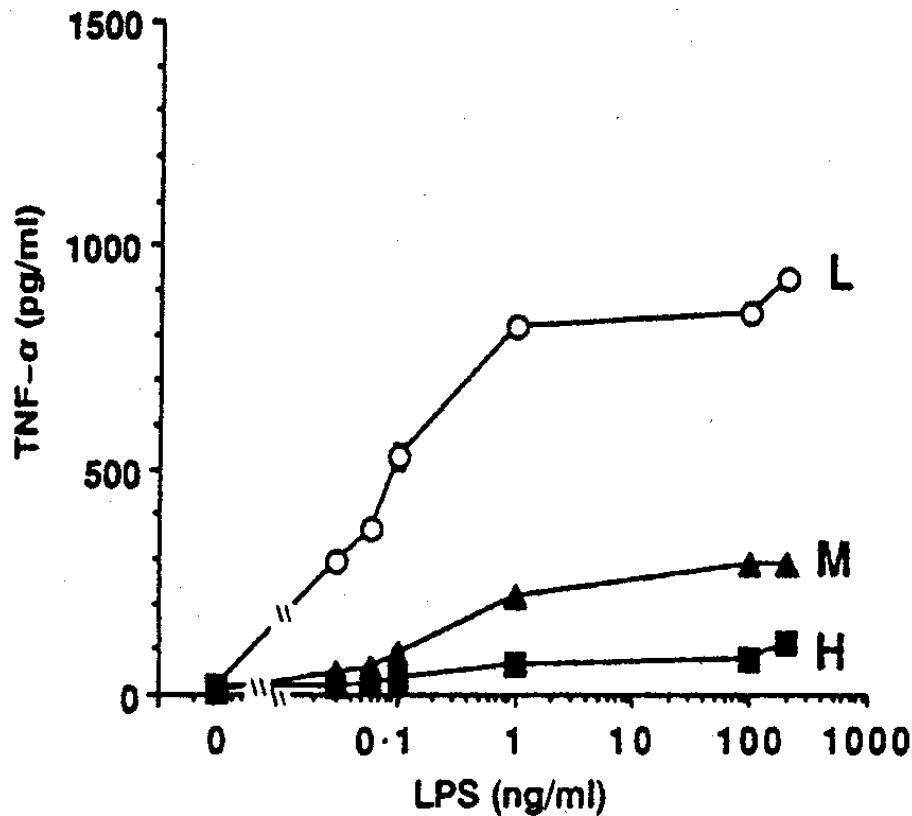


Abbildung 6: Dosis-Wirkungs-Kurven für die TNF $\alpha$ -Sekretion von zum zweiten Mal mit LPS stimulierten mono-Mac-6-Zellen (aus Labeta, M.O., Durieux, J.-J., Spagnoli, G., Fernandez, N., Wijdenes, J., Herrmann, R. CD14 and tolerance to Lipopolysaccharides: biochemical and functional analysis. *Immunology* 80: 415-423, 1993).

Mono-Mac-6-Zellen wurden für 48 Stunden in den drei Kulturmedien L, M, und H inkubiert. Nach dieser Zeit wurden Aliquots entnommen, die Zellen gewaschen und für zwei Stunden mit unterschiedlichen LPS-Mengen (bis zu 200 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden die  $TNF\alpha$ -Freisetzung bestimmt.

Die Unfähigkeit dieser Monozyten auf eine zweite Stimulierung durch LPS z. B. mit Zytokinsekretion zu reagieren, bezeichnet man auch als „Toleranz“ (Desensibilisierung). Dass CD14 bei der Entstehung der LPS-Toleranz eine wichtige Rolle spielt, konnte Labeta et al. 1993 zeigen. Nur CD14-blockierende Antikörper, nicht nicht-blockierende CD14-Antikörper, konnten verhindern, dass die Zellen gegenüber LPS „tolerant“ wurden.

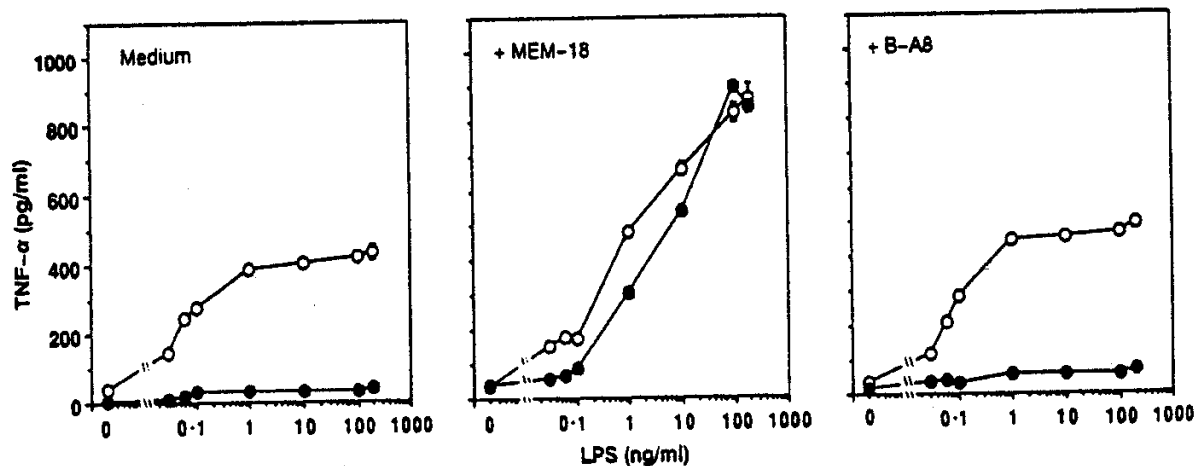


Abbildung 7: Dosis-Wirkungskurven für die  $TNF\alpha$ -Sekretion von zum zweiten Mal mit LPS stimulierten Mono-Mac-6-Zellen mit und ohne CD14-spezifischen Antikörpern (aus Labeta, M.O., Durieux, J.-J., Spagnoli, G., Fernandez, N., Wijdenes, J., Herrmann, R. CD14 and tolerance to Lipopolysaccharides: biochemical and functional analysis. *Immunology* 80: 415-423, 1993).

Mono-Mac-6-Zellen wurden für 48 Stunden im L (○)- und H (●)-Medium ohne bzw. mit CD14-spezifischen Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde die  $TNF\alpha$ -Sekretion gemessen.

### 3.3.6 LPS-Bindedomäne des CD14-Moleküls

Lipid A, der biologisch wirksame LPS-Molekülteil, besteht aus sechs C12-C14-Fettsäuren (hydrophober Molekülabschnitt), die an Diglukosamin gebunden sind. Die Phosphatgruppen des Diglukosamins an C1 und C4 verleihen dem Molekül negative Ladungen. Von diesem Strukturmerkmal ausgehend, würde man also *hydrophobe* und *positiv geladene* Elemente in der Bindedomäne für LPS in seinem Rezeptor erwarten.

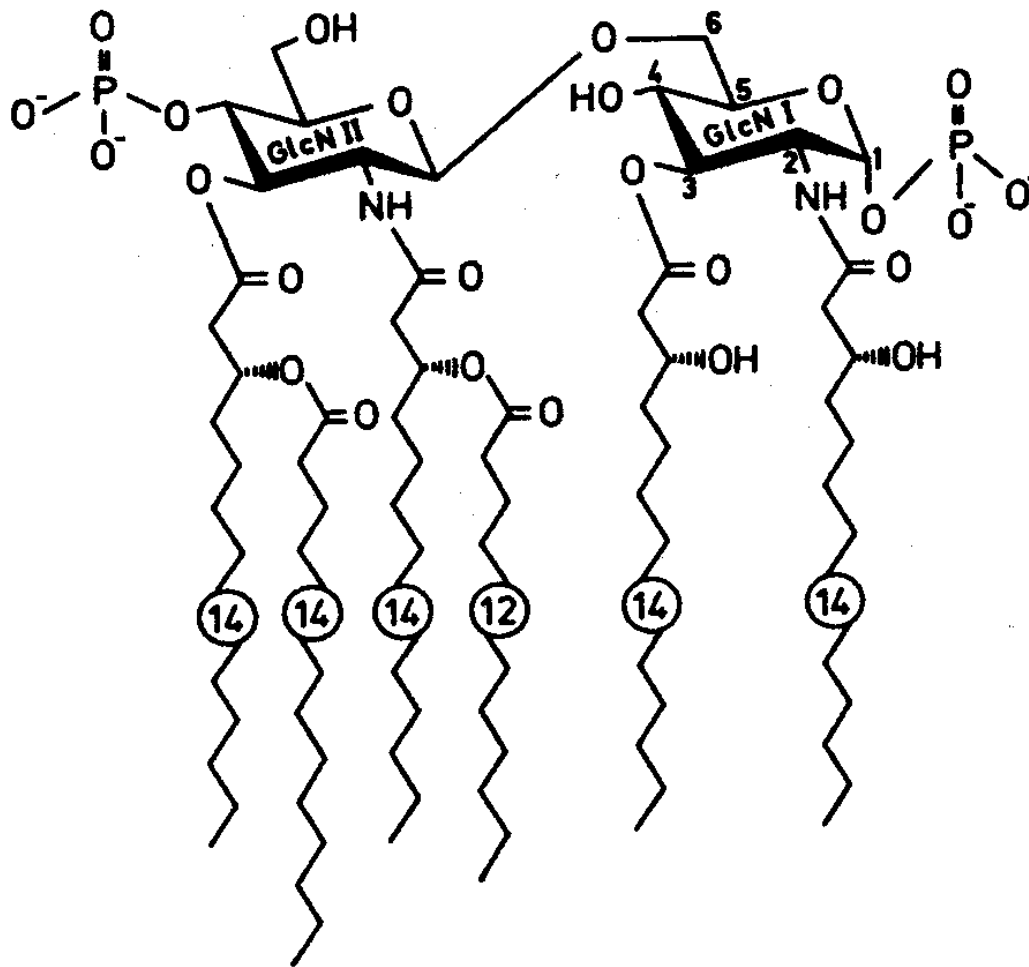


Abbildung 8 : Chemische Struktur von Lipid A (aus Dargel, R. Entzündung; Grundlagen – Klinik – Therapie. Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden, 1995).

MCD14 ist mit seinem C-terminalen Ende in der Membran verankert. Das N-terminale Ende ragt in den Extrazellulärraum. Über spezielle Rezeptordomänen geht es dann mit anderen Zellen Assoziationen ein. Für die Bindung von LPS und die LPS-induzierte Aktivierung scheint der etwa 70 Aminosäuren lange N-Terminus des CD14-Moleküls verantwortlich zu sein. Besonders wichtig sind die Teilbereiche der Aminosäure 8 bis 11 (DDED) und die Aminosäure 34 bis 38 (AVEVE) [Viriyakosol 1995]. Angreifbar macht diese These, dass diese Bindedomäne deutlich hydrophil und zum Teil negativ geladen ist.

Hoess et al. [1993] gehen von einem „Loop“ in der β-Konformation der Aminosäure aus. Dieses ist wechselnd positiv geladen und hydrophob.

Mc Ginley et al. [1995] untersuchte die Bindungsstellen mittels Proteasen. Sie vermuteten die Bindungsstelle in der Region zwischen Aminosäure 57 und 64. Genauere Ergebnisse stehen bis heute noch aus, so dass zu hoffen bleibt, dass weitere Untersuchungen die Lösung zeigen werden.

## 3.3.7 Erkennung und Clearance apoptotischer Zellen durch CD14

Zellen, deren Lebenszyklus durch den programmierten Zelltod (Apoptose) beendet wird, werden *in vivo* schnell durch Phagozytose beseitigt, ohne Induktion von Entzündungsvorgängen [Savill et al. 1993]. Devitt et al. [1998] zeigten, dass CD14 mit apoptotischen Zellen interagiert, wodurch die Phagozytose dieser Zellen angeregt wird.

Um die Interaktion zwischen CD14 und apoptotischen Zellen genauer zu verstehen, wurde untersucht, ob:

1. Anti-CD14 mAK die Interaktion zwischen apoptotischen Lymphozyten und Makrophagen hemmen und
2. CD14 bei transienter Expression auf COS-Zellen die Bindung und Phagozytose apoptotischer Zellen fördert.

COS-Zellen sind Zellen, die das 61D3bindende Epitop tragen. 61D3 ist ein monoklonaler Antikörper, der an menschlichen Makrophagen bindet und deren Interaktion mit Leukozyten, die die Apoptose durchlaufen, hemmt. Das mit 61D3 identifizierte Protein hat ein Molekulargewicht von ungefähr 55 KDa, was dem von CD14 entspricht. Daneben reagierte 61D3 spezifisch mit gereinigtem rekombinantem CD14 und die Nukleisäuresequenz der komplementären DNA, die mit diesem mAK identifiziert wurde, war identisch mit der CD14-DNA. Somit muss sich das 61D3-Bindeepitop auf dem CD14-Molekül befinden [Flora et Gregory 1994].

Die anti-CD14 mAK 61D3 hemmten sowohl die Bindung als auch die Phagozytose apoptotischer Lymphozyten durch Makrophagen. Diese Hemmung war für die apoptotische Zelle spezifisch, da lebensfähige Lymphozyten nicht mit den Makrophagen interagierten und die Interaktion der Makrophagen mit den nekrotischen Zellen nicht durch 61D3 gehemmt wurde.

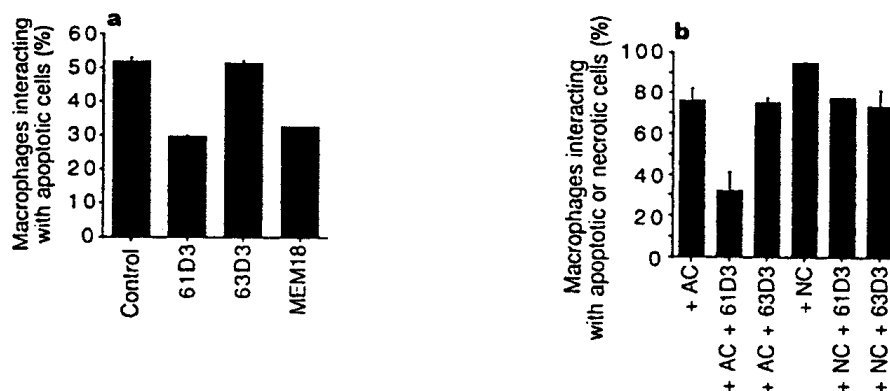


Abbildung 9: CD14-vermittelte Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen (aus Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L., Gregory, C.D. Human CD14 mediates recognition and phagozytosis of apoptotic cells. *Nature* 192: 505-509, 1998).

Interaktion (Bindung und Phagozytose) apoptotischer Burkitt-Lymphomzellen mit sieben Tagen alten Makrophagen und Hemmung dieser Interaktion durch 61D3.

*Vergleich der Interaktion apoptotischer Lymphomzellen (AC) und ihrer nekrotischen Äquivalente mit Makrophagen. Hemmung der AC-Makrophagen-Interaktion durch 61D3.*

Die Expression von CD14 auf der Oberfläche von COS-Zellen führte zu einer vermehrten Bindung und einer verstärkten Phagozytose apoptotischer Lymphozyten. 61D3 kann diesen Vorgang hemmen.

Trotz Überexpression von CD14 auf den COS-Zellen im Vergleich zu Makrophagen phagozytieren jedoch insgesamt nur 25-30% der COS-Zellen apoptotische Zellen. Vermutlich sind zusätzliche Moleküle auf der Makrophagenoberfläche an der „professionellen Phagozytose“ beteiligt.

Wurden die gleichen Makrophagen, die via CD14 mit apoptotischen Zellen interagieren, u.a. mit LPS und apoptotischen Lymphomzellen inkubiert, antworteten sie erwartungsgemäß auf die LPS-Stimulation mit einer signifikanten TNF $\alpha$ -Produktion. Diese Stimulation blieb mit den apoptotischen Zellen aus. Im Gegensatz zu LPS induzieren apoptotische Zellen also nicht die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine.

Diese Ergebnisse geben der Funktionalität des CD14-Moleküls eine neue Dimension: Zusätzlich zu seiner Funktion als Rezeptor für infektiöse fremde Komponenten erkennt es auch apoptotische eigene Komponenten und ist somit an deren Clearance durch die Makrophagen beteiligt.

Die Funktion des CD14-Rezeptors wurde 1999 noch erweitert: Zum einen dient CD14 als Erkennungsrezeptor auf apoptotischen Zellen für Makrophagen, zum anderen dient CD14 als Antagonist gegenüber der Apoptose der Monozyten [Heidenreich 1999]. Somit kommt der Regulation der Expression des CD14-Rezeptor eine weitere Funktion zu: Herabsetzung der Expression triggert die Apoptose der Monozyten, Hochregulation steigert die „Überlebensrate“ der Zellen [Heidenreich 1997].

Bisher wurde über die Beteiligung des CD14 an der Apoptose bei Monozyten und Lymphomzellen gesprochen. Schlegel et al. wiesen diese Funktion aber auch bei Erythrozyten nach [1999]. Hier wurde die These aufgestellt, dass CD14 sowohl bei der Apoptose durch aktivierte als auch nicht-aktivierte Makrophagen beteiligt ist. Aktivierte Monozyten scheinen allerdings auf einen weiteren CD14-unabhängigen Aktivierungsweg zurückgreifen zu können.



## 3.3.8 CD14 und grampositive Bakterien

Ob ein Bakterium zu den grampositiven oder gramnegativen Arten gezählt wird, entscheidet der Aufbau seiner Zellwand- und hülle.

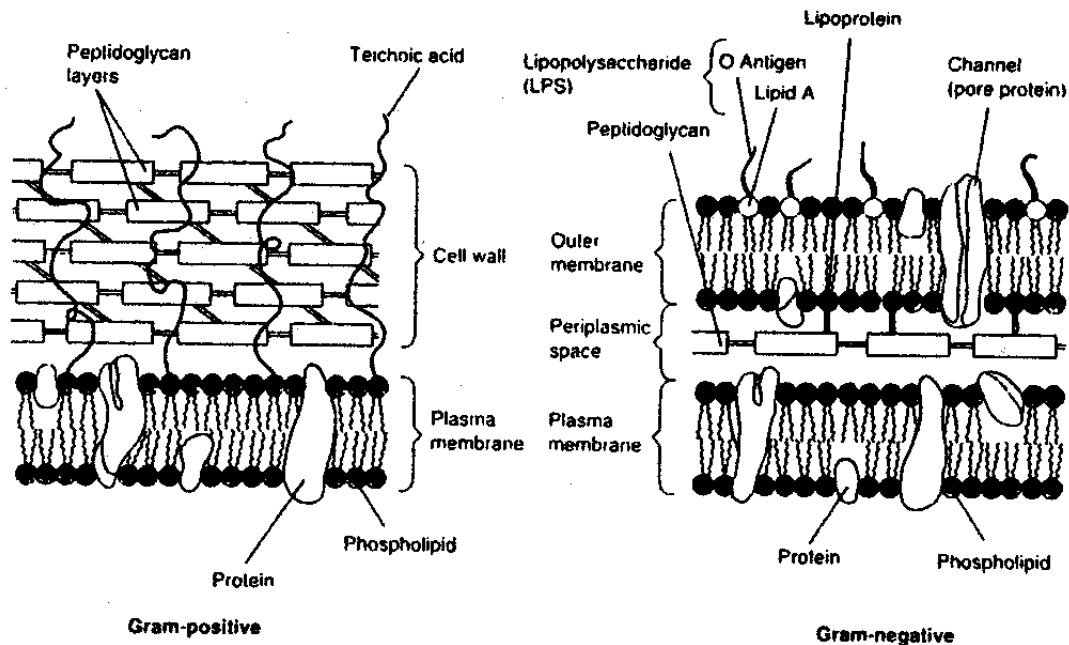


Abbildung 10 : Aufbau der grampositiven und gramnegativen Bakterienwand (aus Glauser, M.P. *The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. Drugs 52 Suppl. 2: 9-17, 1996*).

Grundbaustein jeder bakteriellen Zellwand ist das Peptidoglykan Murein. Es ist ein Heteropolymer, dessen Ketten sich aus den alternierenden Bausteinen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmureinsäure zusammensetzen. Diese Ketten sind gerade und unverzweigt, aber über kleine Peptide miteinander verbunden. Auf diese Weise entsteht ein sachförmiges Riesenmolekül, das das gesamte Bakterium umgibt, der Murein-Sacculus.

Bei den grampositiven Bakterien kann dieses Mureinnetz 30 – 70 % der Zellwand-Trockenmasse ausmachen. Der Proteingehalt ist gering. Charakteristisch sind Teichonsäuren: kovalent mit dem Murein verknüpfte (Zellwand-)Teichonsäuren und in der Zytoplasmamembran verankerte (Membran-) Lipoteichonsäuren, die in die Zellwand hinein- und über diese hinausragen.

Das Mureinnetz gramnegativer Bakterien ist ein- oder maximal zweischichtig, der Anteil des Peptidoglykans Murein ist also wesentlich kleiner als bei den grampositiven Bakterien. Beim E.coli macht Murein z.B. nur 10% der Zellwand-Trockenmasse aus. Typisch für gramnegative Bakterien ist die sogenannte „äußere Membran“, die dem Mureinsacculus nach außen hin aufgelagert ist. Diese fehlt den grampositiven Bakterien. Sie ist sehr

komplex aus Proteinen, Phospholipiden und Lipopolysacchariden zusammengesetzt und mit der Mureinschicht über Lipoproteine verbunden [Schlegel 1992; Kayser et al. 1998].

Bei Infektionen mit grampositiven Bakterien kommt es zu vergleichbaren entzündlichen Reaktionen wie bei gramnegativen Bakterien, z.B. Zytokin-Ausschüttung, Gewebeschäden oder septischem Schock. Während bei gramnegativen Bakterien der auslösende Faktor bekannt ist, nämlich LPS, weiß man bei grampositiven Bakterien noch sehr wenig über die zugrundeliegenden Mechanismen [Kusunoki et al. 1995]. Man erwartet einen Bestandteil der Zellwand als auslösenden Faktor, da dieser der Umgebung gegenüber exponiert ist. Für Teichonsäuren und Peptidoglykan konnte die Synthese und Sekretion von Zytokinen in menschlichen Monozyten bereits nachgewiesen werden [Mattsson et al. 1993].

Die Ergebnisse vieler Arbeitsgruppen (z.B. Gupta et al. 1996, Weidemann et al. 1997) deuten darauf hin, dass CD14 zumindest auch für Peptidoglykan (PG) der verantwortliche Rezeptor ist. Die Bindung von löslichem PG, also polymerem PG, aber nicht von durch Peptiden vernetztem PG erfolgt an menschliche Monozyten. Die Bindung ist abhängig von der Substratmenge, ist sättigbar und kann durch LPS oder Antikörper gegen CD14 inhibiert werden. Bestätigt wurden diese eher indirekten Beweise durch ein sogenanntes „Gel Shift Assay“: die elektrophoretische Mobilität von sCD14 wurde in Gegenwart und Abwesenheit von LPS oder löslichem PG miteinander verglichen. Der sCD14-sPG-Komplex zeigte eine höhere Mobilität als der sCD14-LPS-Komplex, was auf eine direkte Assoziation von sCD14 und sPG hindeutet [Weidemann et al. 1997]. Auch die sPG-Bindungsdomänen liegen im N-terminalen Ende des CD14-Rezeptors. Wahrscheinlich liegt diese aber an einer anderen Stelle als die Erkennungsstelle für LPS [Gupta et al. 1996, Dziarski 1998].

Triantafyllou et al. vermuten auch einen Zusammenhang mit den oben genannten TLR2- und TLR4-Rezeptoren. TLR2 und TLR4-Proteine werden für die intrazelluläre Signalerkennung und -übertragung von LPS und Lipoteichon benötigt [2001]. Diese Forschergruppe machte vor allen Dingen sCD14 für die Präsentation verantwortlich, nicht mCD14. Eine Infektion mit Staphylokokkus aureus und Streptokokkus pneumoniae fördern die Expression des TLR2-, aber nicht des TLR4-Rezeptors aus Fibroblasten. Die CD14 Ko-Expression erhöht ihrerseits die TLR2-medierte Aktivierungen. Diese Daten unterstützen die Bedeutung der TLR-Rezeptoren sowohl bei gram-positiven als auch bei gram-negativen bakteriellen Infektionen [Yoshimura 1999].

Erste klinische Untersuchungen bei Neugeborenen zeigten, dass die Höhe des sCD14 während einer Sepsis erhöht ist und sCD14 bei gramnegativen Infektionen weit höher ansteigt als bei gram-positiven. Im Gegensatz hierzu stiegen IL-6, TNF $\alpha$ , Fibronectin und das c-reaktive Protein etwa gleich hoch an [Blanco 1996]. Burgamann et al. verwendeten sCD14 sogar als prognostischen Marker während einer gram-positiven Sepsis. Sie erkannten, dass hohe sCD14-Werte mit einer hohen Mortalität assoziiert sind [1996].

Blockiert man den CD14-Rezeptor mit monoklonalen Antikörpern, so hat dies keinen Einfluss auf die TNF $\alpha$ -Freisetzung stimuliert durch Peptidoglykan. Die Sekretion von TNF $\alpha$ , während der Blockade, wird hingegen durch die Stimulation mit Lipoteichon herabgesetzt.

Peptidoglykan reguliert die Transkriptionsrate der Zytokine. PG induziert eine Phosphorylation des Transkriptionsfaktors AFT-1 und CREB. AFT-1 und CREB binden die DNA als Dimer und induzieren die Aktivierung der Transkription des CRE-Plasmids. Die

Abwesenheit von AFT-1 und CREB inhibieren diese Transkription. CD14 ist an der PGN-induzierten Aktivierung von CREB und AP-1 beteiligt [Gupta 1999].

Lipoteichon und Peptidoglycan steigerten die Expression von CD14, während LPS dieses Molekül eher herunterregulierte. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Peptidoglycan und LPS verschiedene Antworten der Monozyten provozieren können und CD14 verschiedene „Rollen“ innerhalb der Immunkaskade einnimmt [Jorgensen 2001].

Somit kann die Funktion des CD14 erweitert werden auf die Erkennung von Endotoxin, Peptidoglycan und anderen mikrobiellen Polymeren, die auf einer Glykosyl-Basis aufgebaut sind. Diese zellulären Moleküle könnten dem CD14 ähnlich wie Lektin präsentiert werden [Rietschel 1998].

#### Literatur

- Banco, A., Solis, G., Arranz, E., Coto, G.D., Ramos, A., Telleria, J. Serum levels of CD14 in neonatal sepsis by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Acta Paediatr.* 85(6): 728-732, 1996
- Burgmann, H., Winkler, S., Locker, G.H., Presterl, E., Laczika, K., Staudinger, T., Knapp, S., Thalhammer, F., Wenisch, C., Zedwitz-Liebenstein, K., Frass, M., Graninger, W. Increased serum concentration of soluble CD14 is a prognostic marker in gram-positive sepsis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 80(3Pt1): 307-310, 1996
- Dargel, R. Entzündung; Grundlagen – Klinik – Therapie. Ullstein Mosby, Berlin, Wiesbaden, 1995
- Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L., Gregory, C.D. Human CD14 mediates recognition and phagozytosis of apoptotic cells. *Nature* 192: 505-509, 1998
- Dziarski, R., Tapping, R.I., Tobias, P.S. Binding of bacterial peptidoglycan to CD14, J. *Biol. Chem.* 273(15): 8680-8690, 1998
- Dziarski, R., Ulmer, A.J. Gupta, D. Interactions of CD14 with components of gram-positive bacteria. *Chem. Immunol.* 74: 83-107, 2000
- Flora, P.K., Gregory, C.D. Recognition of apoptotic cells by human macrophages-inhibition by a monocyte/macrophage-specific monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 24: 2625-2632, 1994
- Glauser, M.P. The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. *Drugs* 52 Suppl. 2: 9-17, 1996
- Gupta, D., Kirkland, T.N., Viriakosol, S., Dziarski, R. CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 271: 23310-23316, 1996
- Gupta, D., Wang, Q., Vinson, C., Dziarski, R. Bacterial peptidoglycan induces CD14-dependent activation of transcription factors CREB/ATF and AP-1. *J. Biol. Chem.* 274(20): 14012-14020, 1999

- Heumann D., Gallay, P., Barras, C., Zaech, P., Ulevitch, R.J., Tobias, P.S., Glauser, M.P., Baumgartner, J.D. Control of lipopolysaccharide (LPS) binding and LPS-induced tumor necrosis factor secretion in human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 148: 3505-3512, 1992
- Heidenreich, S., Schmidt, M., August, C., Cullen, P., Rademaekers, A., Pauels, H.G. Regulation of human monocyte apoptosis by the CD 14 molecule, *J. Immunol.* 159(7): 3178-3188, 1997
- Heidenreich, S. Monocyte CD14: a multifunctional receptor engaged in apoptosis from both sides. *J. Leukoc. Biol.* 65(6): 737-743, 1999
- Hoess, D., Watson, S., Siber, G.R., Liddington, R. Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, *Limulus anti-LPS factor* at 1.5 Å resolution. *EMBO J.* 12: 3351-3356, 1993
- Jorgensen, P.F., Wang, J.E., Almlof, M., Thiemermann, C., Foster, S.J., Solberg, R., Aasen, A.O. Peptidoglycan and lipoteichoic acid modify monocyte phenotype in human whole blood. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 8(3): 515-521, 2001
- Kayser, H.K., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M. *Medizinische Mikrobiologie*. 9.Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 1998
- Kusunoki, T., Hailman, E., Juan, T.S.-C., Lichenstein, H.S., Wright, S.D. Molecules from *Staphylococcus aureus* that bind CD14 and stimulate innate immune response. *J. Exp. Med.* 182: 1673-1682, 1995
- Labeta, M.O., Durieux, J.-J., Spagnoli, G., Fernandez, N., Wijdenes, J., Herrmann, R. CD14 and tolerance to Lipopolysaccharides: biochemical and functional analysis. *Immunology* 80: 415-423, 1993
- Landmann, R., Scherer, F., Schumann, R., Link, S., Sansano, S., Zimmerli, W. LPS directly induces oxygen radical production in human monocytes via LPS binding protein and CD14. *J. Leukoc. Biol.* 57(3): 440-449, 1995
- Le Roy, D., Di Padova, F., Aadachi, Y., Glauser, M.P., Calandra, T., Heumann, D. Critical role of lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in immune responses against gram-negative bacteria. *J. Immunol.* 167(5): 2759-2765, 2001
- Le Roy, D., Di Padova, F., Lengacher, S., Landmann, R., Glauser, M.P., Calandra, T., Heumann, D. Monoclonal antibodies to murine lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) protect mice from lethal endotoxemia by blocking either the binding of LPS to LBP or the presentation of LPS/LBP complexes to CD14. *J. Immunol.* 162(12): 7454-7460, 1999
- Mattsson, E., Verhage, L., Rollof, J., Fler, A., Verhoef, J., van Dijk, H. Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulates human monocytes to release tumor necrosis factor- $\alpha$ , Interleukin 1 $\beta$  and Interleukin-6. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 7: 281-288, 1993

- McGinley M.D.; Narhi L.O.; Kelley M.J.; Davy E.; Robinson J.; Rohde M.F.; Wright S.D.; Lichenstein H.S. CD14: physical properties and identification of an exposed site that is protected by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* ;270(10):5213-8, 1995
- Muta T., Takeshige, K. Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR) 2 as well as TLR4 Reconstruction of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparation. *Eur. J. Biochem.*, 268(16): 4580-4589, 2001
- Plotz, S.G., Lentschat, A., Behrendt, H., Plotz, W., Hamann, L., Ring, J. Rietschel, E.T., Flad, H.D., Ulmer, A.J. The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharide is CD14 dependent. *Blood*, 97(1): 235-241, 2001
- Rietschel, E.T., Schletter, J., Weidemann, B., Es-Samalouti, V., Mattern, T., Zahringer, U., Seydes, U., Brade, H., Flad, H.D., Kusumoto, S., Gupta, D., Dziarski, R., Ulmer, A.J. Lipopolysaccharide and peptidoglycan: CD14-dependent bacterial inducers of inflammation. *Microb. Drug. Resist.* 4(1): 37-44, 1998
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., Haslett, C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today* 14:131-136, 1993
- Schlegel, H.G. *Allgemeine Mikrobiologie*, 7.Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 1992
- Schlegel, R.A., Kraehling, S., Callahan, M.K., Williamson, P. CD14 is a component of multiple recognition systems used by macrophages to phagocytose apoptotic lymphocytes. *Cell Death Differ.* 6(6): 583-592, 1999
- Shapira, L., Champagne, C., Gordon, B., Amar, S., Van Dyke, T.E., Lipopolysaccharide priming of superoxide release by human neutrophils: role of membrane CD14 and serum LPS binding protein. *Inflammation* 19(3): 289-295, 1995
- Tapping, R.I., Orr, S.L., Lawson, E.M., Soldau, K., Tobias, P.S. Membrane-anchored forms of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein do not mediate cellular responses to LPS independently of CD14. *J.Immunol.* 162(9):5483-5489, 1999
- Triantafilou, K., Triantafilou, M., Dedrick, R.L., Interactions of bacterial lipopolysaccharide and peptidoglycan with a 70 kDa and an 80kDa protein on the cell surface of CD14+ and CD14- cells. *Hum. Immunol.* 62(1): 50-63, 2001
- Viriakosol, S., Kirkland, T.N. A region of human CD14 required for lipopolysaccharide binding. *J.Biol. Chem.* 270:361-368, 1995
- Wang, J.E., Jorgensen, P.F., Almlof, M., Thiemermann, C., Foster, S.J., Aasen, A.O., Solberg, R. Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6, and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect. Immun.* 68(7): 3965-3970, 2000
- Weidemann, B., Schletter, J., Dziarski, R., Kusumoto, S., Stelzer, F., Rietschel, E.T., Flad, H.D., Ulmer, A.J. Specific binding of soluble peptidoglycan and muramylpeptide to CD14 on human monocytes. *Infect. Immun.* 65: 858-864, 1997

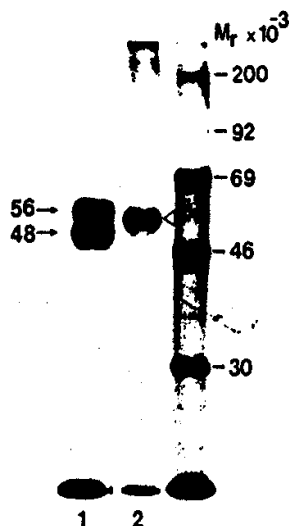
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-1433, 1990
- Wright, S.D., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Ramos, R.A. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 170: 1231-1241, 1989
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R.R., Tuomanen, E., Dziarski, R., Golenbock, D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 163(1): 1-5, 1999

#### 4 Lösliches CD14 (sCD14)

Lösliches CD14 wurde im Serum gesunder Menschen, im Harn von Patienten mit Nierenerkrankungen, in Kulturbedständen von HLA-60-Zellen nach Induktion zur Monozytendifferenzierung sowie in Kulturmedien transfizierter CD14-exprimierender Zellen entdeckt. Unter physiologischen Bedingungen liegt die sCD14-Konzentration im Serum bei 2 – 6 µg/ml [Haziot et al. 1988; Bazil et al. 1986, Maliszewski et al. 1985; Sundan et al. 1995].

##### 4.1 sCD14-Formen

Im Überstand biosynthetisch markierter Mono-Mac-6-Zellen gibt es zwei verschieden große sCD14-Moleküle: eines mit einem Molekulargewicht von 48 kDa und eines mit einem Molekulargewicht von 56 kDa. Der membrangebundene Rezeptor (mCD14) hat ein Molekulargewicht von 54 kDa [Labeta et al. 1993].



**1. sCD14:** Zwei Polypeptidbanden mit einem Molekulargewicht von 48 und 56 kDa. Mono-Mac-6-Zellen wurden mit [<sup>35</sup>S]-Methionin biosynthetisch markiert und sCD14 mit dem CD14-spezifischen mAK MY4 aus dem Kulturüberstand präzipitiert (SDS-PAGE-Western Blot-Analyse).

**2. mCD14:** Eine Polypeptidbande mit einem Molekulargewicht von 54 kDa (offenes Dreieck). mCD14 wurde mit MY4 aus dem Zellysat präzipitiert (SDS-PAGE-Western Blot-Analyse).

Abbildung 11: Lösliche CD14-Moleküle, Molekulargewichtsanalysen (aus Labeta, M.O., Durieux, J.-J., Fernandez, N., Herrmann, R., Ferrara, P. Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. Eur. J. Immunol. 23: 2144-2151, 1993).

## 4.2 Biochemische Charakterisierung und Unterscheidung der sCD14-Formen

### 4.2.1 Elektrophorese

Untersucht man sCD14-Moleküle mit einem Molekulargewicht von etwa 53 kDa, so ist die elektrophoretische Mobilität unter nicht-reduzierenden Bedingungen größer als unter reduzierenden. Dies kann auf die Anwesenheit von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten im Molekül hinweisen [Bazil et al 1986].

### 4.2.2 Glykosilierung des sCD14

Es gibt N- und O-verknüpfte Glykoproteine. Reagiert die anomere OH-Gruppe eines Monosaccharids mit der OH-Gruppe in der Seitenkette von Serein oder Threonin, entsteht unter Wasseraustritt eine O-glykosidische Bindung. Die Reaktion der anomeren OH-Gruppe von N-Acetylglucosamin mit der NH<sub>2</sub>-Gruppe von Asparagin ergibt eine N-glykosidische Bindung. Diese Verbindung ist häufiger als die O-glykosidische.

Die N-Glykosilierung kann nur innerhalb spezifischer Sequenzen auftreten: Asparagin muss Teil der Sequenz Asn - X - Ser oder Asn - X - Thr sein. X kann jede Aminosäure außer Prolin sein. Diese Aminosäure kann dann, muss aber nicht glykosiliert sein. Man spricht daher von einer „potentiellen Glykosilierungsstelle“. Bei den O-Glykosilierungen gibt es keine spezifische Sequenz, die die Glykosilierungsstellen markiert.

N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide enthalten eine gemeinsame Core-Region aus drei Mannose- und zwei N-Acetylglucosamin-Einheiten. An diese Grundstruktur sind in verschiedener Art und Weise weitere Zucker angehängt. Beim „mannosereichen Typ“ sind es zusätzliche Mannosemoleküle, beim „komplexen Typ“ können N-Acetylglucosamin, Galaktose, Sialinsäure und L-Fructose angehängt sein. In diesem Fall sitzen häufig Sialinsäure-Reste am äußeren Ende des Kohlenhydrates.



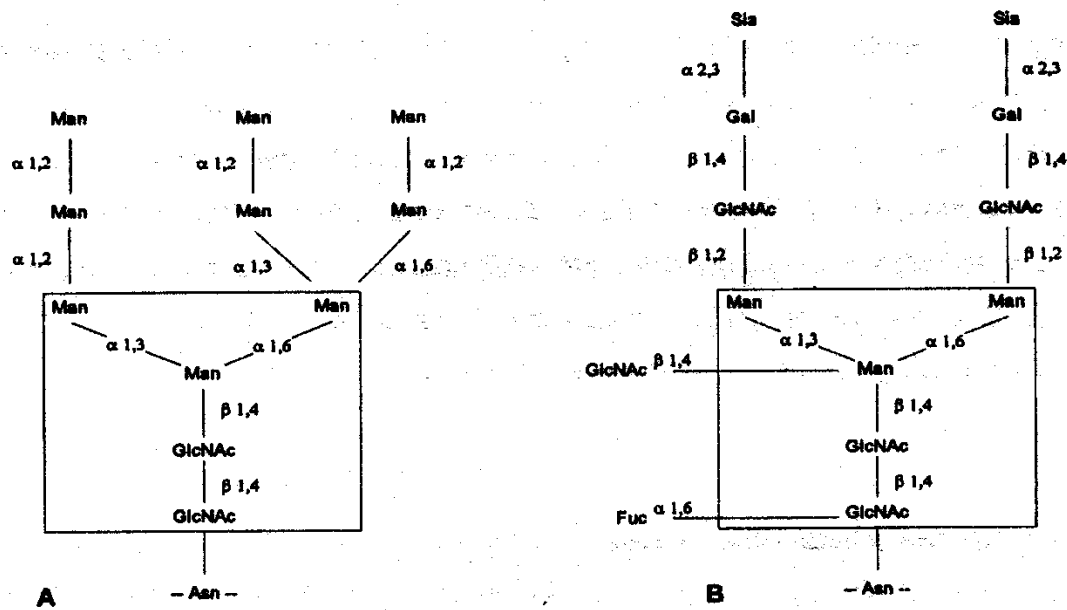


Abbildung 12: N-Glykosidisch gebundene Oligosaccharide (aus Stryer, L. Biochemie, Spektrum Akad. Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994)

Mannosereicher Typ

Komplexer Typ.

Für O-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharide lassen sich keine allgemeingültigen Strukturmerkmale ableiten. Ihr Aufbau variiert von einigen wenigen Monosacchariden bis zu Ketten mit tausend Dissaccharideinheiten.

Deglykosiliert man sCD14 durch Trifluormethansulfonsäure, so nimmt das Molekulargewicht von 52 kDa auf 40 kDa ab. Etwa 21 % des Molekulargewichtes entfallen somit auf den Kohlenhydratanteil [Bazil et al. 1986].

Stelter et al. untersuchten die verschiedenen Isoformen des CD14. Um den Beitrag der Glykosilierungen zur Entstehung verschiedener Isoformen zu untersuchen, wurden die Präparationen sukzessive mit verschiedenen zuckerspaltenden Enzymen behandelt. So konnte man die elektrophoretische Mobilität vor und nach der enzymatischen Deglykosilierung vergleichen.

N – Glykosilierung: In der Aminosäuresequenz finden sich vier mögliche Stellen für N-Glykosilierungen. Die beiden sCD14-Formen könnten also möglicherweise durch unterschiedliche Kohlenhydratprozessierungen des gleichen Peptids entstehen. Durch weitere Untersuchungen konnte allerdings von einer alleinigen Ursache der N-Glykosilierungen nicht mehr ausgegangen werden, eine Mitbeteiligung konnte aber nicht ausgeschlossen werden.

O – Glykosilierungen: Nach Abspaltung der N-verknüpften Kohlenhydrate entfernten Stelter et al. [1996] die O-Glykoside. Jeder enzymatische Abbau verringerte die Molekulargewichte der sCD14-Moleküle. Somit muss das Peptidgerüst der sCD14-Moleküle neben N- auch O-Glykoside enthalten.

#### 4.2.3 Herkunft

Labeta et al. [1993] fanden sowohl in Überständen von oberflächenionidierten als auch von biosynthetisch markierten (<sup>35</sup>S-Methionin) Zellen ein 48 kDa großes sCD14. Das 56 kDa-sCD14-Molekül befindet sich nur in Überständen biosynthetisch markierter Zellen. Dies könnte darauf hinweisen, dass nur das 48 kDa schwere sCD14 vom mCD14 abstammt.

Pan et al. [2000] konnte nachweisen, dass sCD14 hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird. Außerdem wird die CD14 Expression in Hepatozyten und Monozyten unterschiedlich reguliert: Die 24 bis 33 kb Region auf dem CD14-Gen reguliert die Expression in der Leber. Eine 80 kb-Region moduliert die Expression in den Monozyten.

#### 4.3 Bildungsmechanismen

Bei den beiden entdeckten sCD14-Formen handelt es sich tatsächlich um zwei verschiedene Moleküle [Labeta et al. 1993]. Es liegt daher nahe, von verschiedenen Entstehungsmechanismen auszugehen. Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit diesem Thema. Die Ergebnisse stelle ich kurz dar:

- Keine der beiden sCD14-Moleküle trägt einen GPI-Anker. Das kleinere sCD14-Molekül entsteht durch proteolytische Abspaltung dieses GPI-Ankers aus dem mCD14 [Bufler et al. 1995; Bazil 1991; Strominger 1991].
- Das 56 kDa-sCD14 ist eine sCD14-Form mit einem nicht prozessierten COOH-Ende und wird von der Zelle daher sofort sezerniert [Bufler et al. 1995].
- Das 56 kDa-sCD14 wird schneller freigesetzt als das 48 kDa-Polypeptid [Durieux et al. 1994].
- Das 48 kDa-sCD kann nicht ausschließlich vom mCD14 abstammen, da es auch im Plasma von PNH-Patienten enthalten ist [Durieux et al. 1994].
- MCD14 und beide sCD14-Formen scheinen ein Stück des Weges vom ER zur Zelloberfläche zu teilen. Ein 50 kDa-Polypeptid ist möglicherweise der gemeinsame Vorläufer aller drei Moleküle. Das kleinere 48 kDa-sCD14 entsteht direkt auf diesem Weg nach weiterer Prozessierung. Möglicherweise stammt das 48 kDa-sCD14 über einen Endozytose-Exozytose-Weg durch Konversion aus dem mCD14 ab [Durieux et al. 1994].

## Literatur:

- Bazil, V., Horejsi, V., Baudys, M., Kristofava, H., Strominger, J.L., Koska, W., Hilgert, I. Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen. *Eur. J. Immunol.* 16:1583-1589, 1986
- Bazil, V., Strominger, J.L. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J. Immunol.* 147: 1567-1574, 1991
- Bufler, P., Stiegler, G., Schuchmann, M., Hess, S., Krüger, C., Stelter, F., Eckerskorn, C., Schütt, C., Engelmann, H. Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectans. *Eur. J. Immunol.* 25: 604-610, 1995
- Durieux, J.-J., Vita, N., Popescu, O., Guette, F., Calzada-Wack, J., Munker, R., Schmidt, R.E., Lupker, J., Ferrara, P., Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Labeta, O. The two soluble forms of the lipopolysaccharidereceptor, CD14; characterization and release by normal human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 24: 2006-2012, 1994
- Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M.G., Silber, R., Goyert, S.M. The monocyte differentiation antigen, CD14 is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage, *J. Immunol.* 141: 547-552, 1988
- Labeta, M.O., Durieux, J.-J., Fernandez, N., Herrmann, R., Ferrara, P. Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur. J. Immunol.* 23: 2144-2151, 1993
- Maliszewski, C.R., Ball, E.D., Graziano, R.F., Fanger, M.W. Isolation and characterization of My23, a myeloid cell-derived antigen reactive with the monoclonal antibody AML-2-23. *J. Immunol.* 135: 1929-1936, 1985
- Pan Z., Zhou, L., Hetherington, C.J., Zhang, D.E. Hepatocytes contribute to soluble CD14 production, and CD14 expression is differentially regulated in hepatocytes and monocytes. *J. Biol. Chem.* 275(46): 36430-36435, 2000
- Stelter, F., Pfister, M., Bernheiden, M., Jack, R.S., Bufler, P., Engelmann, H., Schütt, C. The myeloid differentiation antigen CD14 is N- and O-glycosylated – Contribution of N-linked glycosylation to different soluble CD14 isoforms. *Eur. J. Biochem.* 236: 457-464, 1996
- Stryer, L. *Biochemie*, Spektrum Akad. Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994
- Sudan, A., Ryan, L., Brinch, L., Espevik, T., Waage, A. The involvement of CD14 in stimulation of TNF production from peripheral mononuclear cells isolated from PNH Patients. *Scand. J. Immunol.* 41: 603-608, 1995

## 5 Funktionen des löslichen CD14 (sCD14)

Entzündungsreaktionen werden begleitet von der Bindung peripherer Blutleukozyten an das Endothel der Gefäßwände. Die Diapedese und Migration der Leukozyten ins umgebende Gewebe folgen. Auf der Oberfläche der Leukozyten müssen die komplementären Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen sitzen, so dass sich die zirkulierenden Zellen an der Gefäßwand anheften können. Nach der Adhäsion sind sie in der Lage, durch die Endothelzellen hindurch in das umgebende Gewebe hindurchzuwandern. Es sind verschiedene Familien von Adhäsionsmolekülen bekannt:

1. Die Integrinfamilie auf den Leukozyten (z.B. CD11a/CD18)
2. Die Selektinfamilie (z.B. ELMA-1, GMP-140, LAM-1)
3. Die Ig-Superfamilie auf den Endothelzellen der Gefäße (z.B. antigenspezifische Rezeptoren der B- und T-Lymphozyten)

TNF $\alpha$  und IL-1 können eine Erhöhung der Expression der Adhäsionsmoleküle induzieren. Die verschiedenen Adhäsionsmoleküle binden verschiedene Fraktionen der im Blut zirkulierenden Leukozyten: zuerst die neutrophilen Granulozyten, später Monozyten und Lymphozyten. Monozyten und Endothelzellen gehören zu den ersten Zellen, die in Kontakt mit zirkulierendem LPS kommen. Endothelien exprimieren aber auf ihrer Oberfläche kein CD14. Dennoch „reagieren“ sie auf einen LPS-Kontakt mit Freisetzung von IL-1, IL-6 und der Regulierung des Gefäßtonus durch Freisetzung von NO und PGI<sub>2</sub>. Sie können auch die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (z.B. ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1) induzieren und zur Bekämpfung der Infektion beitragen [Roitt et al. 1995].

### 5.1 Vermeintlich mCD14-negative Zellen?

Bisher wurden Epithelzellen, Fibroblasten, die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und die Endothelzellen zu den mCD14-negativen Zellen gerechnet. Dieses Bild hat sich zum Teil gewandelt.

#### 5.1.1 Endothelzellen

LPS kann die Endothel-Barriere in vivo und in vitro direkt überwinden. Der LPS-induzierte Verlust der Endothel-Barriere ist Protein-Synthese unabhängig. Man macht den Lipid A – Anteil für die für die Aktivierung der mCD14-freien Endothelzelle verantwortlich. Moleküle, die Lipid A binden oder neutralisieren können, könnten der Dysfunktion der Endothel-Barriere entgegenwirken. Bis heute ist relativ wenig bekannt über die Interaktion des LPS mit nicht –mCD14-tragenden Zellen. Es ist noch kein Rezeptor für LPS auf den Endothelien identifiziert worden. Die Anwesenheit zusätzlicher Moleküle wie LBP und sCD14 ist Voraussetzung für die Aktivierung der Endothelien. In Abwesenheit von LBP und sCD14 kann die Konzentration des LPS 200000-fach ansteigen, um den selben Zuwachs der Permeabilitätssteigerung zu erreichen. Die LPS-induzierte Aktin-Depolymerisation scheint ebenfalls am Öffnen des parazellulären Nebenweges und am Verlust der Monolayer-Integrität beteiligt zu sein. Der Schaden am Endothel wird auch verantwortlich gemacht für das Entstehen des Multi-Organ-Versagens. Daher kommt der

Erforschung der LPS-angeregten Endothel-Dysfunktion entscheidende Bedeutung zu [Bannerman 1999].

Lösliches CD14(sCD14) erhöht die Permeabilität der Endothelzellen gegenüber LPS. Die Anwesenheit von neutralisierenden anti-CD14 Antikörpern hob den Effekt der Permeabilitätssteigerung wieder auf. Das LPS-bindende Protein LBP ist nicht notwendig für den Effekt der Permeabilitätssteigerung [Ishii 1995].

Jersmann et al. [2001] widerlegten die oben genannten Thesen: Mit Verbesserung der Immunassay-Methoden konnten sie CD14 (mCD14) im Endothel von menschlichen Umbilikal-Venen nachweisen. Allerdings war die Expression etwa 20-fach niedriger als die auf Monozyten. Zusätzlich wurde deren Expression durch LPS und Lysophosphatid gesteigert. Sie erklären die Endothel-Funktion also mit dem Zusammenwirken von mCD14 auf Endothelzellen und sCD14 im Serum.

### 5.1.2 Zellen der glatten Gefäßmuskulatur

Im Verlauf eines septischen Schocks kommt es zum Blutdruckabfall, möglicherweise bedingt durch eine direkte Wechselwirkung zwischen LPS und den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur. Es konnte nachgewiesen werden, dass die glatten Gefäßmuskelzellen weder mCD14 auf ihrer Oberfläche tragen, noch CD14-mRNA exprimieren. Allerdings werden auch diese Zellen durch LPS aktiviert [Lopponow 1995].

### 5.1.3 Fibroblasten

Die Fibroblasten des gingivalen Bindegewebes sind die ersten Zellen, die mit LPS in Kontakt kommen. Man geht auch davon aus, dass Fibroblasten kein mCD14 tragen [Hayashi et al. 1996]. Das Bakterium *Porphyromonas gingivalis* induziert eine ICAM-1 Expression, die sCD14 abhängig ist [Masaka et al. 1999]. Die Überexpression von ICAM-1 scheint an dem Rückgang der inflammatorischen Zellen bei der Parodontitis beteiligt zu sein.

Die Entzündung der synovialen Fibroblasten bedingt die rheumatoide Arthritis. Niedrige Konzentrationen von LPS und sCD14 steigerten die ICAM-1 Expression in den synovialen Fibroblasten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass synoviale Fibroblasten sensitiv gegenüber LPS in Anwesenheit von sCD14 sind [Yu et al. 1998].

### 5.1.4 Epithelzellen

Die gingivalen Epithelzellen bilden die erste Barriere gegen die orale Bakterienflora. Uehara et al. [2001] stimulieren die gingivalen Epithelzellen (Keratinocyten) der Zelllinie KB und Epithelzellen des Kolons aus der Zelllinie SW60 mit verschiedenen Bakterienstämmen. Die SW60-Zellen produzierten sCD14-abhängig Interleukin-8 als Reaktion auf Lipopolysaccharid, Lipoteichon und Peptidoglykan. Die Keratinocyten produzierten kein IL-8, auch nicht in Anwesenheit von Serum (in dem sich sCD14 befindet). Epithelzellen des menschlichen Kolons exprimierten kein mCD14. Dieser Nachweis wurde mit „Flow-Cytometrie“, mit CD14-mRNA-Expression und „reverse-Transkriptase-PCR“ erbracht. Im Gegensatz hierzu exprimierten gingivale Epithelzellen TLR2-, TLR4-, MD2- und MyD88-Rezeptoren.

Funda et al. [2001] wiesen eine kleine Expression des membrangebundenen-CD14-Rezeptors (mCD14) der intestinalen Epithelzellen (ECLs) (die Zelllinien SW-480, HT-29,

Caco-2) mittels Western-Plott-Analyse und „reverse-Transkriptase-PCR“ nach. Allerdings stieg die Expression nicht nach Inkubation mit LPS an. Interessanterweise reagierten nur die SW-480 und HAT-29-Zellen auf eine LPS-Exposition mit der Freisetzung von IL-8. Caco-2-Zellen reagierten nicht auf die Stimulation mit LPS. Dafür konnte man Caco-2-Zellen nicht nur die Fähigkeit zur Expression sondern auch die Sekretion von sCD14 nachweisen. Dies könnte Bedeutung für die Funktion in vivo haben: sie könnten z. B. die Interaktion zwischen Bakterium und Mukosa-Immunsystem prägen oder an der Pathogenese des Endotoxin-Schocks beteiligt sein.

## 5.2 Transfer des LPS zum sCD14

LBP, das LPS-bindende Protein, ist ein Transfer-Protein, das den Transfer des LPS-Monomers von Mizellen zum bindenden Ende des sCD14 katalysiert. Außerdem katalysiert es den Transfer der LPS-sCD14-Einheit zu den HDL-Partikeln. Mittels Fluorophosphorylierung (Fluoreszenz-Untersuchung) des LPS kann man den Transfer beobachten. Die spontane Bindung des LPS an sCD14 war sehr schwach, sie ließ sich aber durch die Zugabe von LBP (unterhalb des stöchiometrischen Wertes) enorm steigern [Yu et al. 1996].

sCD14 kann als „Shuttle“ für bakterielles LPS und Phospholipide gelten. Dieses Shuttle befördert LPS und Phospholipid-Monomere aus LPS-Komplexen oder Lysosomen zu HDLs. SCD14 moduliert außerdem den Transport von LPS und Phosphatidylinositol **in Zellen hinein**. Sugiyama et al. [2001] konnten auch beweisen, dass sCD14 auch den Transport des Phosphatidylinositol **aus den Zellen heraus** modulieren kann.

### 5.2.1 Die unterschiedlichen Domänen des sCD14

Der monoklonale Antikörper des CD14, wie MEM-18 oder 3C10, können die biologische Aktivität des CD14 hemmen. Dabei dockt MEM-18 an der LPS-Bindungsstelle des CD14 an, die zwischen der Aminosäuresequenz 57-64 liegt. 3C10 bindet zwischen der Aminosäure 7 bis 10 und 11 bis 14. Die Domäne der Aminosäuresequenzen 7-10 regulierte den IL-6 Anstieg und die NF-kappaB Aktivierung in U373-Zellen. Diese Domäne wiederum scheint nicht für die Bindung des LPS sowohl mit, als auch ohne LBP, verantwortlich zu sein.

## 5.3 Direkter und indirekter Aktivierungsweg von Endothelzellen durch LPS

Für die Induktion der Endothelzellen auf LPS stehen zwei Wege zur Verfügung:

1. Der direkte Weg: LPS, LBP und sCD14 gehen eine Interaktion ein, die nur in Anwesenheit von Serum eintreten kann. Die dabei gebildeten LPS-sCD14-Komplexe reagieren dann mit einem noch unbekanntem Rezeptor auf der Endotheloberfläche und induzieren die Zellantwort [Pugin et al. 1993a].

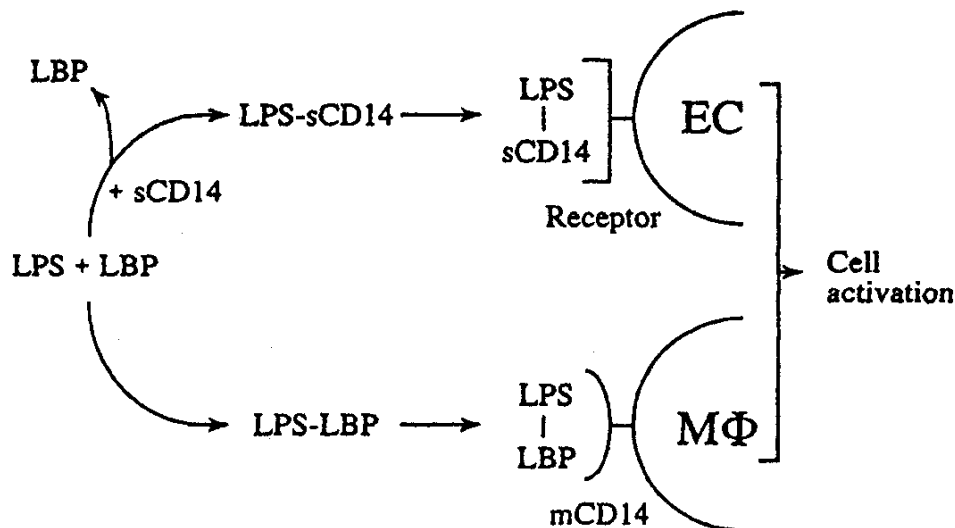


Abbildung 13: Modell für die LPS-, LBP- und CD14-abhängige Aktivierung von Makrophagen (CD14+) und Endothelzellen (CD14-) (aus Pugin, J., Schürer-Maly, C.-C., Leturcq, D., Moriarty, A., Ulevitch, R.J., Tobias, P.S. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl., Acad., Sci., USA* 90: 2744-2748, 1993).

2. Der indirekte Weg: Zirkulierendes LPS löst z.B. bei Monozyten und Makrophagen über mCD14 die Freisetzung von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren aus.  $\text{TNF}\alpha$  und IL-1 wirken dann ihrerseits, also LPS-unabhängig auf Endothelzellen. Peptidoglykan bindet an mCD14 und sCD14 und aktiviert Makrophagen über einen mCD14-abhängigen Weg. Ähnlich wie LPS aktiviert PG Endothel und Epithelzellen in Gegenwart von Blut direkt durch Induktion von Monozyten zur  $\text{TNF}\alpha$ - und IL-1-Sekretion [Jin et al. 1998].

#### 5.4 LPS-Bindung an ein 80-kDa-Membranprotein?

Geht man von der These aus, dass Endothelzellen kein CD14 exprimieren, so verwundert, dass LPS-sCD14-Komplexe Reaktionen, wie Zytokinsynthese oder PGE, hervorrufen können. Es muss also auf der Oberfläche aller mCD14-negativen Zellen Erkennungs- und Signaltransduktionsmoleküle geben. Gleichzeitig müssen auch mCD14-positive Zellen zusätzliche an der Weitergabe des LPS-Signals beteiligte Moleküle besitzen, da das CD14-Molekül aufgrund seiner Struktur hierzu nicht in der Lage ist.

Als möglicher Kandidat hierfür konnte ein 80 kDa-Membranprotein identifiziert werden. An dieses Membranprotein bindet Lipid A in Anwesenheit von Serum. Eine unspezifische Reaktion ist unwahrscheinlich, da die bevorzugte Bindung von Lipid A an dieses Protein auch noch bei sehr niedrigen Lipid-A-Konzentrationen nachweisbar war. In Abwesenheit von Serum bindet Lipid A an verschiedene Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 35kDa und 50kDa. Die Serumfaktoren, die die LPS-Bindung an das 80 kDa-Protein vermitteln, wurden als sCD14 und LBP identifiziert. Entscheidend war die gleichzeitige

Anwesenheit beider Faktoren, einer alleine konnte die Bindung nicht ermöglichen [Schletter et al. 1995].

### 5.5 Neutralisierung von LPS durch sCD14 in vitro

Monozyten, also mCD14-positive Zellen, reagieren in vitro völlig anders auf sCD14 als mCD14-negative Zellen. Mit LPS stimulierte Monozyten produzieren in Anwesenheit von Serum Sauerstoffradikale. In Abwesenheit von Serum waren die Monozyten nicht aktivierbar [Schütt et al. 1991]. Erhöhte man die physiologische sCD14-Konzentration auf das 4- bis 10-fache, so konnte LPS die Monozyten nicht mehr aktivieren [Schütt et al. 1992]. Bei unphysiologisch hohen Konzentration reagiert sCD14 bei Monozyten also als LPS-Antagonist und neutralisiert seine Effekte. Unter diesen Bedingungen konkurrieren sCD14 und mCD14 offensichtlich um LPS.

Zusammenfassend ergibt sich, dass lösliches CD14 als „Agonist“ eine wichtige Rolle bei der LPS-induzierten Aktivierung mCD14-negativer Zellen spielt, andererseits aber in Abhängigkeit von seiner Konzentration auch „antagonistisch“ zu LPS auf mCD14-positive Zellen wirken kann.

### 5.6 Lösliches CD14 im Gesamtzusammenhang der Sepsis

Dass CD14 beim Entstehen der Sepsis mit beteiligt ist, scheint heute unbestritten zu sein. Dennoch ist die Rolle des löslichen CD14 noch nicht gänzlich geklärt. Beobachtet man das Verhalten von C-reaktivem Protein, mCD14 und sCD14 während einer Sepsis, so fällt Folgendes auf:

1. Die Expression des membrangebundenen CD14 (mCD14) ist mit der Schwere der Sepsis negativ korreliert. Persistierende niedrige mCD14-Expressionen scheinen ein Indikator für die Schwere der Sepsis zu sein.
2. Membrangebundenes CD14 ist mit dem c-reaktivem Protein und der Leukozytenelastase negativ korreliert.
3. Vermehrtes Auftreten von löslichem CD14 (sCD14) ist im Verlauf einer Sepsis günstig, denn es kann eine „Heilungstendenz“ anzeigen [Gluck et al. 2001].

Der Benefit des löslichen CD14 könnte darin liegen, dass es die biologische Aktivität der zirkulierenden Endotoxine modulieren kann [Hiki et al. 2000].

#### 5.6.1 Lösliches CD14 induziert das Wachstum von B-Lymphozyten

Die Induktion des Wachstums und der Differentiation der ruhenden B-Lymphozyten beruht auf einer Reihe von aufeinander abgestimmten Signalen, die ausgelöst werden durch die Berührung mit aktivierten T-Helfer-Zellen. Diese Signale laufen in einer Art Kaskade ab, die einander bedingen. Das lösliche CD14 umgeht die physiologischen Blockaden, die die B-Zell-Aktivierung einschränken können. Das Wachstum und die Differentiation von B-Zellen kann in vitro durch natives und rekombinantes sCD14 bereits im nanomolaren Bereich ausgelöst werden. Diese sCD14-abhängige Aktivierung benötigt keine mCD14-



Expression, aber sie benötigt den Toll-like-receptor4. Übereinstimmend mit der biologischen Aktivität des sCD14 in vitro, steigt die Immunglobulinkonzentration nach sCD14 auch in neonatalen Mäusen an [Filipp et al. 2001]

### 5.6.2 Lösliches CD14 im Liquor

Nocker et al. untersuchten das Auftreten des sCD14 im Liquor während bakteriellen Infektionen und viralen Meningitiden [1999]. Zunächst fiel dieser Arbeitsgruppe auf, dass das im Liquor nachgewiesene CD14 lokal im Gehirn entstanden sein muss, da die Liquor /Blut-Ratio extrem hoch war. Patienten mit neurologischen Krankheiten, die nicht infektiös bedingt waren, zeigten kein erhöhtes sCD14. Während einer akuten Meningitis stieg sCD14 extrem an. Es bestand aber keine direkte Korrelation mit dem Anstieg der Monozyten im Liquor, daher kann sCD14 in diesem Fall auch nicht nur von den Monozyten abstammen. Wurde die Infektion durch Staphylokokkus aureus oder Listeria monocytogenes ausgelöst, stiegen die Werte am höchsten an. Während der klinischen Genesung der Patienten nahm auch das sCD14 wieder ab. Auch während einer viralen Meningitis konnten erhöhte sCD14-Werte nachgewiesen werden. SCD14 kann daher als verwertbarer Indikator für eine Makrophagenaktivierung bei inflammatorischen Prozessen herangezogen werden [Nockher et al. 1999]

### 5.6.3 Lösliches CD14 und humanes Laktoferrin

Laktoferrin (Lf) ist ein Glykoprotein und Chelatbinder des LPS. Laktoferrin kann daher Tiere vor einem septischen Schock schützen. Humanes Laktoferrin bindet mit einer hohen Affinität an sCD14. Baveye et al. [2000] konnten nachweisen, dass die Interaktion von humanem Lf mit sCD14 die Expression des „endothelial-leukocyte adhesion molecule 1“ (= E-Selektin) und des ICAM-1 modulieren kann. So konnte nachgewiesen werden, dass der anti-inflammatorische Effekt des humanen Lf nicht nur auf der Chelatbindungsfähigkeit des LPS beruht, sondern auch auf der Interaktionsfähigkeit mit sCD14. Dies könnte die Aktivierung der Endothelzellen modulieren.

### 5.6.4 Lösliches CD14 in der Muttermilch

In der humanen Muttermilch konnte im Gegensatz zum Serum nur eine Isoform des CD14, nämlich die lösliche, nachgewiesen werden. Produktionsort des sCD14 sind die Epithelzellen der Mamma, falls diese durch LPS oder Bakterien aktiviert wurden. Das Milch-sCD14 kann nun Reaktionen der angeborenen Immunantwort auslösen: Sekretion des IL-8, des TNF $\alpha$  und des Epithel-Neutrophilen-Aktivator-78. Diese Moleküle werden dann durch die intestinalen, CD14-negative Epithelzellen sezerniert. Wahrscheinlich ist auch, dass LBP bei diesen biologischen Effekten einen Anteil nimmt, auch wenn es nur in sehr geringer Konzentration in der Muttermilch nachgewiesen wurde. Somit kann Milch-sCD14 als „Wach-Molekül“ und Immunmodulator Immunabwehr des neonatalen Intestinums wirken. Wahrscheinlich bewahrt sCD14 gestillte Säuglinge vor Darminfekten, für welche nicht-gestillte Säuglinge prädisponiert sind [Vidal et al. 2001].

### 5.6.5 SCD14 im Fruchtwasser

Die Anwesenheit von LBP und sCD14 spiegeln die hohe Konzentration von Zytokinen im Fruchtwasser wieder. Bei afebrilen schwangeren Frauen, mit vorzeitiger Wehentätigkeit, konnte LBP und sCD14 im Fruchtwasser nachgewiesen werden (mittels abdominalen Paracentese). Interessanterweise war sCD14 negativ korreliert mit dem Gestationsalter des Feten. So nahm die sCD14-Konzentration mit jeder weiteren Schwangerschaftswoche

um 3,5% ab. Dabei spielte es keine Rolle, ob im Fruchtwasser ein Bakterienwachstum nachgewiesen werden konnte, oder nicht. LBP und sCD14 verhielten sich proportional zur gemessenen IL-6-Konzentration im Fruchtwasser. Diese Moleküle können die Zytokin-Antwort verstärken. Sie könnten so die Anwesenheit von Interleukinen im Fruchtwasser indirekt nachweisen, wenn die anwesende Mikrobeanzahl nicht nachweisbar ist [Gardella et al 2001].

#### Literatur:

- Bannermann, D.D., Goldblum, S.E. Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. *Lab. Invest.* 79(10): 1181-1199, 1999
- Baveye, S., Ellass, E., Fernig, D.G., Blanquart, C., Mazurier, J., Legrand, D. Human lactoferrin interacts with soluble CD14 and inhibits expression of endothelial adhesion molecules, E-selectin and ICAM-1, induced by the CD14-lipopolysaccharide complex. *Infect. Immun.* 68(12): 6519-6525, 2000
- Filipp, D., Alizadeh-Khiavi, K., Richardson, C., Palma, A., Paredes, N., Takeuchi, O., Akira, S., Julius, M. Soluble CD14 enriched in colostrum and milk induces B cell growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(2): 603-608, 2001
- Funda, D.P., Tuckova, L., Farre, M.A., Iwase, T., Moro, I., Tlaskalova-Hogenova, H. CD14 is expressed and released as soluble CD14 by human intestinal epithelial cells in vitro: lipopolysaccharide activation of epithelial cells revisited. *Infect. Immun.* 69(6): 3772-3781
- Gluck, T., Silver, j., Epstein, M., Cao, P., Farber, B., Goyert, S.M. Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis *Eur. J. Med. Res.* 6(8): 351-358
- Gardella, C., Hitti, J., Martin, T.R., Rudzinski, J.T., Eschenbach, D. Amniotic fluid lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 as mediators of the inflammatory response in preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184(6): 1241-1248, 2001
- Hayashi, J., Masaka, T., Saito, I., Ishikawa, I. Soluble CD14 mediates lipopolysaccharide-induced intercellular adhesion molecule 1 expression in cultured human gingival fibroblasts. *Infect. Immun.* 64: 4946-4951, 1996
- Hiki, N., Berger, D., Mimura, Yy., Frick, J., Dentener, M.A., Buurman, W.A., Seidelmann, M., Kaminishi, M., Beger, H.G. Release of endotoxin-binding proteins during major elective surgery: role of soluble CD14 in phagocytic activation. *World J. Surg.* 24(5): 499-506, 2000
- Ishii, Y., Shuryi, W., Kitamura, S. Soluble CD14 in serum mediates LPS-induced increase in permeability of bovine pulmonary arterial endothelial cell monolayers in vitro. *Life. Sci.* 56(25): 2263-2272, 1995

- Jersmann, H.P., Hii, C.S., Hodge, G.L., Ferrante, A. Synthesis and surface expression of CD14 by human endothelial cells. *Infect. Immun.* 69(1): 479-485
- Jin Y., Gupta, C., Dziarski, R. Endothelial and epithelial cells do not respond to complexes of peptidoglycan with soluble CD14 but are activated indirectly by peptidoglycan-induced tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 from monocytes. *J. Infect. Dis.* 177: 1629-1638, 1998
- Juan, T.S., Hailman, E., Kelley, M.J., Wright, S.D., Lichenstein, H.S. Identification of a domain in soluble CD14 essential for lipopolysaccharide (LPS) signaling but not LPS binding. *J. Biol. Chem.* 279(29): 17237-17242, 1995
- Loppnow, H., Stelter, F., Schönbeck, U., Schlüter, C., Ernst, M., Schütt, M., Flad, H.-D. Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA of endogenous membrane CD14. *Infect. Immun.* 63: 1020-1026, 1995
- Masaka, T., Hayashi, J., Ishikawa, I. Soluble CD14-dependent intercellular adhesion molecular-1 induction by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *J. Periodontol.* 70(7): 772-778, 1999
- Nockher, W.A., Wick, M., Pfister, H.W. Cerebrospinal fluid levels of soluble CD14 in inflammatory and non-inflammatory diseases of the CNS: upregulation during bacterial infections and viral meningitis. *J. Neuroimmunol.* 101(2): 161-169, 1999
- Pugin, J., Schürer-Maly, C.-C., Leturcq, D., Moriarty, A., Ulevitch, R.J., Tobias, P.S. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90: 2744-2748, 1993a
- Schletter, J., Brade, H., Brade, L., Krüger, C., Lopponow, H., Kusumoto, S., Rietschel, E.T., Flad, H.D., Ulmer, A.J. Binding of lipopolysaccharide (LPS) to an 80-kilodalton membrane protein of human cells is mediated by soluble CD14 and LPS-binding protein. *Infect. Immun.* 63: 2576-2580, 1995
- Schütt, C., Schilling, T., Krüger, C. Endotoxinneutralisation durch lösliches CD14 in vitro. *Infekt.* 20: 87-88, 1992
- Schütt, C., Schilling, T., Krüger, C. sCD14 prevents endotoxin inducible oxidative burst response to human monocytes. *Allerg. Immunol.* 37: 159-164, 1991
- Sugiyama, T., Wright, S.D. Soluble CD14 mediates efflux of phospholipids from cell. *J. Immunol.* 166(2): 826-831, 2001
- Uehara, A., Sugawara, S., Tamai, R., Takada, H. Contrasting responses of human gingival and colonic epithelial cells to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans in the presence of soluble CD14. *Med. Microbiol. Immunol.* 189(4): 185-192, 2001
- Vidal, K., Labeta, M.O., Schiffrin, E.J., Donnet-Hughes, A. Soluble CD14 in human breast milk and its role in innate immune responses. *Acta. Odontol. Scand.* 58(5): 330-334

- 
- Yu, S., Wright, S.D. Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14. *J. Biol. Chem.* 271(8): 4100-4105, 1996
  - Yu, S., Nakashima, N.; Xu, B.H., Matsuda, T., Izumihara, A., Sunahara, N., Nakamura, T., Tsukano, M., Matsuyama, T. Pathological significance of elevated soluble CD14 production in rheumatoid arthritis: in the presence of soluble CD14, lipopolysaccharides at low concentration activated RA synovial fibroblasts. *Rheumatol. Int.* 17(6): 237-243, 1998

**6 CD 14<sup>low</sup>-CD16<sup>high</sup>-Monozyten**

Die Mehrzahl der Monozyten zeigt eine starke CD14- und eine schwache CD16-Expression (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup>). Eine kleine Monozytenpopulation kann mit Hilfe der FACS-Analyse identifiziert werden, die einen niedrigen CD14- und einen hohen CD16-Expressionsspiegel hat. Die Größe dieser Fraktion wird mit unter 5% [Passlick et al. 1989] bis ca. 9 +/- 5% [Ziegler-Heitbrock et al. 1993] beziffert.

## 6.1 Phänotypische und funktionelle Analyse

CD 14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Zellen haben die typische Morphologie von Monozyten, besitzen aber einen unregelmäßig geformten Nukleolus. Sie zeigen ein spezifisches Muster an Oberflächenmolekülen:

Oberflächenantigen	Funktion des Antigens	Expression bei CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup> -Zellen (verglichen mit CD14 <sup>high</sup> CD16 <sup>low</sup> -Monozyten).
MHC-II-Moleküle	Präsentierende T-Zellen Antigene	Ca. 4-fach <b>höher</b>
CD11b (CR3)	Adhäsionsmolekül aus der Familie der Integrine. Rezeptor für das C3bi-Fragment (Komplement); wichtig für die Phagozytose opsonierender Partikel	Ca. 2-fach niedriger
CD33	Bereits auf sehr frühen Vorläuferzellen der Myelopoese vorhanden; Expression nimmt mit zunehmendem Differenzierungsgrad ab	Ca. 2-fach niedriger
CD32 (Fc $\gamma$ RII)	Rezeptor mit mittlerer Affinität für IgG	Vergleichbar
CD64 (Fc $\gamma$ RI)	Rezeptor mit hoher Affinität für IgG	Deutlich niedriger
VLA-4	Adhäsionsmolekül aus der Familie der Integrine; Wechselwirkung mit VCAM, d.h. beteiligt an Leukozyten-Endothel-Wechselwirkungen, an der Einwanderung der Zellen ins Gewebe	Deutlich <b>höher</b>
CD54 (ICAM-1)	Adhäsionsmolekül aus der Immunglobulin-Supergenfamilie; Expression nach Aktivierung der Monozyten	Deutlich <b>höher</b>

*Tabelle: Vergleich der Expression verschiedener Oberflächenantigene zwischen CD14<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup> und CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten (nach [Ziegler-Heitbrock et al. 1993;1996]).*

Die CD14/16-Zellen exprimieren auch andere Chemokine-Rezeptoren als CD14<sup>++</sup>Monozyten: MIP-1 $\alpha$  (Makrophagen-Inflammatiions-Protein 1alpha) wird sehr viel

höher exprimiert, während MCP-1 (Monocyten-Chemotaxis-Protein 1) gar nicht exprimiert wird. Diese Unterschiede zeigen sich auch in der Analyse der mRNA: durch PCR-Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Transkriptionsspiegel des MIP-1 $\alpha$  sehr viel höher sind und die des MCP-1 deutlich niedriger als bei den CD14 Monozyten. Außerdem wird die CD11b-Oberflächenexpression bei den CD14<sup>+</sup>Monozyten durch MCP-1 und bei den CD14/16-Zellen durch MIP-1 $\alpha$  induziert [Weber et al. 2000].

## 6.2 Reifegrad

Ziegler-Heitbrock et al. [1993] verglichen die beiden Subpopulationen aus dem Blut mit reifen Gewebemakrophagen.

	CD14 <sup>high</sup> CD16 <sup>low</sup>	CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>high</sup>	Alveolarmakrophagen (AM)	Monozytenabgeleitete Makrophagen (MDM)
CD16	Schwach	>1	>1	>1
CD14	Stark	<1	<1	<1
MHC II		>1	>1	>1
CD11b		<1	<1	<1
CD33		<1	<1	<1

*Tabelle: Vergleich der Expression verschiedener Oberflächenantigene auf CD14<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup>-Monozyten, Alveolarmakrophagen (durch bronchoalveoläre Lavage gewonnen) sowie monozytenabgeleiteten Makrophagen (normale Monozyten wurden für 5 Tage in 10% Humanserum kultiviert). „1“ steht für CD14<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup>-Monozyten (nach Ziegler-Heitbrock et al. [1993]; Ziegler-Heitbrock et al. [1996]).*

Wurden bei der Kultivierung der normalen Monozyten alle CD16-tragenden Zellen entfernt, also auch CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>, so bilden sich dennoch MDM mit dem oben beschriebenen Muster an Zelloberflächenmolekülen. Da hier wieder CD16 nachgewiesen werden konnte, stammen die MDM-Zellen wahrscheinlich von den CD14<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup>

Monozyten ab. Interessanterweise zeigen die AM und die MDM-Zellen das gleiche Expressionsmuster für die Oberflächenantigene wie die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Subpopulation.

CD33, ein myelomonozytäres Stammzellantigen, dessen Expression während der Reifung abnimmt, ist in der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Fraktion nur gering vertreten [Ziegler-Heitbrock et al. 1993; 1994]. Vermutlich handelt es sich also bei den CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Zellen um eine reifere Version der Monozyten mit Eigenschaften von Gewebsmakrophagen. Man könnte sie vielleicht als Gewebsmakrophagen bezeichnen, die das „Gefäßendothel noch nicht passiert“ [Ziegler-Heitbrock et al. 1996] haben, oder als „zirkulierende Makrophagen“ [Thieblemont et al. 1995]. Welche Zytokine in vivo an der Reifung beteiligt sind, ist noch unklar. Bekannt ist, dass IL-1, IL-4, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TGF- $\beta$  und GM-CSF in vitro die Expression von CD14 und CD16 auf Monozyten veränderten [Clerici et Shearer 1994; Sioicco et al. 1993; Aukrust et al. 1994, Clerici et al. 1994].

1. TGF- $\beta$  (Transforming-growth-factor- $\beta$ ) induzierte die Bildung von CD16 auf Monozyten. Die CD14-Expression blieb darunter aber gleich [Welch et al.1990].
2. IL-4 regelte die Expression von CD14 herunter [Lauener et al. 1990; Ruppert et al. 1991]. Allerdings regelt es auch die Expression von CD16 in gleicher Weise herunter [Wong et al. 1991].

Wahrscheinlich ist also nicht ein einziges Zytokin, sondern die Kombination mehrerer für die Induktion des CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Phänotyps verantwortlich.

Entsprechend kann es während einer Krankheit, bei der sich das natürliche Zytokinmilieu verändert, zu einem Anstieg der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Subpopulation kommen.



### 6.2.1 CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Zellen als dendritische Zellen

Während einer HIV-Infektion steigt der Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Zellen deutlich an, dennoch ist die pathophysiologische Rolle dieser Subpopulation immer noch unklar. CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Zellen können in vitro durch Kultivierung mit GM-CSF, IL-4 und IL-10 aus peripheren Blutmonozyten entstehen. Die CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>-Monozyten exprimieren CD40, CD80, CD86, HLA-DR, CD11b, CD11c, CD18, CD1a und CD83. Dies sind allerdings auch typische Merkmale dendritischer Zellen. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>-Zellen exprimieren außerdem einen geringen Anteil an IL-1beta/il-1ra mRNA. Ähnlich wie dendritische Zellen exprimieren sie aber IL-6-, MIP-1alpha-, MIP-1beta-, MCP-1-, IL-8-, RANTES- und I-309-Transkripte. Diese Subpopulation produziert außerdem ILK-12, MCP-1 und IL-8. Dies deutet darauf hin, dass (zumindest in vitro) die CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>-Zellen von peripheren Blutmonozyten abstammen, aber eindeutig dendritische Zellcharakteristika entwickeln [Ancuta et al. 2000]

### 6.2.2 M-DC8-positive Leukozyten sind eine Subpopulation der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Zellen

Die M-DC8-positiven Leukozyten wurden als eine Subpopulation der menschlichen, dendritischen Zellen beschrieben. Diese Zellen exprimieren CD16 auf ihrer Oberfläche und sie können aus Blutmonozyten entstehen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Expression des m-DC8 mit den CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>-Zellen assoziiert sein könnte. Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass der Anteil der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> Zellen aller Leukozyten etwa 3-fach höher ist als der der m-DC8-Zellen. m-DC8 Zellen zeigen auch eine schwache Expression des CD14. Die FACS-Analyse konnte zeigen, dass CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>-Zellen in mehr als einem Drittel (42,3%) auch m-DC8 exprimieren und umgekehrt nahezu alle m-DC8-Zellen auch CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> sind. Bei Gesunden konnte m-DC8 auch in den Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden. Somit kann man die m-DC8-Zellen als Subpopulation der CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>-Zellen ansehen [Siedlar et al. 2000].

## Literatur:

- Ancuta, P., Weiss, L., Haeffner-Cavaillon, N. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur. J. Immunol.* 30(7): 1872-1883, 2000
- Aukrust, P., Liabakk, N.-B., Müller, F., Lien, E., Espevik, T., Froland, S.S. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and soluble TNF receptors in human immunodeficiency virus type 1 infection- correlations to clinical, immunologic, and virologic parameters. *J. Infect. Dis.* 169: 420-424, 1994
- Clerici, M., Shearer, G.M. The Th1-Th2 hypothesis of HIV-infection: new insights. *Immunol. Today* 15: 575-581, 1994
- Clerici, M., Wynn, T.A., Berzofsky, J.A., Blatt, S.P., Hendrix, C.W., Sher, A., Coffman, R.L., Shearer, G.M. Role of interleukin-10 in T-helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J. Invest. Med.* 93: 768-775, 1994
- Lauener, R.P., Goyert, S.M., Geha, R.S., Vercelli, D. Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 20: 2375-2381, 1990
- Passlick, B., Flieger, D., Ziegler-Heitbrock, H.W.L. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74: 2527-2534, 1989
- Ruppert, J., Friedrichs, D., Xu, H., Peters, J.H. IL-4 decreases the expression of the monocyte differentiation marker CD14, paralleled by an increasing accessory potency. *Immunobiol.* 182: 449-464, 1991
- Siedlar, M., Frankenberger, M., Ziegler-Heitbrock, L.H., Belge, K.U. The m-DC8-positive leukocytes are a subpopulation of the CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes. *Immunobiology* 202(1): 11-17, 2000
- Sioicco, A., Biglino, A., Sciandra, M., Forno, B., Pollono, A.M., Raiteri, R., Giannini, P. Cytokine network and acute primary HIV-1 infection. *AIDS* 7: 1167-1172, 1993
- Welch, G.R., Wong, H.L., Wahl, S.M. Selective induction of Fc $\gamma$ RIII (CD16) expression by transforming growth factor- $\beta$  in human monocytes. *J. Immunol.* 144: 3444-3448, 1990
- Weber, C., Belge, K.U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M., Weber, K.S., Ziegler-Heitbrock, H.W. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulation. *J. Leukoc. Biol.* 67(5): 699-704, 2000
- Wong, H.L., Welch, G.R., Brandes, M.E., Wahl, S.M. IL-4 antagonizes an induction of Fc $\gamma$ RIII (CD16) expression by transforming growth factor- $\beta$  in human monocytes. *J. Immunol.* 147: 1843-1848, 1991

- 
- Ziegler-Heitbrock, H.W.L. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> subpopulation. *Immunol. Today* 17: 424-428, 1996
  - Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Schraut, W., Wendelgaß, P., Strobel, M., Sternsdorf, T., Weber, C., Aepfelbacher, M., Ehlers, M., Schütt, C., Haas, J.G. Distinct patterns of differentiation induced in the monocytic cell line Mono Mac 6. *J. Leukoc. Biol.* 55: 73-80, 1994
  - Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Fingerle, G., Ströbel, M., Stelzer, F., Schütt, C., Passlick, B., Pforte, A., A novel subset of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur. J. Immunol.* 23: 2053-2058, 1993

## 7 Funktion der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten

### 7.1 Besondere Charakteristika

Die Oberflächenrezeptoren der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten lassen bedingt Rückschlüsse auf ihre möglichen Aufgaben zu. PCR-Analysen zeigten für die proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6 eine vergleichbare mRNA-Expression bei beiden Subpopulationen [Frankenberger et al. 1996]. Im Gegensatz hierzu war die bei den CD14<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup>-Zellen deutlich detektierbare mRNA für IL-10 bei den CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Zellen kaum oder gar nicht nachweisbar. IL-10 ist ein potentes antiinflammatorisches Zytokin, das die Immunantwort herabsetzen kann, indem es die Expression vieler Zytokine senkt und die von Monozyten/Makrophagen abhängige T-Zellproliferation hemmt. Fehlt IL-10, so könnte man die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten als proinflammatorische Zellen sehen. CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten bewirken im Zusammenwirken von TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-10 eine **stärkere Entzündungsreaktion** als die konventionellen CD14<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup>-Zellen.

Aufgrund der niedrigen IL-10 Biosynthese und hohen MHC-II-Expression ist zu vermuten, dass CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Zellen **potentere antigen-präsentierende Zellen** sind als die CD14<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup>-Zellen.

Ziegler-Heitbrock et al. [1993] postulierten, dass bei CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten typische Monozytenfunktionen wie Phagozytose und Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen nur in abgeschwächter Form vorhanden sind. Dies wird auch durch die verminderte Expression von CD11b bewirkt. CD11b ist wichtig für die Phagozytose opsonierter Partikel [Wright et Silverstein 1893].

Dennoch konnten Nockher und Scherberich [1998] diese Beobachtung nicht bestätigen: Eine quantitative Bestimmung der Phagozytoseaktivität ergab, dass Zellen der

CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Subpopulation eine signifikant **höhere Phagozytoseaktivität** zeigten. Rothe et al. [1996] bestätigten diese Beobachtung.

Neben der Expression von VLA-4 ist bei den CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten auch die Zahl der CD11a- und CD18-Oberflächenantigene erhöht [Gabriel et al. 1994]. CD11a entspricht der  $\alpha$ - und CD18 der  $\beta$ -Kette des Lymphozytenfunktion-assoziierten-Antigens (LFA-1). LFA-1 ist ein Adhäsionsmolekül aus der Familie der Integrine. Dies deutet darauf hin, dass CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten **eine verstärkte Adhäsion an das Endothel** zeigen können und so verstärkt in das Gewebe einwandern könnten.

## 7.2 Klinische Relevanz von CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten

Die Bedeutung und das klinische Verhalten der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten ist nur sehr wenig erforscht und die Studienlage zum Teil sehr dürftig. Zur Kinetik dieser Monozytensubpopulation gibt es noch keine veröffentlichten Erfahrungen bei Lebererkrankungen, Hauterkrankungen, Herzinsuffizienz oder bei Transplantationspatienten, um nur einige Gebiete zu streifen.

### 7.2.1 CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten während einer Sepsis

Während einer Sepsis steigt der Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten stark an. Bei Gesunden liegen die Absolutwerte bei 45 +/- 22 Zellen/Mikroliter (9 +/- 5%). Diese Subpopulation stieg während einer Septikämie auf bis zu 500 Zellen/Mikroliter oder 50% aller Monozyten an. Am besten korrelierte dieser Anstieg mit der Körpertemperatur. Die Expression des CD14 nahm parallel hierzu deutlich ab. In der Drei-Farbenimmunfluoreszenz konnte ein höherer MHC-II-Antigen Anteil und ein niedriger CD11b und CD33 Spiegel nachgewiesen werden. IL-6 nahm während der Sepsis stark zu. Somit induziert die Septikämie eine Veränderung der Blutmonozyten-Zusammensetzung

und dies könnte zu der erhöhten Sekretion von Zytokinen, besonders IL-6 , führen [Ziegler-Heitbrock et al. 1993]. (Studienlage mit 18 Patienten)

Auch in einem Fallreport eines Patienten mit selbstinduzierter Sepsis wird auf die Bedeutung der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten hingewiesen. Der Patient fügte sich selbst eine Sepsis durch Einbringen von Fäzes in Harnblase und Vene zu. Er fieberte in Folge dessen bis auf 40 Grad auf. Es konnten hierbei hohe TNF $\alpha$ -, IL-6 und M-CSF-Spiegel gemessen werden. Blumenstein et al. [1997] machten deshalb die Zytokine für die vermehrte Expression von CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten verantwortlich.

### 7.2.2 CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten während einer Hämodialysebehandlung

Untersuchungen bei niereninsuffizienten Patienten, die sich einer Hämodialysebehandlung oder einer Peritonealdialysebehandlung unterzogen, zeigten, dass in beiden Kollektiven die Zahl der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten signifikant höher war als bei Gesunden. Der „macrophage colony stimulating factor“ ( M-CSF) war ebenfalls im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht. Dies deutet darauf hin, dass das endogen produzierte M-CSF an der vermehrten Expression der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten ursächlich mitwirkt [Saijonji et Ohsaka 2001].( 52 HD-Patienten, 36-CAPD Patienten)

Sester et al. [2001] machen für die Immundefizienz von Hämodialysepatienten die Monozytendysfunktion, die mit einem vermehrten Anstieg von Zytokinen vergesellschaftet ist, verantwortlich. Sie untersuchten das Verhalten von CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten während einer Hämodialysebehandlung. Vor der Dialyse zeigten die Patienten eine Monozytose mit einem sehr hohen Anteil an CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Zellen. Zu Beginn der Hämodialyse (HD) fiel der Anteil der Leukozyten stark ab, wobei die Monozyten am stärksten betroffen waren. Interessanterweise betrifft die Sequestration die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Zellen am meisten, so dass nach 30 Minuten bereits 83 +/- 9% dieser Subpopulation entfernt wurden. Dabei machte es keinen Unterschied, ob eine Polyamid-

oder eine Hämoph-Membran verwendet wurde. Dieser Effekt war aber nur temporär, so dass am Ende der Dialyse wieder Ausgangswerte erzielt wurden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass HD-Patienten unter einer chronischen Mikroinflammation leiden, die durch die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Zellen sehr gut repräsentiert wird. (14 HD Patienten)

Nockher et al. [2001] bestätigten diese Ergebnisse zum Teil bei Verwendung einer Cellulose-Membran für die HD. Auch hier trat eine temporäre Leukopenie für 30 Minuten auf. Nach 30 Minuten fiel der Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Zellen auf 33 +/- 15 % des Ausgangswertes ab. Nach 240 Minuten waren die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Zellen immer noch auf 67 +/- 11 % suppremiert und erst nach 6 Stunden nach HD erreichten sie wieder Ausgangswerte. Die Kinetik der Sequestration könnte auf einer veränderten Expression von MHC-Molekülen beruhen, die die Leukozyten-Leukozyten- und die Leukozyten-Endothel-Interaktion erleichtert [Nockher et al. 2001].

### 7.2.3 Das Verhalten der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten unter Glukokortikoidtherapie

Behandelt man Patienten mit Multipler Sklerose fünf Tage hochdosiert mit Glukokortikoiden, so hat dies Auswirkungen auf die Monozytenpopulation. Die „klassischen“ CD14-Monzyten stiegen von 495 +/- 132 Zellen/Mikroliter auf 755 +/- 337 Zellen/Mikroliter an. Die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten hingegen fielen dramatisch von 36 +/- 15 Zellen/Mikroliter auf 2 +/- 3 Zellen/Mikroliter ab. Bei einigen Patienten fiel diese Subpopulation sogar bis unter die Nachweisgrenze ab (< 0,2 Zellen/Mikroliter). Eine Woche nach Beendigung der Kortisonstoßtherapie waren die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten wieder auf Ausgangsniveau. Das Gesamtbild der Immunsuppression der Glukokortikoide könnte zum Teil auch auf der Wirkung auf die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten begründet sein. Vielleicht erweist sich der Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten in Zukunft als Parameter für die Effektivität der Immunsuppression bei Glukokortikoidtherapie [Fingerle-Rowson et al. 1998].(10 Patienten)

## Literatur

- Blumenstein, M., Boekstegers, P., Fraunberger, P., Andreesen, R., Ziegler-Heitbrock, H.W., Fingerle-Rowson, G. Cytokine production precedes the expansion of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock* 8(1): 73-75, 1997
- Fingerle-Rowson, G., Angstwurm, M., Andreesen, R., Ziegler-Heitbrock, H.W. Selective depletion of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes by glukokorticoïd therapy. *Clin. Exp. Immunol.* 112(3): 501-506, 1998
- Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A., Ziegler-Heitbrock, H.W.L. Differential cytokin expression in human blood monocytes subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87: 373-377, 1996
- Katayama, K., Matsubara, T., Fujiwara, M., Koga, M., Furukawa, S. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte subpopulation in Kawasaki disease. *Clin. Exp. Immunol.* 121(3): 566-570, 2000
- Nockher, W.A., Scherberich, J.E. Expanded CD14<sup>(+)</sup>CD16<sup>(+)</sup> monocyte subpopulation in hemodialyzed patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect. Immun.* 66: 2782-2790, 1998
- Nockher, W.A., Wiemer, J., Scherberich, J.E. Haemodialysis monocytopenia: differential sequestration kinetics of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>++</sup> blood monocyte subset. *Clin. Exp. Immunol.* 123(1): 49-55, 2001
- Rothe, F.G., Gabriel, H., Kovacs, E., Klucken, J., Stöhr, J., Kindermann, W., Schmitz, G. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Cell Biol.* 16: 1437-1447, 1996
- Rivier, A., Pene, J., Rabesandratana, H., Chanez, P., Bousquet, J., Campell, A.M. Blood monocytes of untreated asthmatics exhibit some features of tissue macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 100(2): 314-318, 1995
- Saionji K., Ohsaka, A., Expansion of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> blood monocytes in patients with chronic renal failure undergoing dialysis : possible involvement of macrophage colony-stimulating factor. *Acta Haematol.* 105(1): 21-26, 2001
- Sester, U., Sester, M., Heine, G., Laul, H., Girndt, M., Kohler, H. Strong depletion of CD14<sup>(+)</sup>CD16<sup>(+)</sup> monocytes during hemodialysis treatment. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16(7): 1402-1408, 2001
- Wright, S.D., Silverstein, S.C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J. Exp. Med.* 158: 2016-2023, 1893
- Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Fingerle, G., Ströbel, M., Stelter, F., Schütt, C., Passlick, B., Pforte, A., A novel subset of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> blood monocytes exhibites teatures of tissue macrophages. *Eur. J. Immunol.* 23: 2053-2058, 1993



## 8 Material

### 8.1 Antikörper

anti CD 14 –FITC \*

anti CD 14 –PE \*

anti CD 14 -Per-CP \*

anti 16 –PE \*

\* von „Becton Dickinson“

### 8.2 Chemikalien

*CellFix* ( 10 -fach konzentriert), Fixierlösung \*

*Cell Wash*, Waschpuffer \*

*FACS Flow*, Trägerflüssigkeit \*

*FACS Lysing Solution* \*

\* von „Becton Dickinson“

### 8.3 Geräte

FACScan, Durchflusszytometer \*

Rotana, Schwenkbecher-Zentrifuge \*

Vibrofix VF1 \*

und EDTA-Vollblut, EDTA Monovetten von „Sarstedt“

\* von „Becton Dickinson“

## 9 Methoden

### 9.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Unter Verwendung eines (fluorescence-activated cell sorter) fluoreszenzaktiviertem Zellsorter (FACS) lassen sich Zellen auftrennen und einordnen. Die zu untersuchenden Zellen weisen verschiedene Oberflächenproteine auf. Ein monoklonaler Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wird, kann in einer gemischten Population die gesuchten Zellen markieren.

### 9.2 Zellsortierung am FACS

Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte zunächst als „Dotplot“ (Punkthistogramm), wobei die Größe und Granularität der Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht gegenübergestellt wurden.

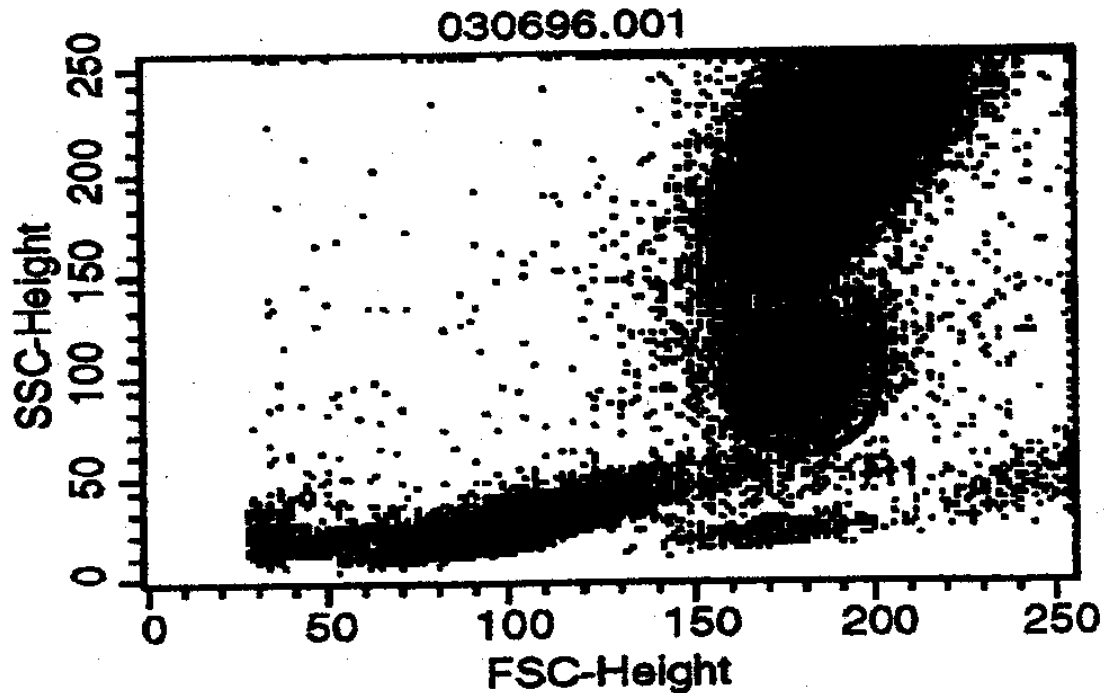


Abbildung14 : Darstellung einer Leukozytenprobe im sog. „Dotplot“. Im Vorwärtsstreulicht (FSC-Height) ist die Zellgröße, im Seitwärtsstreulicht (SSC-Height) die Granularität der Zellen erfasst. Die mittlere Wolke (R1) stellt die Monozytenpopulation dar.

Am größten ist die Lichtstreuung im Winkelbereich von  $0^\circ$  bis  $10^\circ$ , auch Vorwärtsstreulicht (Forward Angle Light Scatter, [FSC]) genannt. Dieses ist sensitiv für die Querschnittsfläche der Zellen und gibt Auskunft über die Zellgröße. Der geringere Teil der Lichts wird seitwärts gestreut (Side Scatter, [SSC]) in einem Bereich von  $90^\circ$ . Dies ist ein Maß für die Granularität und äußere Form der Zellen, da es sensitiv für den Refraktionsindex ist. Somit lassen sich die wichtigsten Lymphozytengruppen, wie Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten unterscheiden. Im „dotplot“ werden zunächst die Leukozytensubpopulationen Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten differenziert. Die Monozyten als die zu untersuchenden Zellen lassen sich hierbei durch das Setzen von sog. Fenstern („gates“) von den übrigen Populationen sowie von den Zelltrümmern abgrenzen.

Der nächste Schritt besteht im „Anfärben“ der Monozytensubpopulation mit den gesuchten Oberflächenantigenen. Hierbei bieten sich monoklonale Antikörper an, die mit einem

Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Mit fluoreszierenden Antikörpern markierte Zellen wurden über ein Ansaugsystem oder mit Überdruck in eine Messkammer geleitet, in der sich die Suspension mit einer laminar fließenden Trägerflüssigkeit vereinigt. Dabei muss sich der Probenstrom auf das Zentrum der Messküvette verengen, wodurch dieser eine Beschleunigung um das Hundertfache der Grundgeschwindigkeit erfährt. Dieser, als hydrodynamische Fokussierung bezeichnete Vorgang garantiert, dass jede Zelle der Probe zuverlässig vom fokussierten Laser getroffen wird.

Für die Fluoreszenz wird überwiegend der luftgekühlte Argonionenlaser mit einer Emissionslinie von 488 nm verwendet. Damit können Fluoreszein- (FITC), R-Phytoerythrin- (PE) und Peridin-Chlorophyll-a-Protein-(PerPC) markierte Zellen erfasst werden. FITC emittiert bei 525 nm, PE bei 578 nm und Per-PC bei 680 nm. Bei der Zweifarbenfluoreszenz kann auf unterschiedliche Farbstoffe verzichtet werden, wenn der gewählte Fluoreszenzstoff einen unterschiedlichen Abstand zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge aufweist. Dieser Abstand wird „Stokes'scher shift“ genannt. Alle oben erwähnten Stoffe weisen diese Fähigkeit bei 488 nm auf und sind damit für die Mehrfarbenfluoreszenzmessung geeignet. Für die Erfassung CD14+/CD16+-Zellen muss auf dieses System zurückgegriffen werden, wobei sich ein Reagenzgemisch aus anti-CD14(FITC) und anti-CD16(FITC)-Antikörpern anbietet.

Sowohl die Fluoreszenz-, als auch die Streusignale werden von Photoverstärkern aufgenommen und elektronisch verstärkt. Bei der Einfarbenfluoreszenzmessung bietet sich die Messdatendarstellung in Form einer Histogrammverteilung an. Bei der Zweifarben-Fluoreszenz wird eine Zweiparameter-Punkthistogrammdarstellung (dot plot) mit FSC als x-Achse und SSC als y-Achse gewählt (Lysis II, Becton Dickinson).

### Immunphäenotypisierung von Monozyten CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> Antigen+ Subpopulation (FACScan)

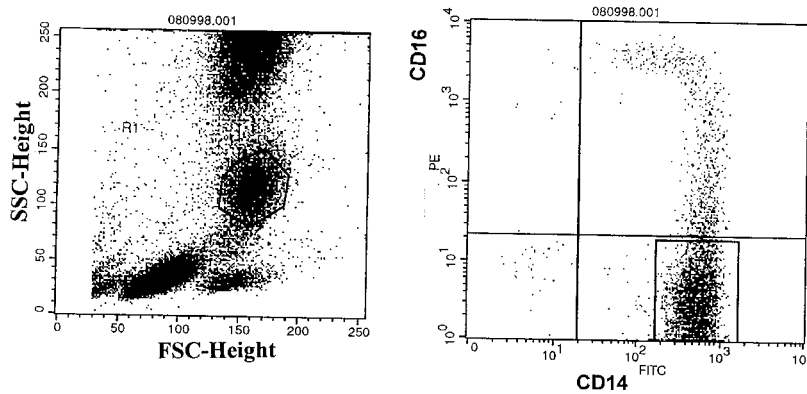


Abbildung 15:

Im linken Bild zeigt die selektierte Wolke R1 die Monozytenpopulation dar. Im "gate" befinden sich die Monozyten. In der rechten Abbildung ist auf der Abszisse die CD14 Expression, auf der Ordinate die CD16 Expression aufgetragen. Das "gate" rechts unten zeigt die "klassischen" Monozyten, die CD14<sup>high</sup> CD16<sup>low</sup>-Zellen.

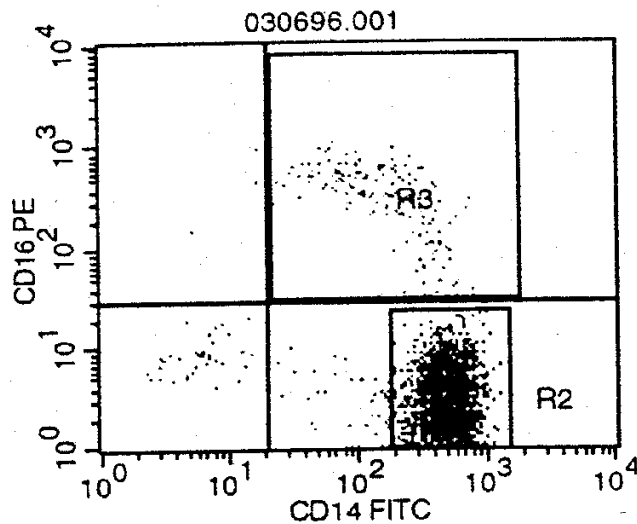


Abbildung 16:

Darstellung der selektierten Monozytenpopulation. Auf der Abszisse ist die CD14 Expression aufgetragen, auf der Ordinate die CD16 Expression. In R2 sind die Monozyten mit alleiniger CD14 Expression erfasst, R3 erfasst die Monozytensubpopulation mit CD14<sup>low</sup> CD16<sup>high</sup>-Koexpression.

### 9.3 Isolierung und Markierung der Zellen

Das Blut wurde in EDTA-Monovetten abgenommen und innerhalb einer halben Stunde verarbeitet.

Für jeden Ansatz wurden 100  $\mu$ l Vollblut mit jeweils 20  $\mu$ l des entsprechenden monoklonalen Antikörpers in einem Zentrifugenröhrchen versetzt und nach kurzem Aufschütteln für 15 Minuten unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Lysepuffer (1:10) zugegeben und das Gemisch weitere 10 Minuten inkubiert. Dieses muss, um das Plasma verwerfen zu können, bei 300 g, für 5 Minuten zentrifugiert (1000/min) werden. Zu dieser Probe gibt man 2 ml PBS-Waschpuffer (Cellwash), zentrifugiert weitere fünf Minuten und kann danach den Überstand aus lysierten Erythrozyten verwerfen. Diese Probe enthält nunmehr die separierten Leukozyten, die mit 500  $\mu$ l Fixierlösung (Cellfix) versetzt werden und nach kurzem Aufschütteln abschließend für 10 Minuten im Kühlschrank (4-8°C) inkubiert werden müssen. Diese fixierten Zellen wurden innerhalb von 12 Stunden im Durchflusszytometer gemessen und mit Hilfe der Lysis II-Software analysiert.

In jeder hergestellten Probe waren insgesamt 50000 zu erfassende Zellen. Dies entspricht durchschnittlich 3216 Monozyten pro Ansatz.

#### 9.4 Statistische Methoden

Die statistischen Berechnungen erfolgten über das Softwareprogramm „SPSS Version 10.0“. Zur Anwendung kamen ausschließlich nicht-parametrische Tests. Unterschiede zwischen Patienten und Gesunden wurden über den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test berechnet. Die Ergebnisse der Verlaufsparemeter während einer Sepsis wurden mit den Paar-Differenz-Test berechnet.

Als Signifikanzgrenze wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

## 10 Patienten

Alle untersuchten Probanden nahmen freiwillig an unserer Studie teil. Die Ethikkommission stimmte der Durchführung unserer Studie zu. (Bayerische Ärztekammer – München).

### 10.1 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv bestand aus 18 klinisch gesunden freiwilligen Probanden im Alter zwischen 24 und 54 Jahren. Der Mittelwert betrug 33,42 +/- 9,91 Jahre, der Median lag bei 31 Jahren (Altersbereich 24 bis 54 Jahre). In der Gruppe befinden sich 10 weibliche und 8 männliche Probanden. Hinsichtlich der monozytären Membranproteinexpression ließen sich die prozentualen CD14/16 Werte anderer Forschergruppen von 7,3 +/- 3,1% bestätigen [Tanaka 1999].

### 10.2 Patienten mit chronischem Nierenversagen

Bei den untersuchten Patienten handelt es sich um 13 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Alle Patienten nahmen freiwillig an unserer Untersuchung teil. In allen Fällen lag die mündliche Zustimmung der Patienten vor.



<i>Patient</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Alter</i>	<i>Grundkrankheit</i>
1	Männlich	70	Diabetische Nephropathie COPD Diabetes mellitus Typ II b
2	Männlich	65	Nephrosklerose Endokarditis lenta Beidseitige Nierenarterienstenose
3	Männlich	72	Nephrosklerose bei art. Hypertonus Hypothyreose
4	Männlich	63	Nephrosklerose bei art. Hypertonus
5	Männlich	74	Nephrosklerose bei art. Hypertonus
6	Männlich	60	Nephrosklerose bei art. Hypertonus
Tappen	Männlich	?	Interstitielle Nephritis
8	Männlich	62	Nephrosklerose bei art. Hypertonus Lungenemphysem und COLD bei Nikotinabusus
9	Männlich	65	Chronische Glomerulonephritis Art. Hypertonie Myokardinfarkt
10	Männlich	68	Einzelniere
11	Männlich	72	Allergische interstitielle Nephritis Atopie mit Eosinophilie
12	Männlich	61	Diabetische Nephropathie bei Diabetes mellitus Typ II b
13	Weiblich	64	Nephrosklerose bei art. Hypertonus

*Tabelle: Grundkrankheiten der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Endstadium.*

### 10.3 Patienten nach Nierentransplantation (ntx-Patienten)

Bei den im Rahmen der Studie untersuchten Patienten handelt es sich um 69 Patienten (23 weibliche, 46 männliche) im Alter von durchschnittlich 52,63 +/- 11,42 Jahren. Der Median liegt bei 53,84 Jahren (Altersbereich 29 bis 75 Jahre). Die untersuchten Patienten erhielten durchschnittlich vor 6,38 +/- 5,2 Jahren ein Nieren-Transplantat (Median bei 8,16 Jahren).

### 10.3.1 Ntx-Patienten mit Mycophenolat (MMF) –Monotherapie

Bei den im Rahmen der Studie untersuchten Patienten, die mit Mycophenolat Mofetil Monotherapie eingestellt sind, handelt es sich um 16 Personen (3 weiblich, 13 männlich) im Alter von durchschnittlich 51,29 +/- 10,47 Jahren. Der Median lag bei 51,15 Jahren (Altersbereich 31 bis 65 Jahre). Die Patienten wurden durchschnittlich vor 8,07 +/- 5,8 Jahren nierentransplantiert. Der Median liegt bei 8,17 Jahren.

### 10.3.2 Ntx-Patienten mit Cyclosporin A (CyA) – Monotherapie

Bei den Patienten mit alleiniger Cyclosporin A Therapie handelt es sich um 11 Personen (3 weiblich, 8 männlich) im Durchschnittsalter von 58,43 +/- 8,01 Jahren. Der Median lag bei 59,96 Jahren (Altersbereich 42 bis 68 Jahre). Die untersuchten Patienten wurden durchschnittlich vor 10,2 +/- 4,3 Jahren transplantiert (Median 11,04Jahre).

### 10.3.3 Ntx-Patienten mit MMF-CyA-Kombinationstherapie

Bei den untersuchten Patienten handelt es sich um 18 Patienten (3 weiblich, 15 männlich) im Alter von 46,69 +/- 10,22 Jahren. Der Median lag bei 47,44 Jahren (Altersbereich von 30 bis 67 Jahre). Die Personen erhielten durchschnittlich vor 6,7 +/- 5,4 Jahren ihr Spenderorgan (Median 6,05 Jahre).

### 10.3.4 Verlauf während einer Sepsis

Bei den untersuchten Patienten handelt es sich um 8 Patienten (6 weiblich, 2 männlich) im Alter von 74,6 Jahren  $\pm$  10,53 Jahren. Der Median lag bei 78 Jahren.

<i>Patient</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Alter [Jahre]</i>	<i>Grundkrankheit</i>
1	Männlich	61	Pneumonie
2	Weiblich	82	Harnwegsinfektion
3	Weiblich	84	Erysipel
4	Weiblich	85	Harnwegsinfektion
5	Weiblich	65	Pneumonie
6	Weiblich	74	Endokarditis
7	Männlich	62	Enteritis
8	Weiblich	84	Harnwegsinfektion

Tabelle: Grundkrankheiten der Patienten mit einer Sepsis.

#### Literatur:

- Tanaka M; Honda J; Imamura Y; Shiraishi K; Tanaka K; Oizumi K; Surface phenotype analysis of CD16<sup>+</sup> monocytes from leukapheresis collections for peripheral blood progenitors. Clin Exp Immunol 1999 Apr;116(1):57-61

## 11 Ergebnisse

### 11.1 Kreatinin

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Median
Gesunde	0,94	1,22	1,06	0,11	1,05
Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz	2,17	8,19	4,36	2,07	3,53
ntx- Patienten	0,41	3,83	1,66	0,69	1,44
MMF-mono	1,15	4,23	2,05	1,01	1,64
Cy A-mono	1,03	3,48	1,87	0,87	1,54
Cy A und MMF	0,79	3,81	1,95	0,84	1,62

*Tabelle: Gegenüberstellung der **Serum-Kreatinin-Konzentrationen**: Durchschnittlich die höchsten Serum-Kreatininkonzentrationen hatten die Patienten mit chronischem Nierenversagen, gefolgt von nierentransplantierten Patienten mit MMF-Monotherapie, Patienten mit CyA-MMF-Kombitherapie, Patienten mit CyA-Monotherapie und Gesunden.*

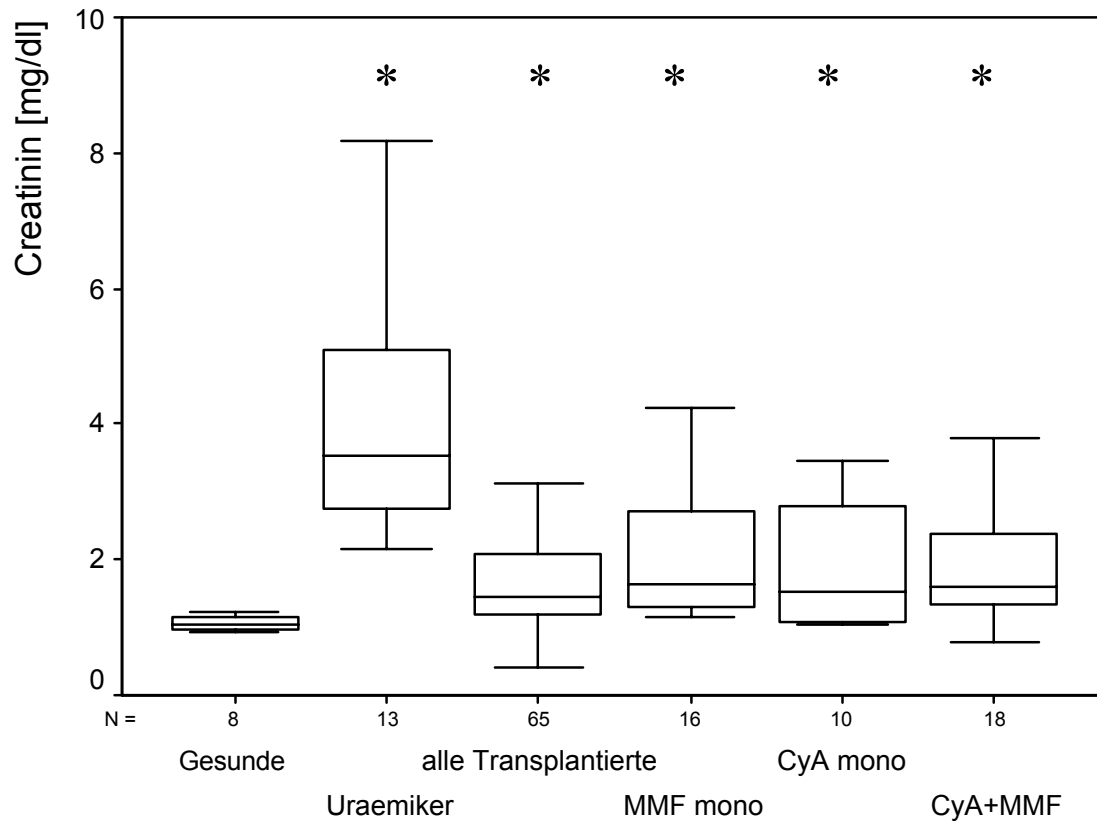


Abbildung 17

**Konzentration des Kreatinins:** Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zeigten signifikant höhere Kreatinin-Konzentrationen gegenüber Gesunden ( $p < 0,0000098$ ). Patienten nach Nierentransplantation hatten ebenfalls signifikant höhere Kreatinin-Konzentrationen als Gesunde ( $p < 0,0000027$ ). MMF-monotherapierte Patienten hatten signifikant höhere Kreatinin-Konzentrationen als Gesunde ( $p < 0,000033$ ). CyA-Monotherapierte Patienten hatten signifikant höhere Kreatinin-Konzentrationen ( $p < 0,006$ ). Auch bei den kombinationstherapierten Patienten war das Kreatinin signifikant erhöht gegenüber Gesunden ( $p < 0,00017$ ). (nach Mann-Whitney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

## 11.2 Leukozyten

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Median
Gesunde	3500	7600	6013	1419	6100
Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz	5570	11130	7386	2067	7560
ntx- Patienten	2467	11987	6979	2180	6513
MMF-mono	4207	14464	7023	2817	6538
Cy A-mono	5300	8720	6922	1139	6745
Cy A und MMF	3115	9225	6225	1483	6195

*Tabelle: Gegenüberstellung der Leukozyten/ $\mu$ l im peripheren Blut. In allen Kollektiven lagen Mittelwert und Median im Normbereich (4000-10000/ $\mu$ l). Über die Norm lagen die maximal gemessenen Leukozytenzahlen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, bei Patienten nach Nierentransplantation und bei MMF-monotherapierten Patienten. Bei Gesunden, bei ntx-Patienten und bei CyA-MMF-kombitherapierten Patienten lagen die minimalen Leukozytenzahlen unterhalb 4000/ $\mu$ l.*

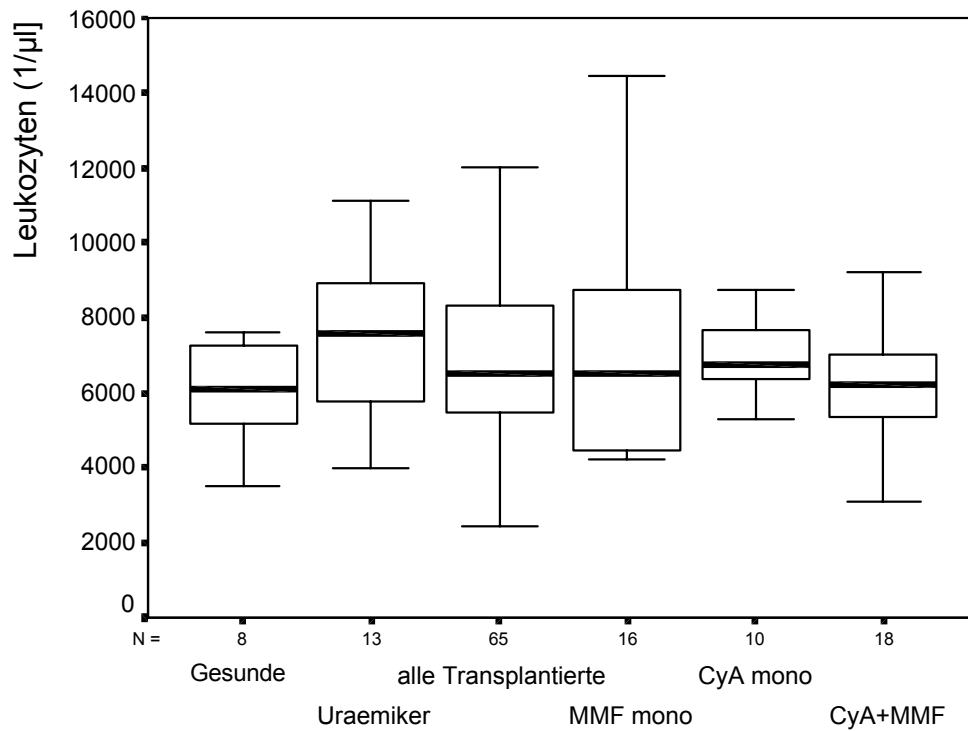


Abbildung 18

**Anzahl der Leukozyten in Blutbild:** Die Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz hatten den höchsten Median der Leukozyten. Dennoch unterschied sich diese Gruppe nicht signifikant von Gesunden ( $p < 0,185$ ). Patienten nach Nierentransplantation hatten einen höheren Median und eine größere Standardabweichung gegenüber Gesunden, es konnten aber auch hier keine signifikanten Unterschiede errechnet werden ( $p < 0,274$ ). (nach Mann-Whitney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

## 11.3 C-reaktives Protein

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Median
Gesunde*	0,30	0,33	0,326	0,01	0,33
Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz*	0,1	2,8	0,95	0,76	0,7
ntx- Patienten	0,07	4,15	0,56	0,66	0,43
MMF-mono	0,13	2,56	0,55	0,60	0,39
Cy A-mono	0,1	1,00	0,56	0,29	0,45
Cy A und MMF	0,13	1,9	0,55	0,40	0,52

*Tabelle: Die Konzentrationen des C-reaktiven Proteins (CRP): Von erhöhten CRP-Konzentrationen wird ab 0,5 mg/dl gesprochen (zum Teil auch erst ab 1 mg/dl). Der Mittelwert des CRP war bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, bei Patienten nach Nierentransplantation, bei MMF-mono-, CyA-mono- und den MMF-CyA-Kombitherapierten Patienten über 0,5 mg/dl. Der Median war nur bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und bei kombitherapierten Patienten erhöht.*

*\*Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz haben gegenüber Gesunden signifikant erhöhte CRP-Konzentrationen. (Mann-Whittney)*



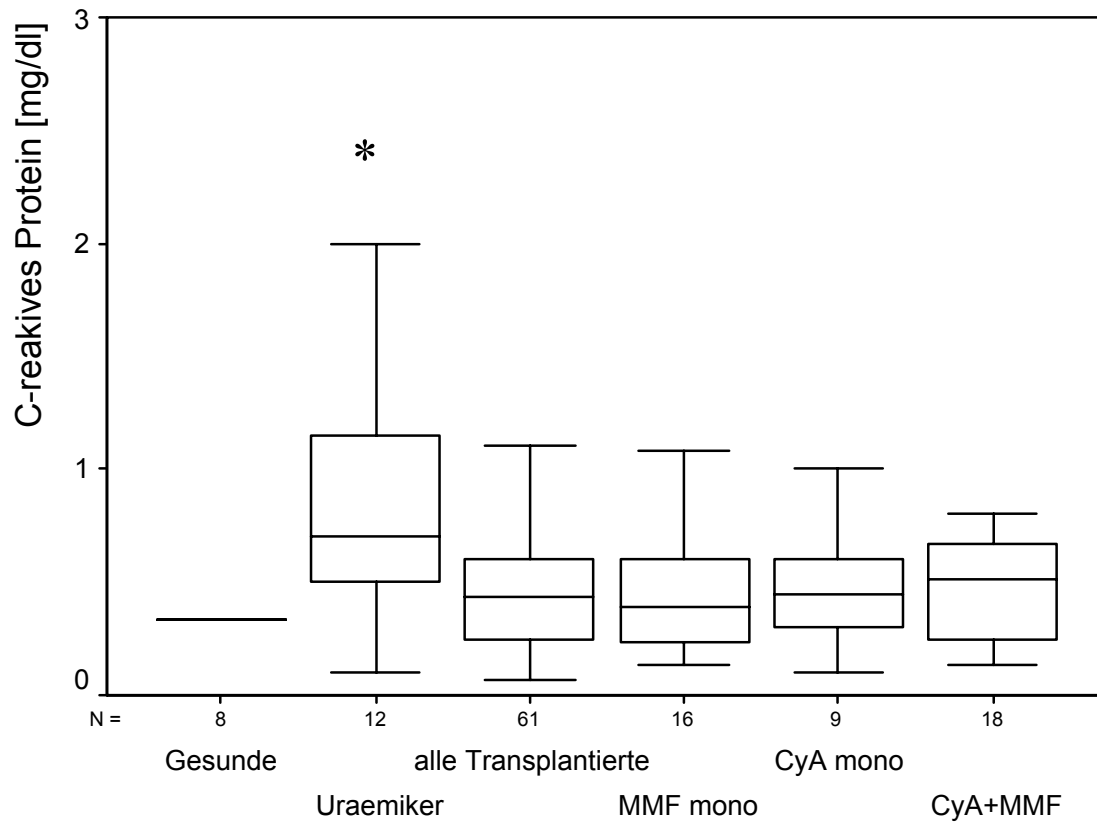


Abbildung 19

Die **Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP)**: Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz haben signifikant höhere CRP-Spiegel als Gesunde ( $p=0,010$ ). Patienten nach Nierentransplantation haben tendenziell höhere CRP-Konzentrationen, diese Erhöhung ist gegenüber Gesunden aber nicht signifikant. (nach Mann-Whittney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

## 11.4 mCD14-Expression

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Median
Gesunde	368	604	496	79	517
Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz	318	559	433	75	426
ntx- Patienten	294	644	446	94	433
MMF-mono	358	537	416	41	404
Cy A-mono	338	516	436	59	446
Cy A und MMF	350	549	425	49	425

**Tabelle: Gegenüberstellung der mCD14-Expression [in MFI]:** Den höchsten Median hatten die gesunden Probanden, gefolgt von Patienten nach Nierentransplantation und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Endstadium. Bei den unterschiedlichen Immunsuppressionschemata hatten die Patienten mit CyA-Monotherapie die höchsten Expressionen, gefolgt von Patienten mit CyA-MMF-Kombitherapie und Patienten mit MMF-Monotherapie.

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz haben eine Expression von CD14+ Monozyten zwischen 317,5 und 559,0 MFI (MW 433 MFI; SD 75,3MFI). Der Median lag bei 426 MFI. Bei den nierentransplantierten Patienten schwankten die Werte zwischen 40,6 und 644,0 MFI (MW 446,4 MFI; SD 94,3 MFI). Der Median lag bei 437,0 MFI. In der Kontrollgruppe wurden Werte zwischen 368 – 604 MFI gemessen (MW 496,3 MFI; SD 79,1MFI). Der Median lag bei 516,5 MFI.

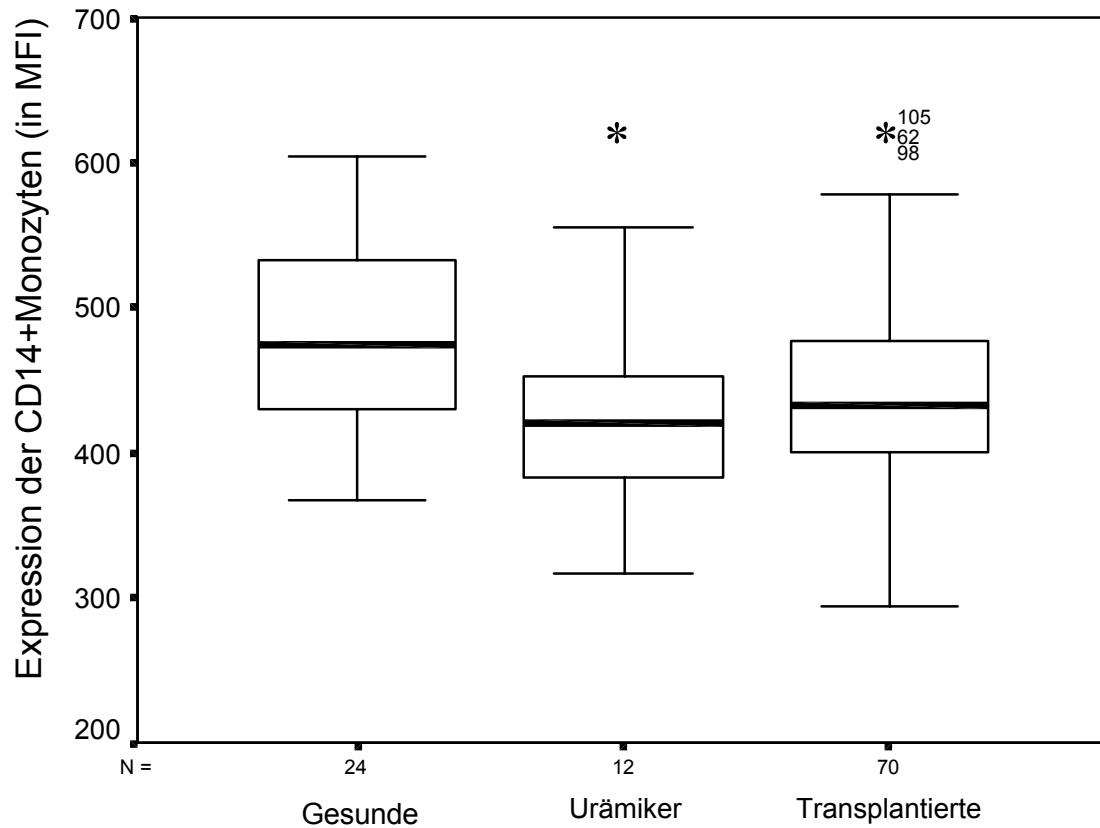


Abbildung 20

**Die mCD14-Expression der Monozyten:** Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz hatten gegenüber Gesunden eine signifikant verminderte CD14-Expression ( $p < 0,024$ ). Patienten nach einer Nierentransplantation hatten, verglichen mit Gesunden, eine signifikant herabgesetzte CD14-Expression ( $p < 0,026$ ). (nach Mann-Whitney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

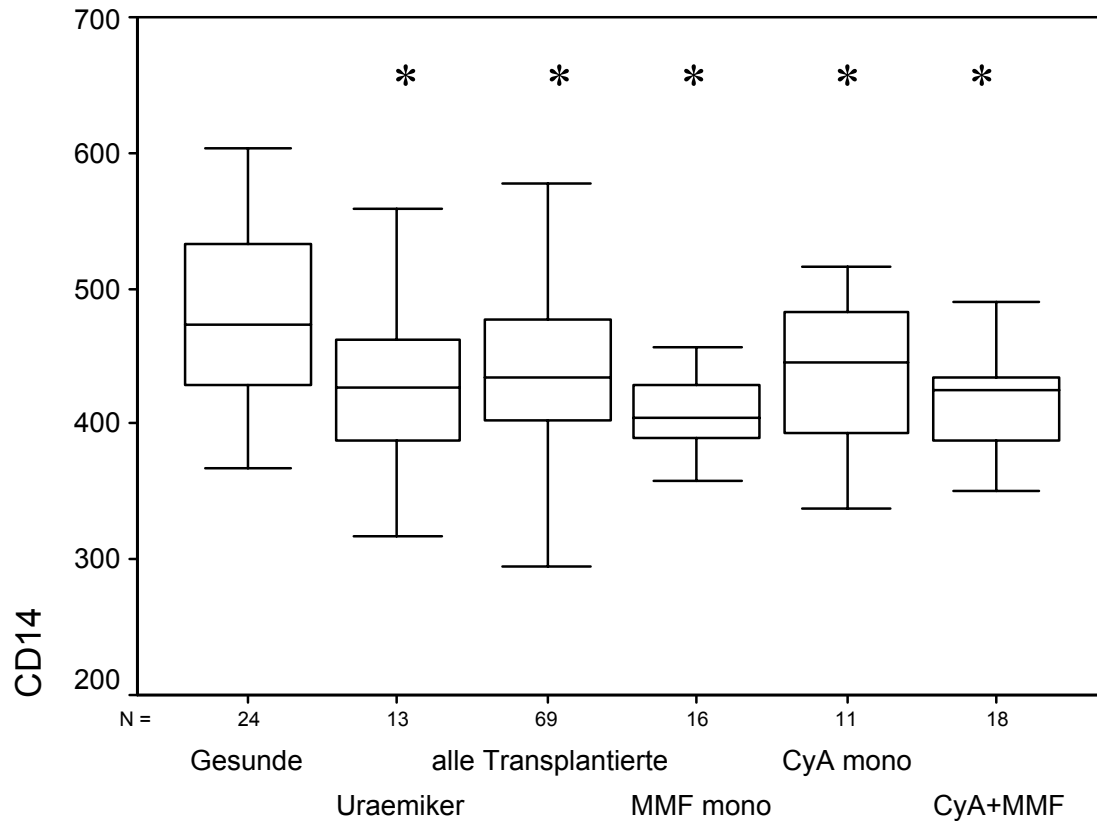


Abbildung 21:

**mCD14-Expression der Monozyten:** hier mit Berücksichtigung der verschiedenen immunsuppressiven Therapieschemata: Patienten, die mit MMF-monotherapiert wurden, hatten die niedrigste mCD14-Expression. Gegenüber Gesunden waren diese signifikant erniedrigt ( $p < 0,003$ ). Patienten, die mit CyA-monotherapiert wurden, hatten ebenfalls niedrigere Expressionen als Gesunde ( $p < 0,050$ ). Patienten, die immunsuppressiv mit MMF und CyA kombitherapiert wurden, hatten gegenüber Gesunden signifikant niedrigere Expressionen ( $p < 0,009$ ). (nach Mann-Whitney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

11.5 CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Median
Gesunde	2,5	9,5	6,88	1,76	7,35
Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz	8,50	25,80	14,90	4,95	13,00
ntx- Patienten	1,10	21,50	9,78	4,89	9,30
MMF-mono	6,80	31,63	14,42	6,90	13,48
Cy A-mono	7,50	19,55	12,43	3,79	11,60
Cy A und MMF	4,60	31,55	13,69	6,25	13,01

*Tabelle: Gegenüberstellung des **Anteils der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten** [in %]: Den höchsten Median hatten die Patienten mit MMF-Monotherapie, gefolgt von den Patienten mit CyA-MMF-Kombithherapie, von den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und von den Patienten mit CyA-Monotherapie. Der Median aller nierentransplantierten Patienten liegt deutlich über dem der Gesunden.*

Gesunde haben einen Anteil von CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten zwischen 2,5 und 9,5% (MW 6,88%, SD 1,76%, Median 7,35%).

Chronisch niereninsuffiziente Patienten haben zwischen 8,5 und 25,8 % CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten ( MW 14,89%, SD 4,95%, Median 13,00%).

Bei nierentransplantierten Patienten lag der Anteil der CD14/16-positiven Monozyten zwischen 1,1 und 21,5% ( MW 9,78%, SD 4,89%, Median 9,30%).

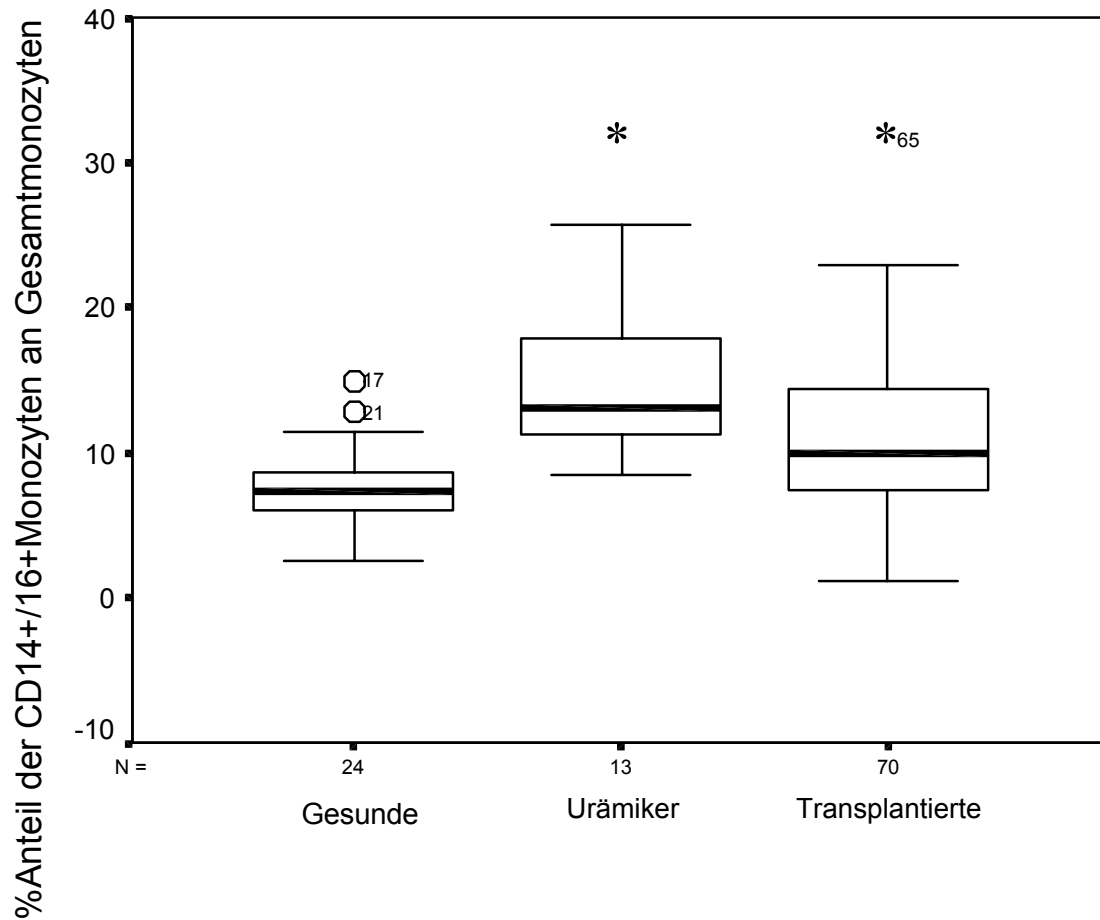


Abbildung 22

Der prozentuale **Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten** war bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz signifikant höher als bei Gesunden ( $p < 0,00000487$ ). Patienten nach Nierentransplantation haben einen signifikant höheren Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten als Gesunde ( $p < 0,00298$ ). (nach Mann-Whittney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

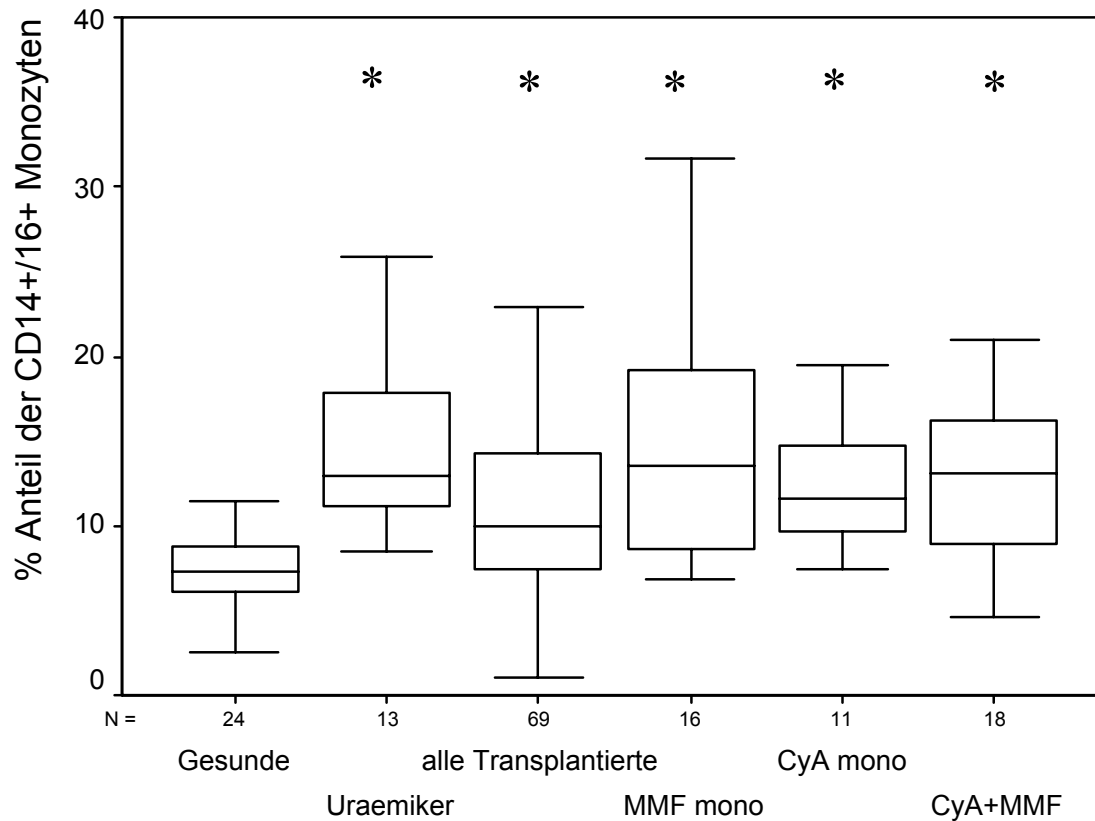


Abbildung 23:

Der prozentuale **Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten**: hier mit Berücksichtigung der verschiedenen immunsuppressiven Therapieschemata: Patienten, die mit MMF-monotherapiert wurden, hatten den höchsten %-Anteil an CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten. Gegenüber Gesunden waren diese signifikant erhöht ( $p < 0,000229$ ). Patienten, die mit CyA-monotherapiert wurden, hatten ebenfalls signifikant höhere %-Anteile an CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten ( $p < 0,000384$ ) als Gesunde. Patienten, die immunsuppressiv mit MMF und CyA therapiert wurden, hatten gegenüber Gesunden signifikant erhöhte %-Anteile an CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten ( $p < 0,000144$ ). (nach Mann-Whitney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

## 11.6 Gegenüberstellung der einzelnen Immunsuppressionstherapien

## 11.6.1 MMF-Monotherapie

- *Leukozyten unter MMF-Monotherapie*

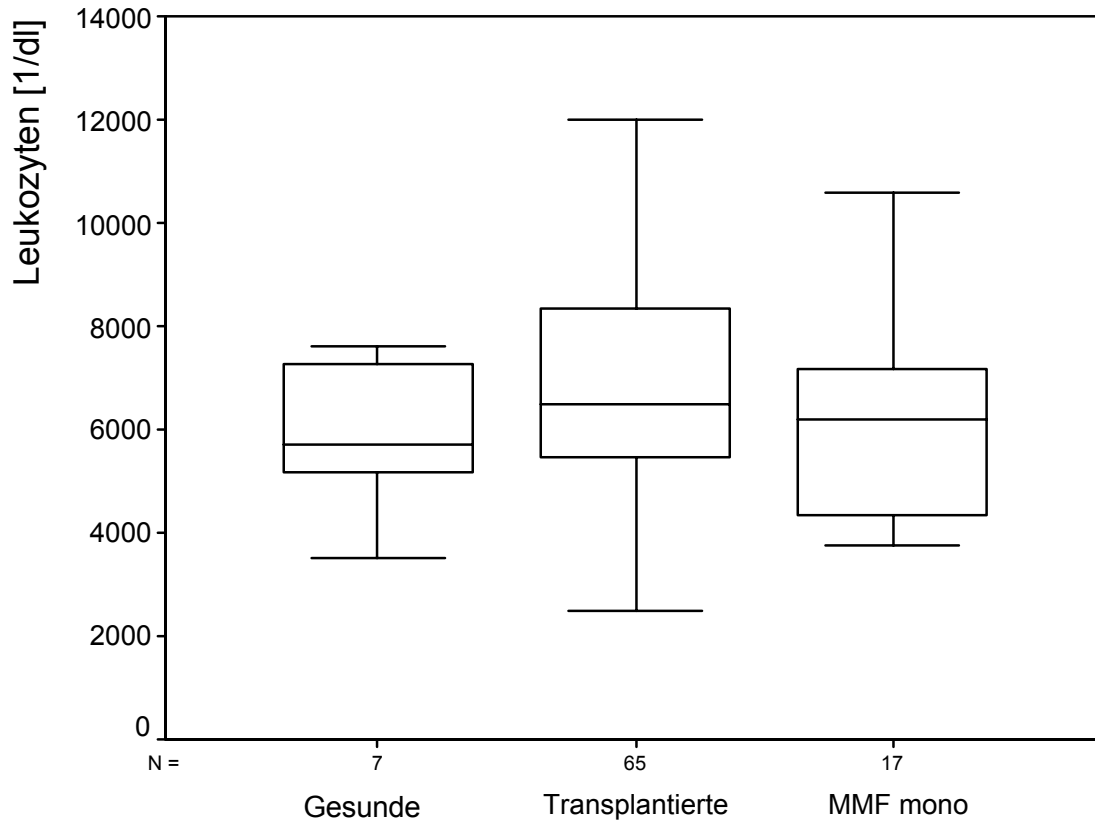


Abbildung 24:

Die **Anzahl der Leukozyten** ( $1/\mu\text{l}$ ) im peripheren Blut. Die nierentransplantierten Patienten hatten durchschnittlich höhere Leukozytenanzahlen als Gesunde ( $p < 0,283$ ). Auffällig waren die hohe Standardabweichung und die große Spannweite der Minima und Maxima. Bei MMF-monotherapierten Patienten lag der Median höher als bei Gesunden ( $p < 0,1$ ) und niedriger als bei den nierentransplantierten Patienten mit anderen Immunsuppressions-Schemata ( $p < 0,309$ ). (nach Mann-Whitney)



- *C-reaktives Protein unter MMF-Monotherapie*

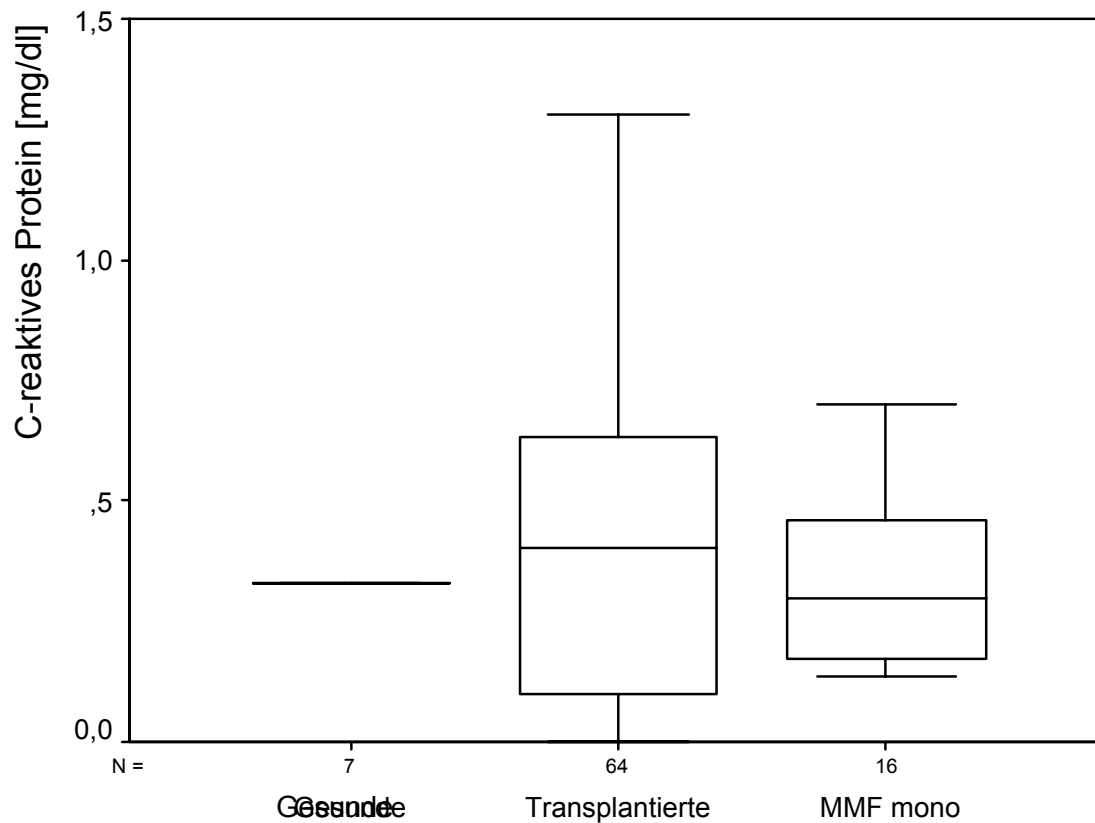


Abbildung 25:

Das **C-reaktive Protein** im peripheren Blut: Im Mittelwert lag das CRP bei Gesunden bei 0,3257 mg/dl. Bei nierentransplantierten Patienten, die nicht mit Mycophenolat Mofetil monotherapiert wurden, war der Mittelwert auf 0,52 mg/dl erhöht. Damit ist das CRP zwar gering erhöht, aber nicht signifikant höher ( $p < 0,757$ ). Das C-reaktive Protein der MMF monotherapierten Patienten lag im Mittel bei 0,34 mg/dl. Damit lag die CRP-Konzentration vergleichbar hoch, wie die der Gesunden ( $p < 0,72$ ) und leicht niedriger als die der nierentransplantierten Patienten mit einem anderen immunsuppressiven Therapieschema ( $p < 0,695$ ).

- *Expression des mCD14 unter MMF-Monotherapie*

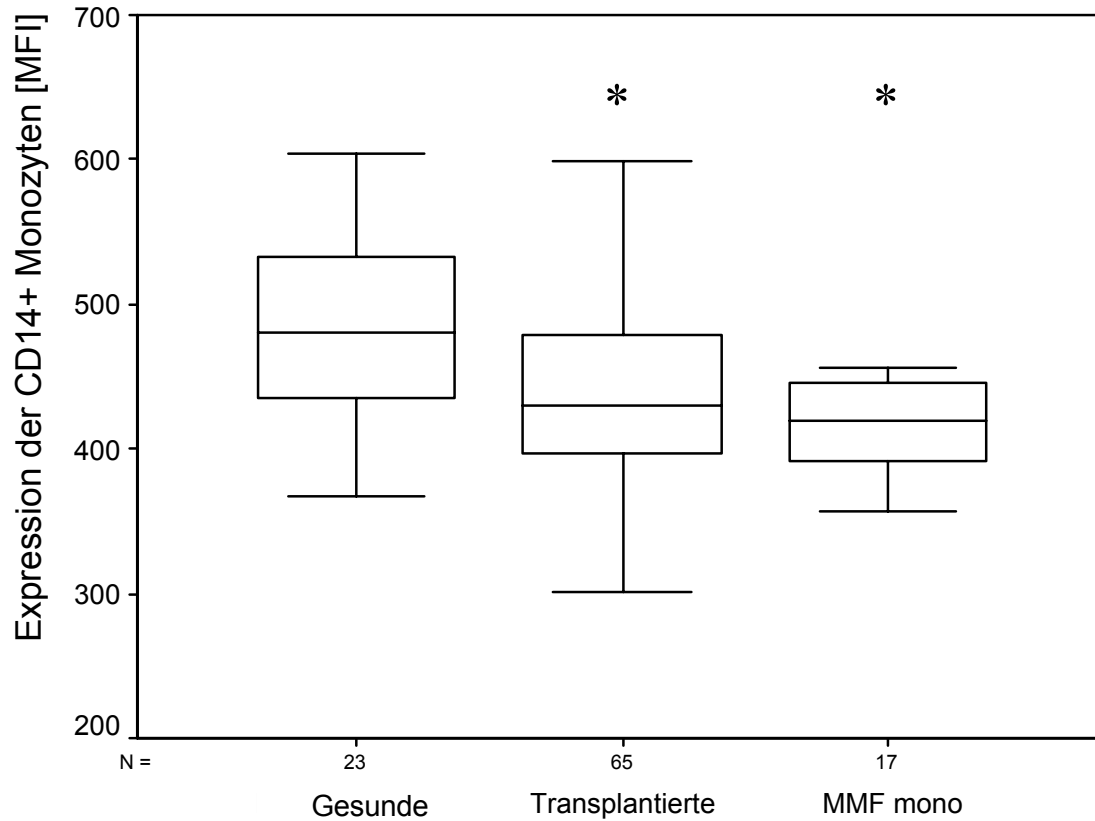


Abbildung 26

Die **Expression der mCD14-Monozyten** war bei den Gesunden signifikant höher als bei den nierentransplantierten Patienten ( $p < 0,008$ ). Bei MMF-monotherapierten Patienten waren die CD14-Expressionen gegenüber Gesunden signifikant erniedrigt ( $p < 0,001$ ). Verglich man die Gruppe der MMF-monotherapierten Patienten mit ntx-Patienten, die immunsuppressiv nach einem anderem Schema behandelt wurden, so fiel die geringere Standardabweichung auf. Die Expression war aber nicht signifikant niedriger ( $p < 0,357$ ). (nach Mann-Whitney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

- %-Anteil der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten unter MMF-Monotherapie

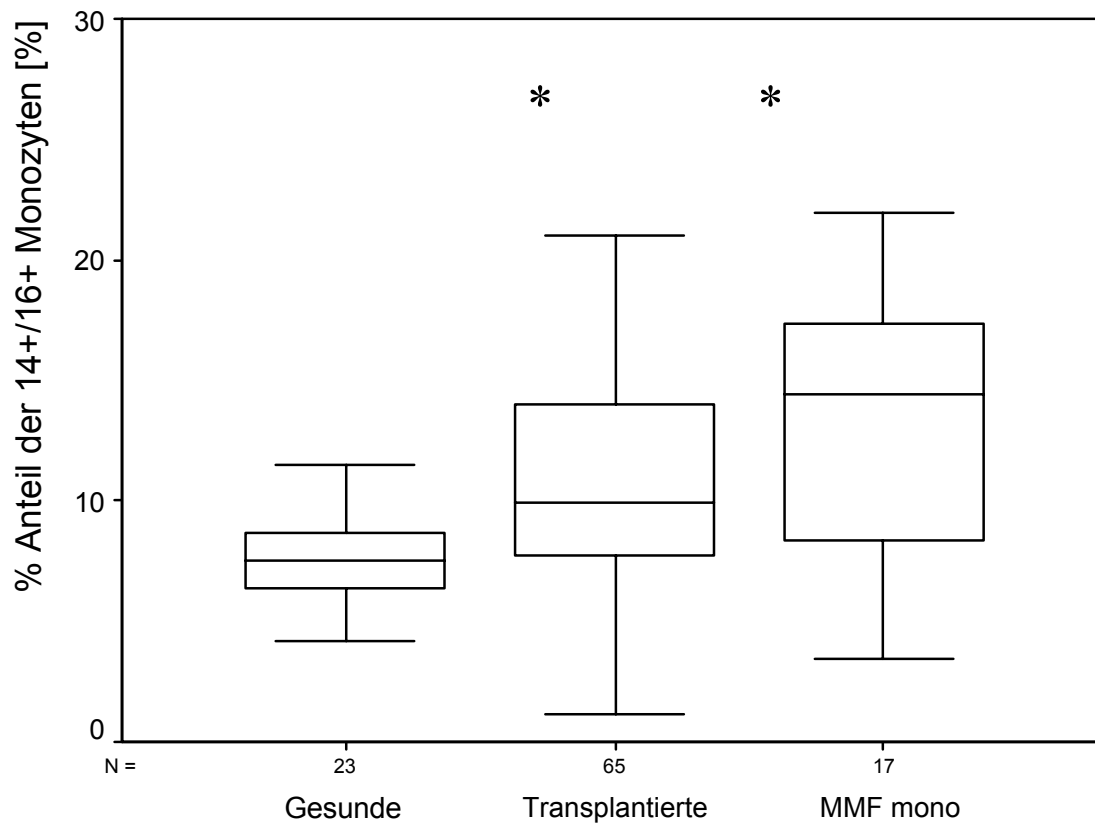


Abbildung 27:

Der prozentuale **Anteil der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten** bei MMF-monotherapierten Patienten nach Nierentransplantation: Diese Patienten hatten gegenüber Gesunden signifikant erhöhte %-Anteile an  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten ( $p < 0,004$ ). Unter MMF-Monotherapie lagen die %-Anteile an  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten über den der Gesunden ( $p < 0,0002$ ) und den der ntx-Patienten mit anderen immunsuppressiven Therapien ( $p < 0,145$ ). (nach Mann-Whitney)

## 11.6.2 Cyclosporin A Monotherapie

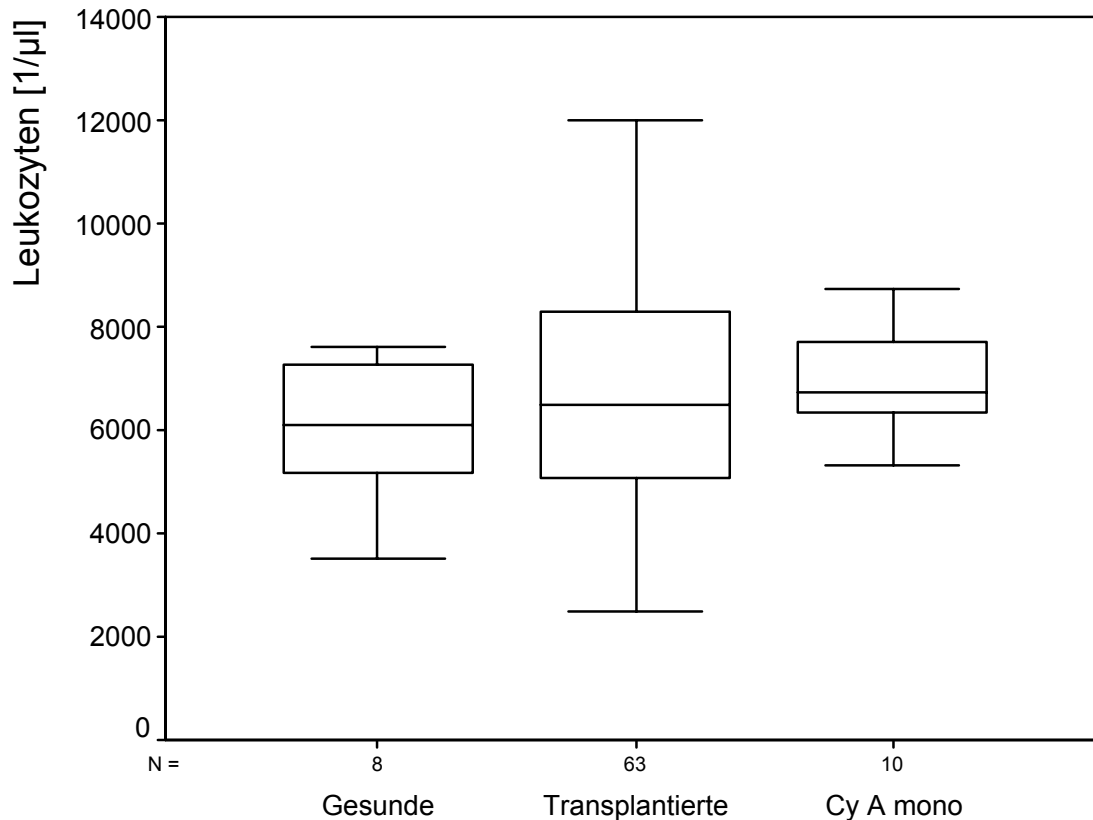
• *Leukozyten unter CyA-Monotherapie*

Abbildung 28:

die **Anzahl der Leukozyten**: Der Median der Leukozytenzahlen lag bei Gesunden im Normbereich. Bei den nierentransplantierten Patienten, die mit CyA-monotherapiert wurden, lag der Median ebenfalls im Normbereich und nur gering höher als der der Gesunden ( $p < 0,315$ ). Diese Patientengruppe hatte einen leicht höheren Median der Leukozytenzahlen als die nierentransplantierten Patienten, die immunsuppressiv nicht mit CyA-monotherapiert wurden ( $p < 0,647$ ). Die Leukozytenzahlen der ntx-Patienten, die nicht mit CyA-monotherapiert wurden, unterschieden sich nicht signifikant von denen der Gesunden ( $p < 0,478$ ). Die Gruppe der mit CyA-monotherapierten Patienten zeichnete sich durch eine kleine Standardabweichung und eine geringe Differenz des Minimums und Maximums aus. (nach Mann-Whitney)

- *C-reaktives Protein unter CyA-Monotherapie*

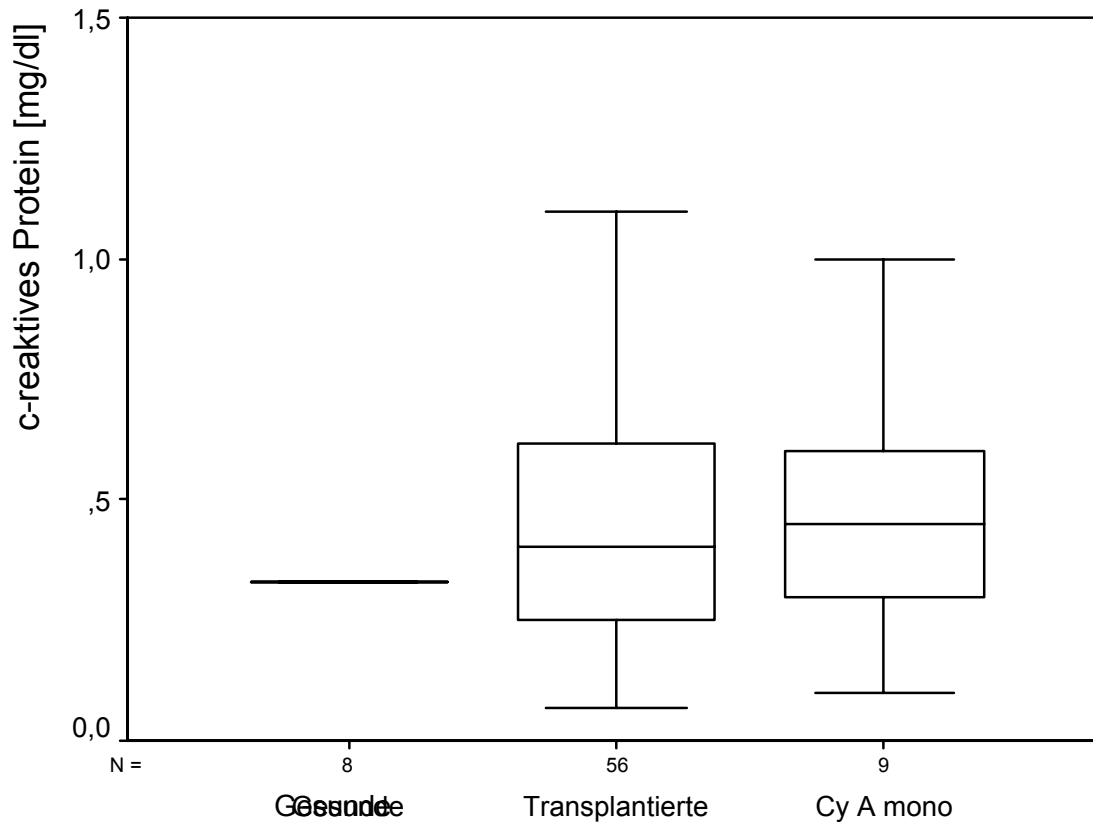


Abbildung 29:

**C-reaktives Protein (CRP):** Gesunde hatten CRP-Spiegel, die nicht höher als 0,33 mg/dl waren. Ntx-Patienten hatten nur gering höhere CRP-Spiegel als gesunde Probanden ( $p < 0,382$ ). Nierentransplantierte Patienten, die mit CyA-monotherapiert wurden, hatten nicht signifikant höher liegende CRP-Spiegel als Gesunde ( $p < 0,673$ ) und nicht signifikant höher liegende Spiegel als die nierentransplantierten Patienten, die nicht CyA-monotherapiert wurden ( $p < 0,902$ ). (nach Mann-Whitney)

- *mCD14-Expression unter CyA-Monotherapie*

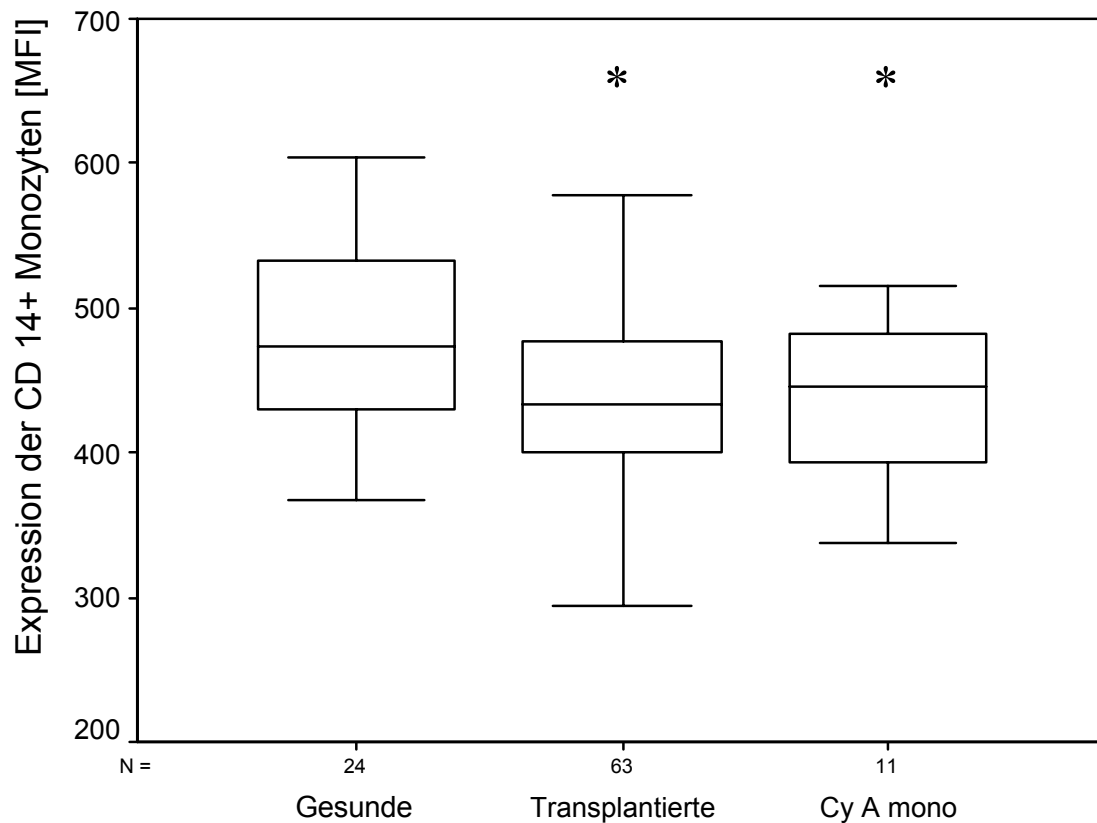


Abbildung 30

**mCD14-Expression:** Gesunde Probanden hatten signifikant höhere mCD14-Expressionen als nierentransplantierte Patienten ( $p < 0,010$ ). Ntx-Patienten, die CyA-monotherapiert wurden, hatten signifikant niedrigere mCD14-Expressionen als Gesunde ( $p < 0,05$ ). Diese Patienten hatten auch gering höhere mCD14-Expressionen als die nierentransplantierten Patienten, die nicht CyA-monotherapiert wurden ( $p < 0,952$ ). (nach Mann-Whitney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

- %-Anteil der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten unter Cy A Monotherapie

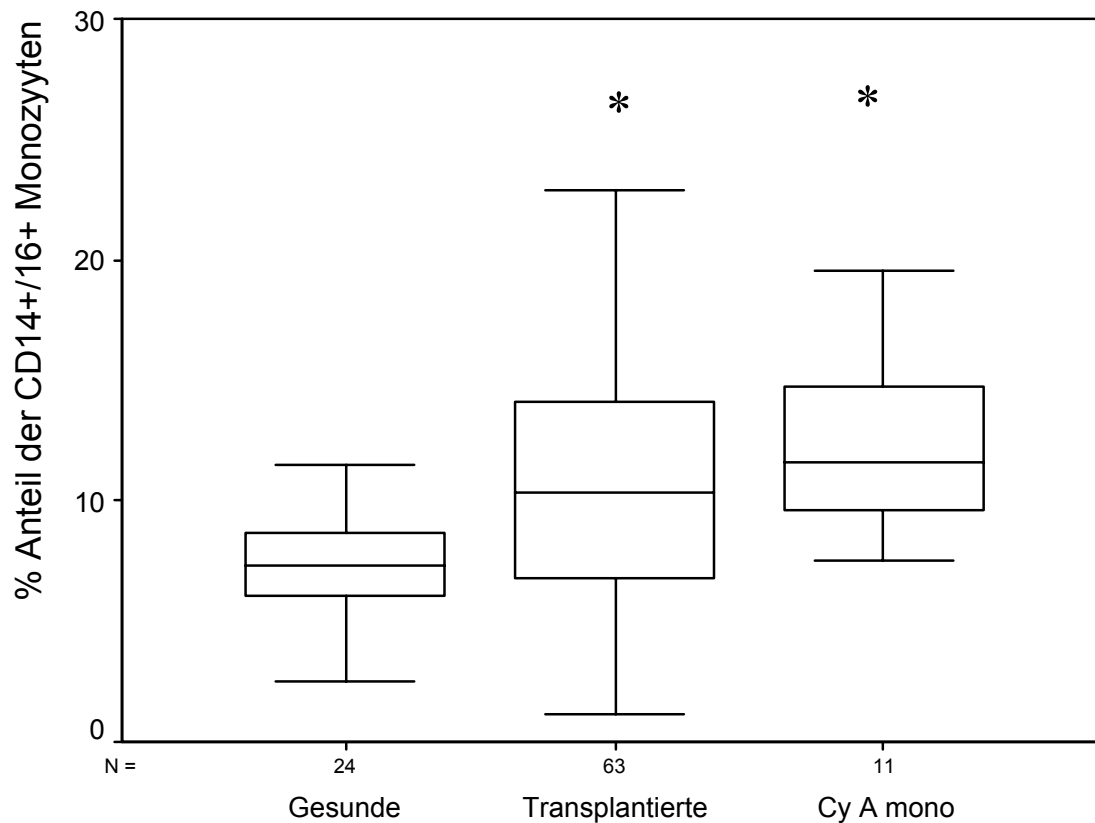


Abbildung 31

der Anteil der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten im peripheren Blut: Die geringsten %-Anteile der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten hatten gesunde Probanden. Die nierentransplantierten Patienten hatten signifikant höhere %-Anteile der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten als Gesunde ( $p < 0,004$ ). Nierentransplantierte Patienten, die CyA-monotherapiert wurden, hatten signifikant höhere %-Anteile gegenüber Gesunden ( $p < 0,00038$ ) und sie hatten gering höhere %-Anteile als die Patienten, die immunsuppressiv nicht mit CyA monotherapiert wurden ( $p < 0,287$ ). (nach Mann-Whitney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

### 11.6.3 Immunsuppression mit Cyclosporin A und Mycophenolat Mofetil-Kombitherapie

- *Leukozyten unter CyA-MMF- Kombinationstherapie*

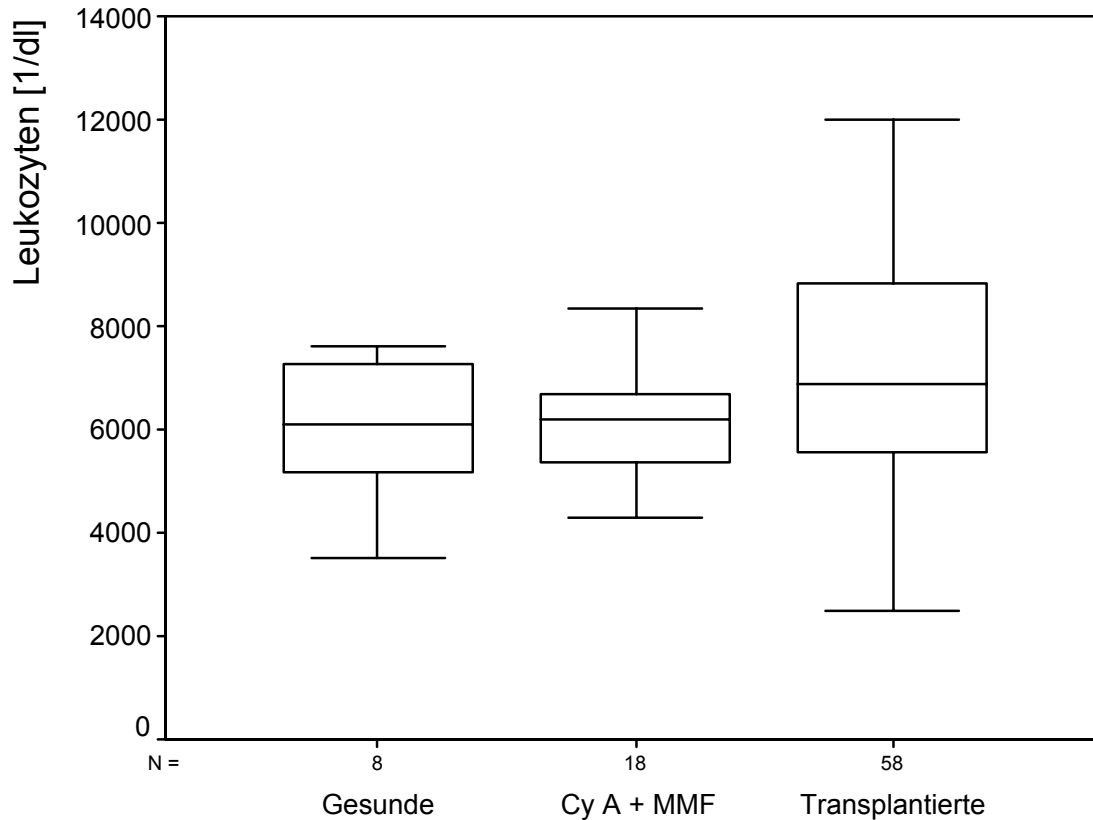


Abbildung 32

**Leukozyten im peripheren Blutbild:** Gesunde Probanden hatten die geringsten Leukozytenzahlen. Nierentransplantierte Patienten, die nicht mit CyA-MMF-kombithierapiert wurden, hatten nicht signifikant höhere Leukozytenzahlen als Gesunde ( $p < 0,202$ ). Transplantierte Patienten, die unter CyA-MMF-Kombithierapie standen, hatten nicht signifikant höhere Leukozytenzahlen als Gesunde ( $p < 0,892$ ) und nicht signifikant höhere Leukozytenzahlen als die nierentransplantierten Patienten, die nicht mit CyA-MMF kombithierapiert wurden ( $p < 0,229$ ). (nach Mann-Whitney)



- *C-reaktives Protein unter CyA-MMF- Kombinationstherapie*

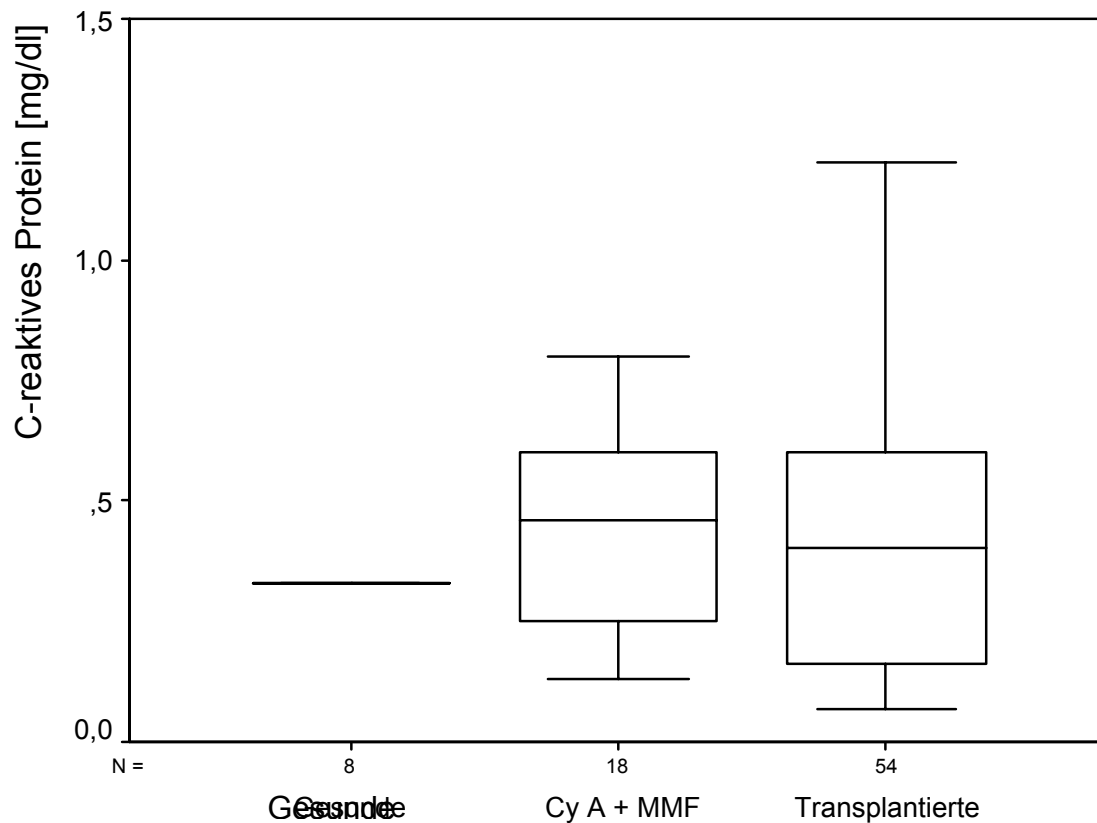


Abbildung 33

**C-reaktives Protein (CRP):** Die gesunden Probanden hatten die niedrigsten CRP-Spiegel. Nierentransplantierte Patienten, die nicht CyA-MMF-kombitherapiert wurden, hatten nicht signifikant höhere CRP-Spiegel als Gesunde ( $p < 0,577$ ). Nierentransplantierte Patienten, die mit CyA-MMF-kombitherapiert wurden, hatten nicht signifikant höhere CRP-Spiegel als Gesunde ( $p < 0,080$ ) und nicht signifikant höhere Spiegel als nierentransplantierte Patienten, die nicht CyA-MMF-Kombitherapiert wurden ( $p < 0,431$ ). (nach Mann-Whitney)

- *mCD 14-Expression unter CyA-MMF- Kombinationstherapie*

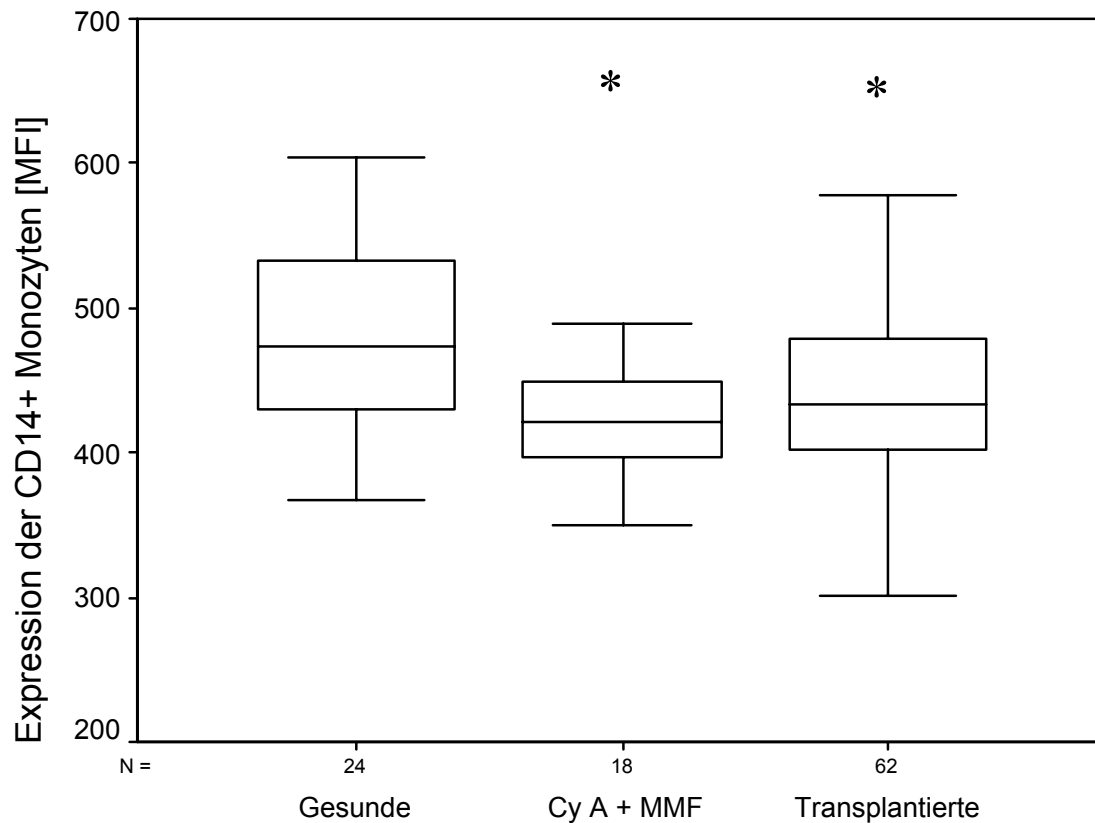


Abbildung 34:

**mCD14-Expression** der peripheren Blutmonozyten: Die höchste mCD14-Expression hatten die gesunden Probanden. Nierentransplantierte Patienten, die nicht CyA-MMF-kombithierapiert wurden, hatten signifikant niedrigere Expressionen als Gesunde ( $p < 0,031$ ). Patienten, die unter CyA-MMF-Kombithierapie standen, hatten signifikant niedrigere mCD14-Expressionen als Gesunde ( $p < 0,008$ ) und auch niedrigere Expressionen als die nierentransplantierten Patienten, die nicht mit CyA-MMF kombithierapiert wurden ( $p < 0,240$ ). (nach Mann-Whitney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

- %-Anteil der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten unter CyA-MMF-Kombinationstherapie

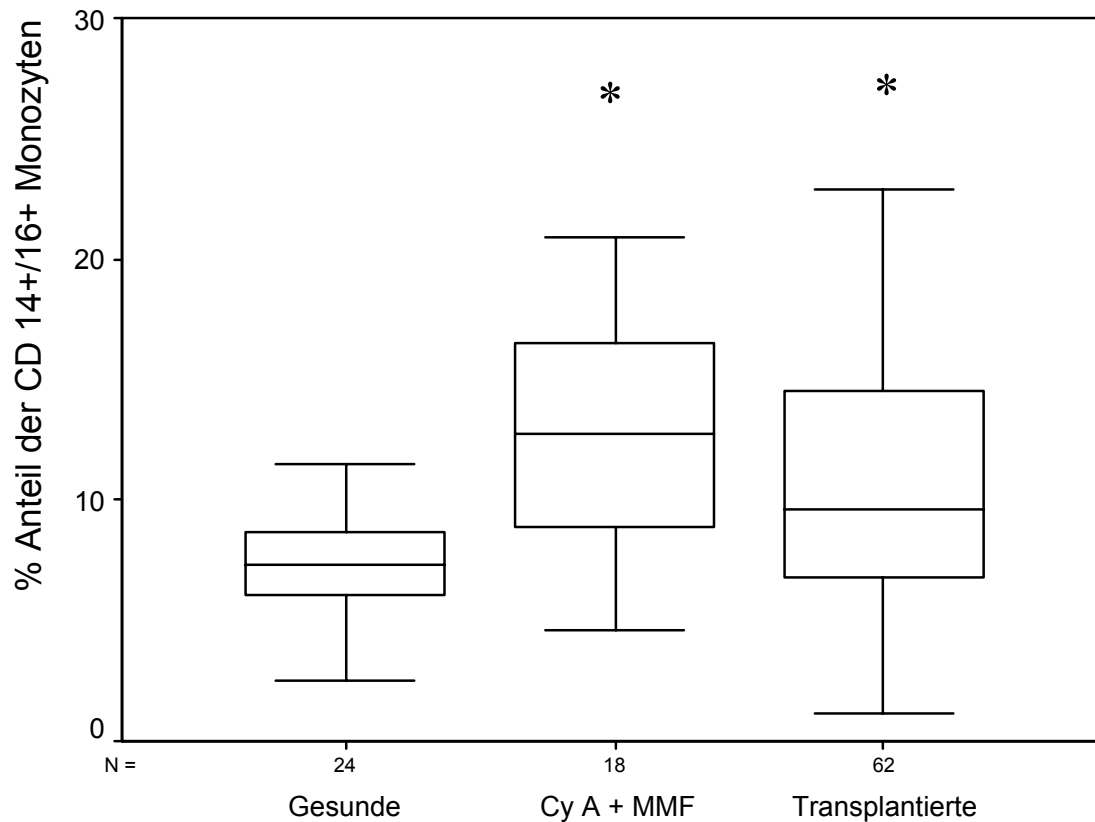


Abbildung 35

der %-Anteil der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten im peripheren Blut: Die geringsten %-Anteile der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten hatten gesunde Probanden. Nierentransplantierte Patienten hatten signifikant höhere %-Anteile als Gesunde ( $p < 0,010$ ) aber niedrigere %-Anteile der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten als nierentransplantierte Patienten, die mit CyA-MMF-kombitherapiert wurden ( $p < 0,091$ ). Patienten mit CyA-MMF-Kombithherapie hatten signifikant höhere %-Anteile als Gesunde ( $p < 0,000217$ ). (nach Mann-Whitney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

## 11.6.4 Systematische Gegenüberstellung

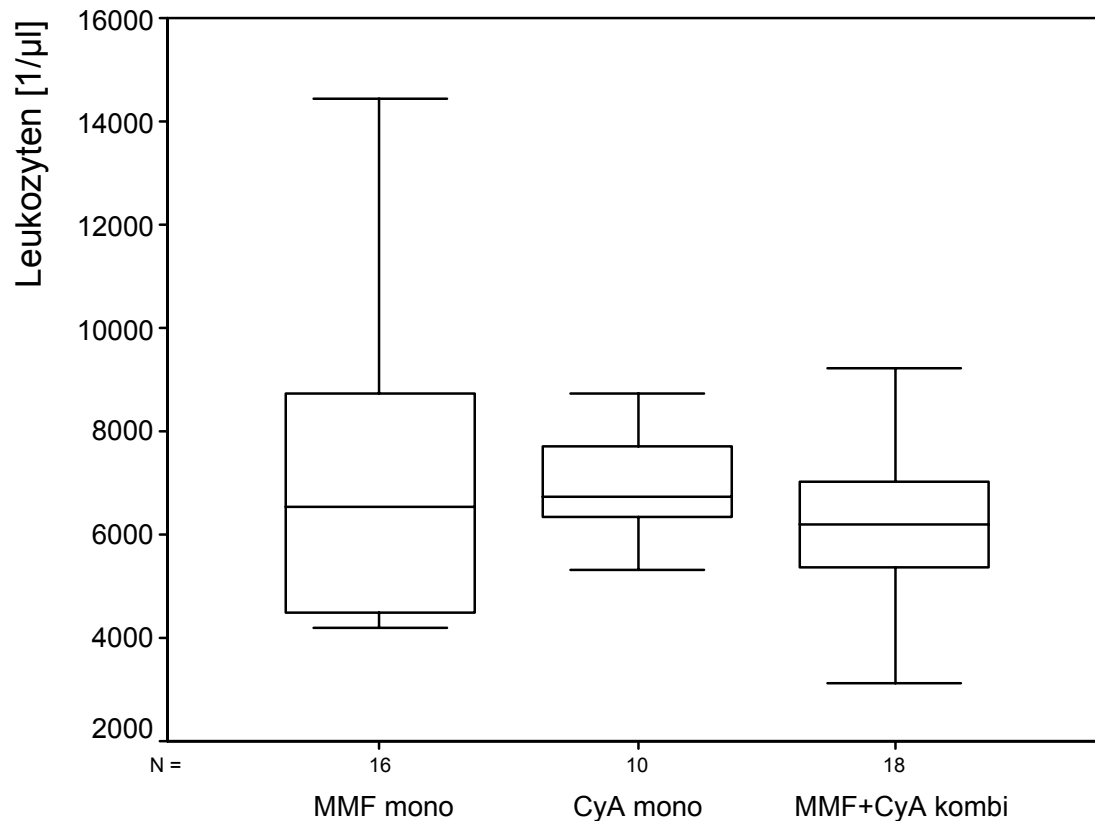
• *Leukozyten*

Abbildung 36:

**Leukozytenzahlen** im peripheren Blutbild der nierentransplantierten Patienten: Durchschnittlich die höchsten Leukozytenzahlen hatten die Patienten, die immunsuppressiv mit CyA-mono therapiert wurden, die größte Standardabweichung hatten die Patienten, die immunsuppressiv mit MMF-mono-therapiert wurden. Die Leukozytenzahlen der verschiedenen Immunsuppressionsregimes unterschieden sich nicht signifikant voneinander. ( $p(\text{MMFmono zu CyAmono}) < 0,660$  bzw.  $p(\text{MMFmono zu kombi}) < 0,574$ ) bzw.  $p(\text{CyAmono zu kombi}) < 0,191$ ). (nach Mann-Whitney)

- *C-reaktives Protein*

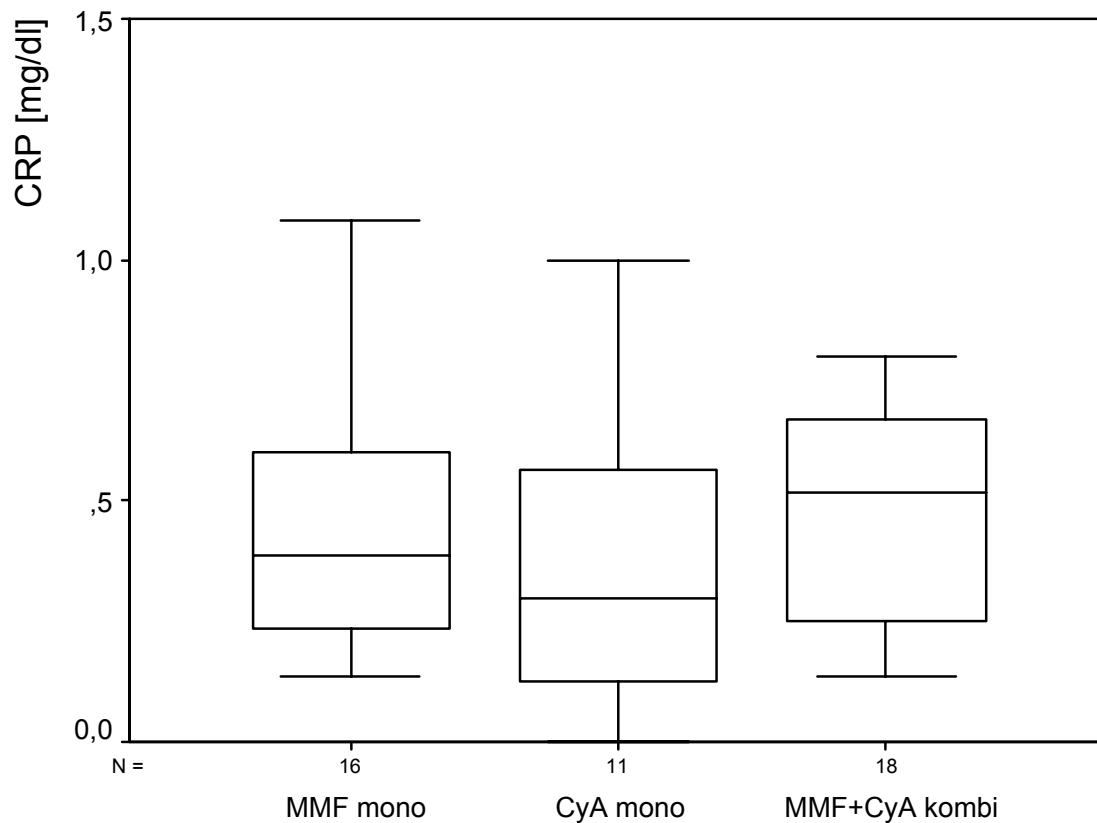


Abbildung 37:

Konzentration des **C-reaktiven Proteins** im Serum der immunsuppremierten Patienten: Durchschnittlich die höchsten CRP-Konzentrationen hatten die Patienten mit MMF-CyA-Kombinationstherapie. Sie unterschieden sich aber nicht signifikant von den beiden Patientenkollektiven mit Monotherapie ( $p(\text{MMFmono zu kombi}) < 0,443$  bzw.  $p(\text{CyAmono zu kombi}) < 0,191$  bzw.  $p(\text{MMF mono zu CyAmono}) < 0,481$ ). (nach Mann-Whitney)

- *mCD14-Expression*

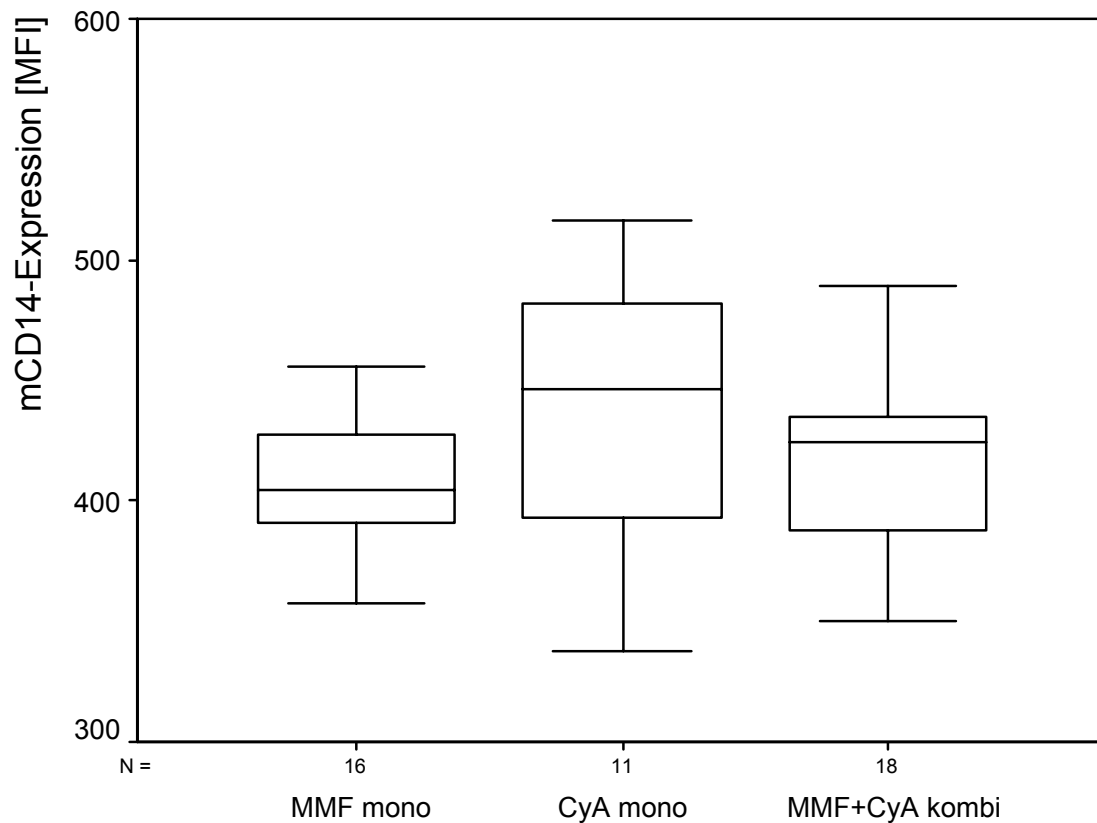


Abbildung 38:

**mCD14-Expression** der nierentransplantierten Patienten: Durchschnittlich die höchste Expression hatten die Patienten, die mit CyA-mono immunsuppressiv behandelt wurden. Sie unterschieden sich aber nicht signifikant von den Patienten, die mit CyA-mono- oder MMF-CyA-kombi-therapiert wurden ( $p(\text{MMFmono zu kombi}) < 0,506$  bzw.  $p(\text{MMFmono zu CyAmono}) < 0,368$  bzw.  $p(\text{CyAmono zu kombi}) < 0,521$ ). (nach Mann-Whitney)

- %-Anteil der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten

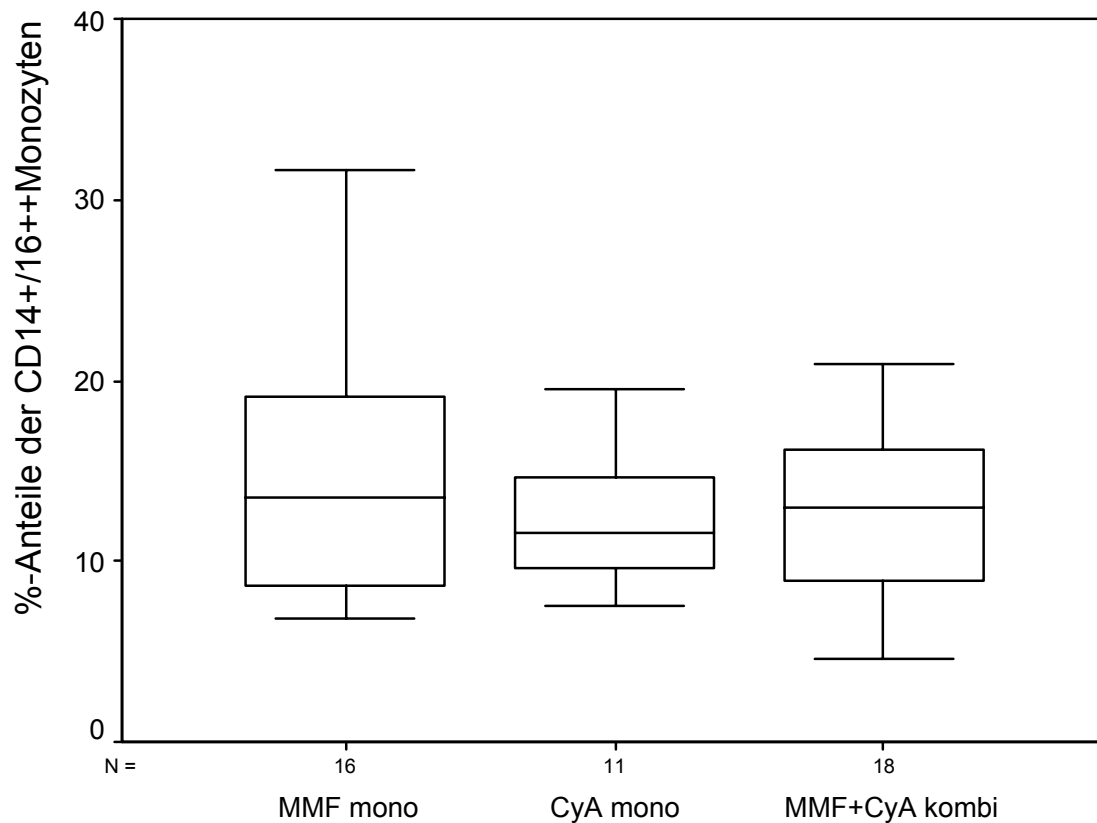


Abbildung 39:

Anteile der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten der nierentransplantierten Patienten: Durchschnittlich die höchsten %-Anteile hatten die Patienten, die mit MMF-mono immunsuppressiv behandelt wurden. Sie unterschieden sich aber nicht signifikant von den Patienten, die mit CyA-mono- oder MMF-CyA-kombi-therapiert wurden ( $p(\text{MMFmono zu kombi}) < 0,825$  bzw.  $p(\text{MMFmono zu CyAmono}) < 0,680$  bzw.  $p(\text{CyAmono zu kombi}) < 0,842$ ). (nach Mann-Whitney)

## 11.7 Monozytenanzahl

## 11.7.1 Gesamtzahl der Monozyten

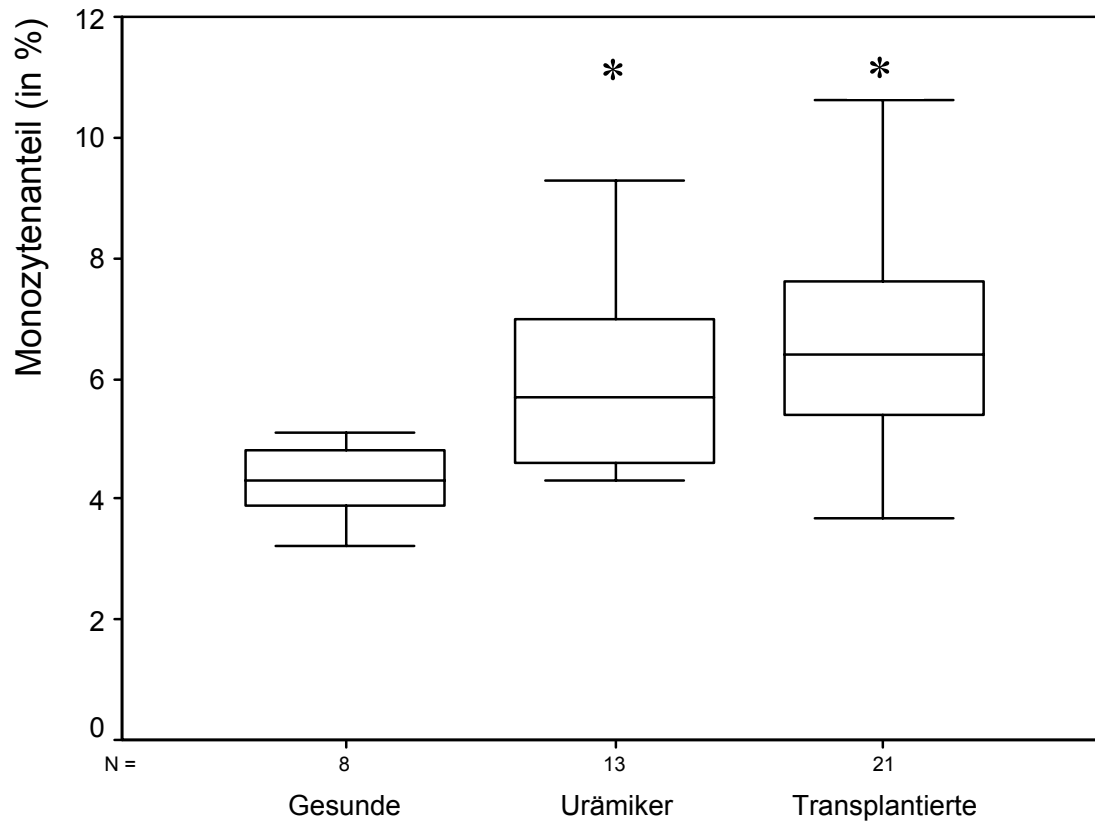


Abbildung 40

**Anteil der Monozyten** in der Leukozytengesamtpopulation: Die gesunden Probanden hatten die geringsten %-Anteile der Monozyten. Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz hatten signifikant höhere Monozytenanteile als Gesunde ( $p < 0,010$ ). Nierentransplantierte Patienten hatten signifikant höhere Monozytenanteile als Gesunde ( $p < 0,005$ ) und nicht signifikant höhere Monozytenanteile als chronisch niereninsuffiziente Patienten ( $p < 0,462$ ). (nach Mann-Whitney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden



## 11.7.2 Absolutzahl der CD14+/16+ positiven Monozyten

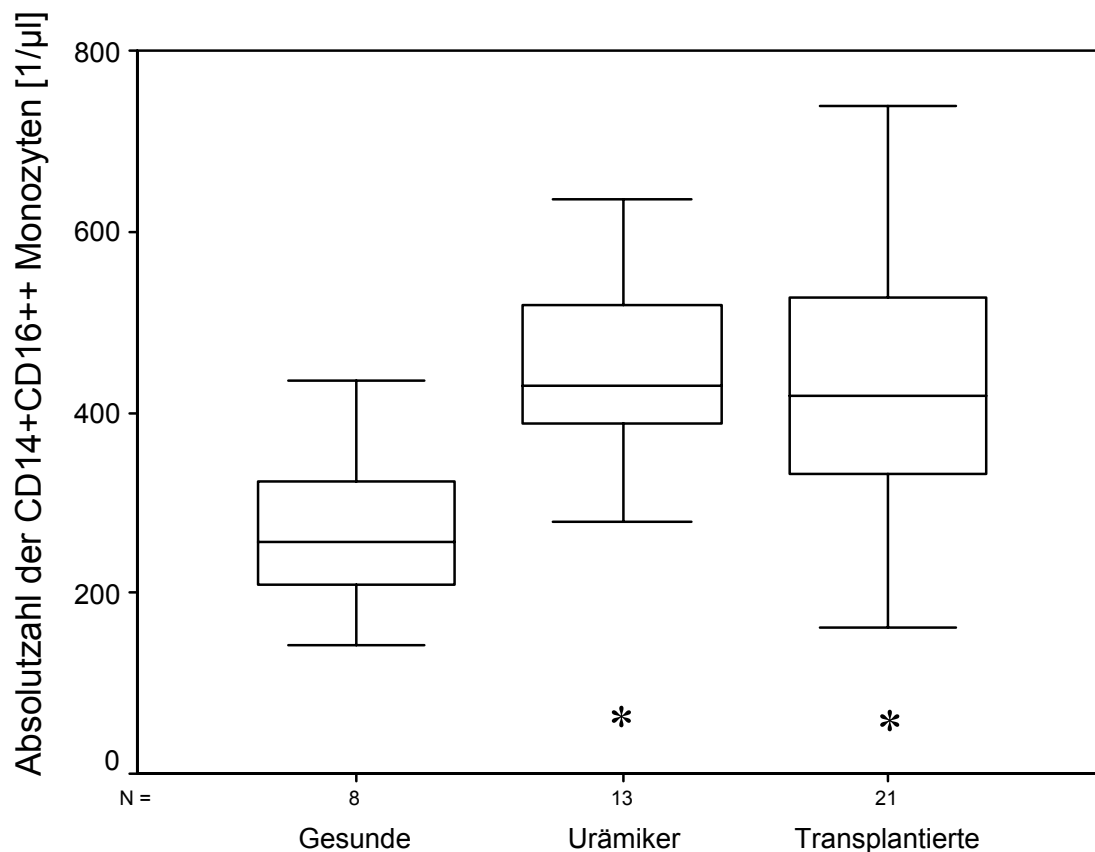


Abbildung 41

**Absolutzahl der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten im peripheren Blut:** Gesunde Probanden hatten die wenigsten CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten im peripheren Blut. Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz hatten signifikant höhere CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten als Gesunde ( $p < 0,003$ ) und nicht signifikant höhere CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten als nierentransplantierte Patienten ( $p < 0,834$ ). Nierentransplantierte Patienten hatten signifikant mehr CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten als Gesunde ( $p < 0,005$ ). (nach Mann-Whitney)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

## 11.8 Abhängigkeit vom Alter des Transplantates

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Median
Alle ntx- Patienten	0,13	17,14	6,39	5,22	5,57
MMF-mono-Therapie	0,21	16,65	8,07	5,87	8,17
Cy A-mono-Therapie	1,29	15,98	10,29	4,35	11,04
Cy A und MMF-Kombitherapie	0,43	16,65	6,75	5,43	6,05

*Tabelle: Alter des Transplantates [in Jahren]: Auffallend hoch war der Median und der Mittelwert des Transplantatalters bei den mit CyA-monotherapierten Patienten, gefolgt von den Patienten mit MMF-mono-Therapie und den Patienten mit CyA-MMF-Kombinationstherapie.*

## 11.8.1 Leukozyten

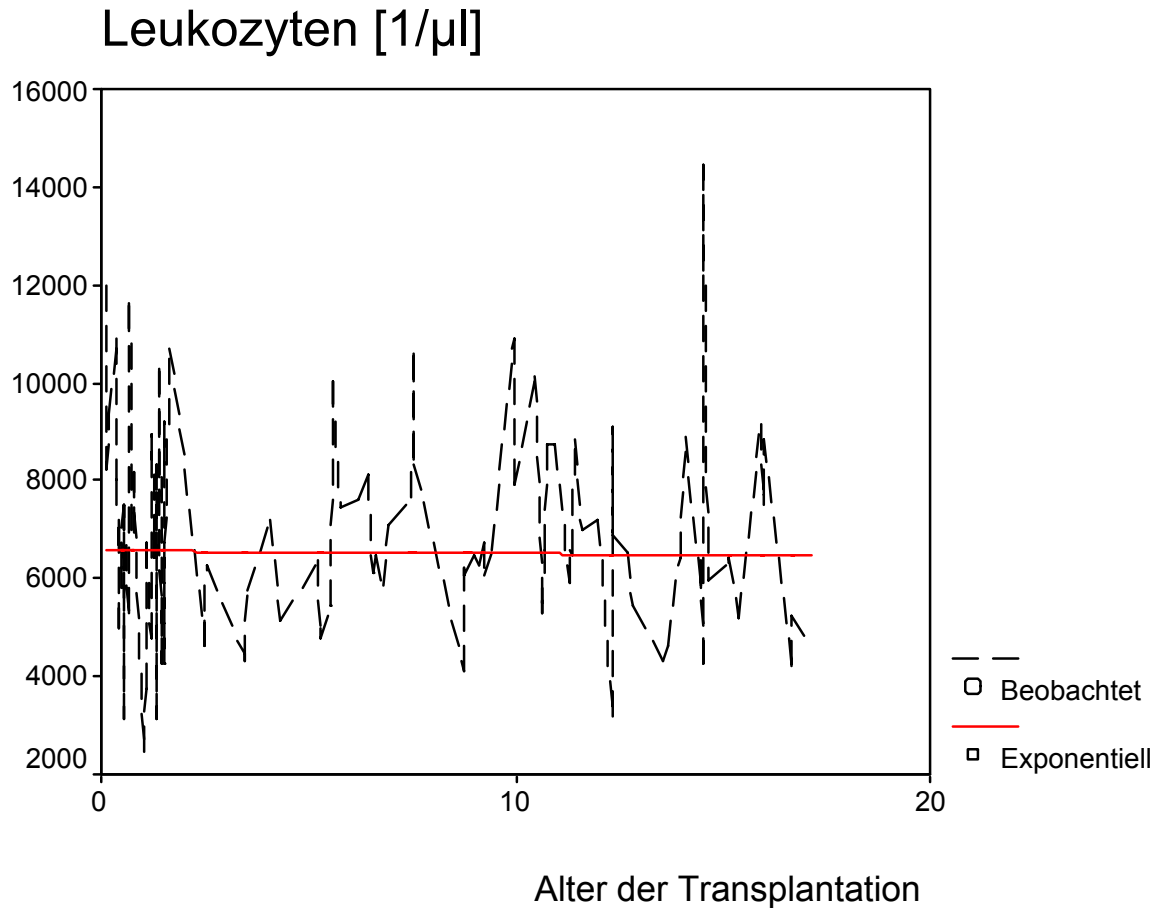


Abbildung 42:

**Regression der Leukozytenanzahl im peripheren Blutbild der nierentransplantierten Patienten gegen das Alter des Transplantates:** Je länger die Transplantation zurücklag, um so weniger Leukozyten konnten gezählt werden. Dies entspricht am ehesten einer exponentiellen Kurve ( $p < 0,876$ ).

Regressions-Gleichung:  $Y = 6568,23 \cdot e^{-0,0009 \cdot X}$

## 11.8.2 C-reaktives Protein

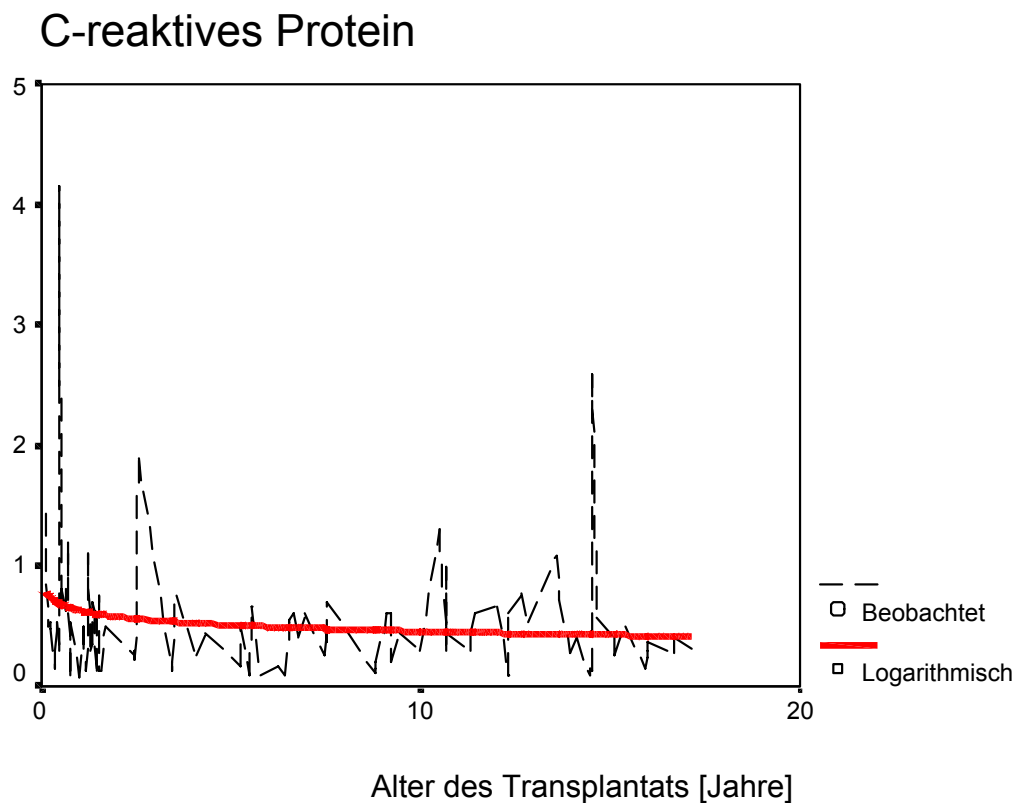


Abbildung 43

**Regression des C-reaktiven Proteins** gegen das Alter der Transplantation: Die Kurve kann mit einer logarithmischen Funktion am besten beschrieben werden ( $p < 0,065$ ). Direkt nach der Transplantation war das C-reaktive Protein noch erhöht, nach einigen Monaten der Behandlung mit Immunsuppressiva, fällt der Wert logarithmisch ab.

Regressions-Gleichung:  $Y = 0,6298 + -0,0755 \cdot (\ln X)$

## 11.8.3 mCD14-Expression

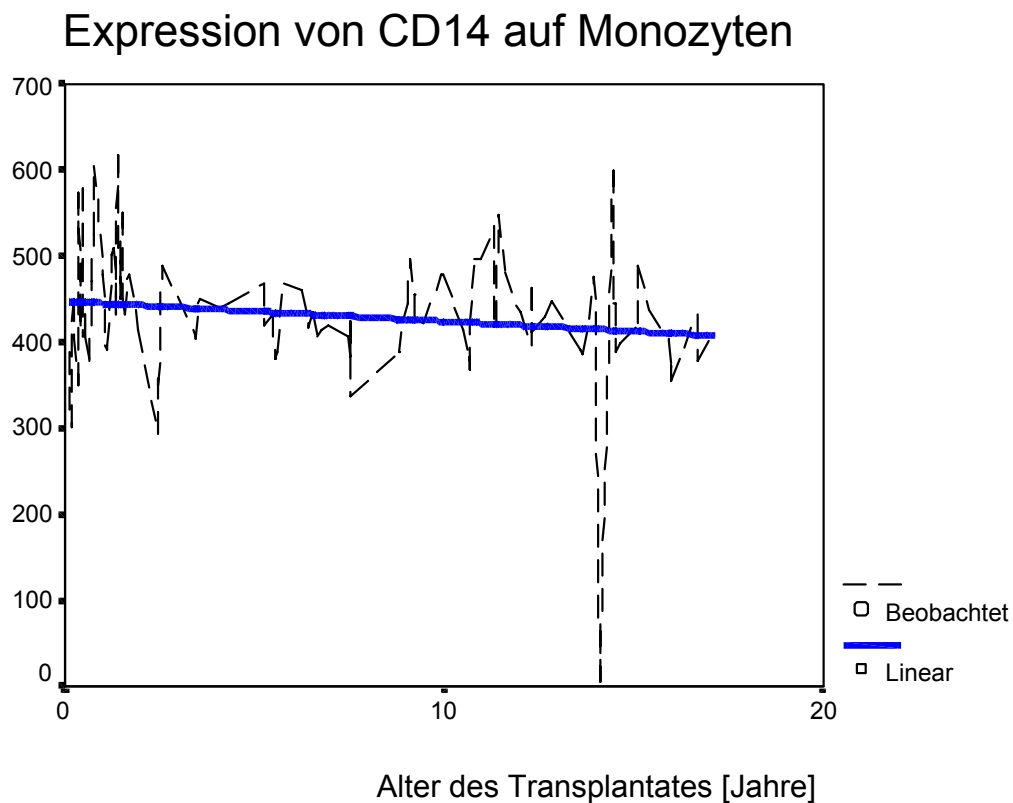


Abbildung 44

**Regression der mCD14Expression auf peripheren Blutmonozyten.** Je länger die Transplantation zurücklag, um so schwächer wurde die mCD14-Expression. Die Kurve wird am besten mit einer Linearfunktion beschrieben, deren Steigungsfaktor bei  $-2,33$  liegt ( $p < 0,063$ ).

Regressions-Gleichung:  $Y = 447,477 + -2,3239 \cdot X$

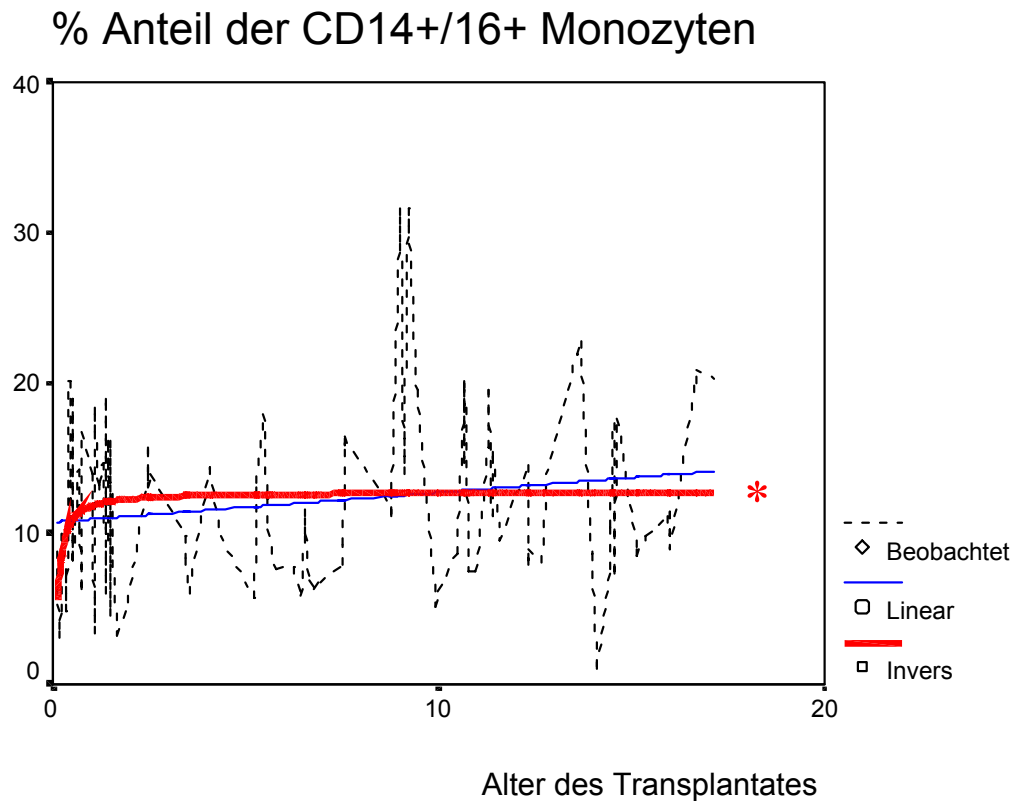
11.8.4 CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten

Abbildung 45

**Regression des Anteils der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten gegen das Alter des Transplantates:** Signifikant genau wird die Kurve durch eine Invers-Funktion ( $p < 0,036$ ) beschrieben. In den ersten Monaten nach Transplantation stieg der Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten vom Normwert auf einen fast doppelt so hohen Wert an. Dieser wurde dann über mehrere Jahre gehalten und stieg nur wenig weiter an.

**Regressions-Gleichung**

Linear:  $Y = 10,7689 + 0,1976 \cdot X$

Invers:  $Y = 12,7761 + -0,9390 \cdot 1/X$

\* = signifikant

## 11.9 Der Verlauf während einer Sepsis

## 11.9.1 Leukozyten

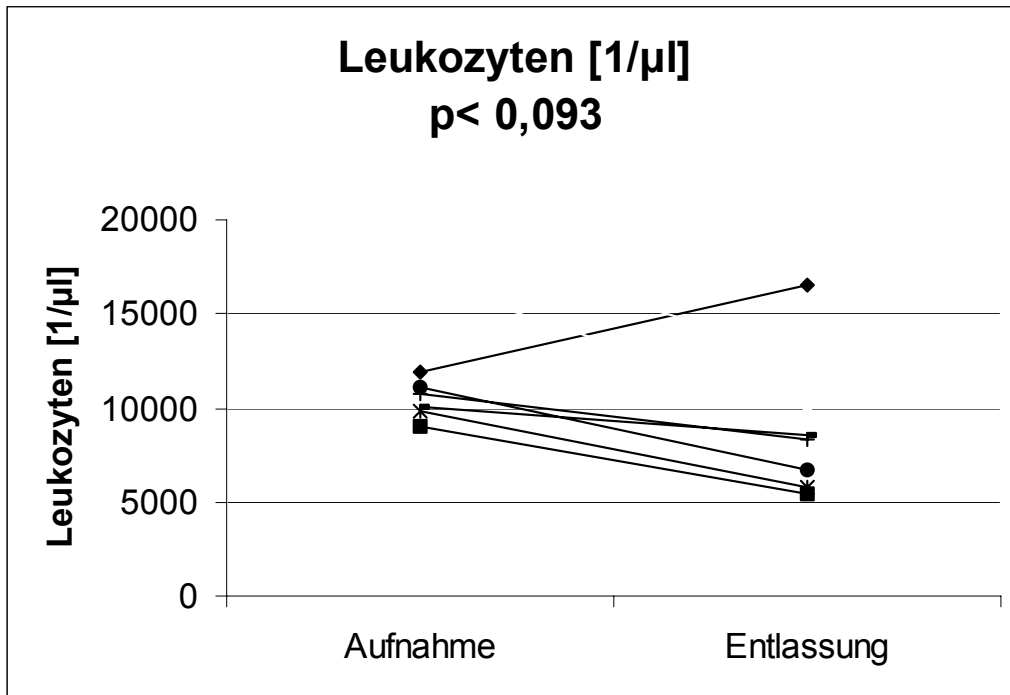


Abbildung46 :

**Verlauf der Leukozytenanzahl [1/µl] während einer Sepsis:** Aufgetragen wurde die Anzahl der Leukozyten von Patienten mit einer Sepsis. Zeitpunkte der Blutentnahme waren die Aufnahme und die Entlassung in die Klinik. Zum Zeitpunkt der Entlassung war die Sepsis klinisch rückläufig bzw. ausgeheilt. Während des Klinikaufenthaltes nahmen die Leukozytenzahlen nicht signifikant ab ( $p < 0,093$ ). (nach Mann-Whitney)

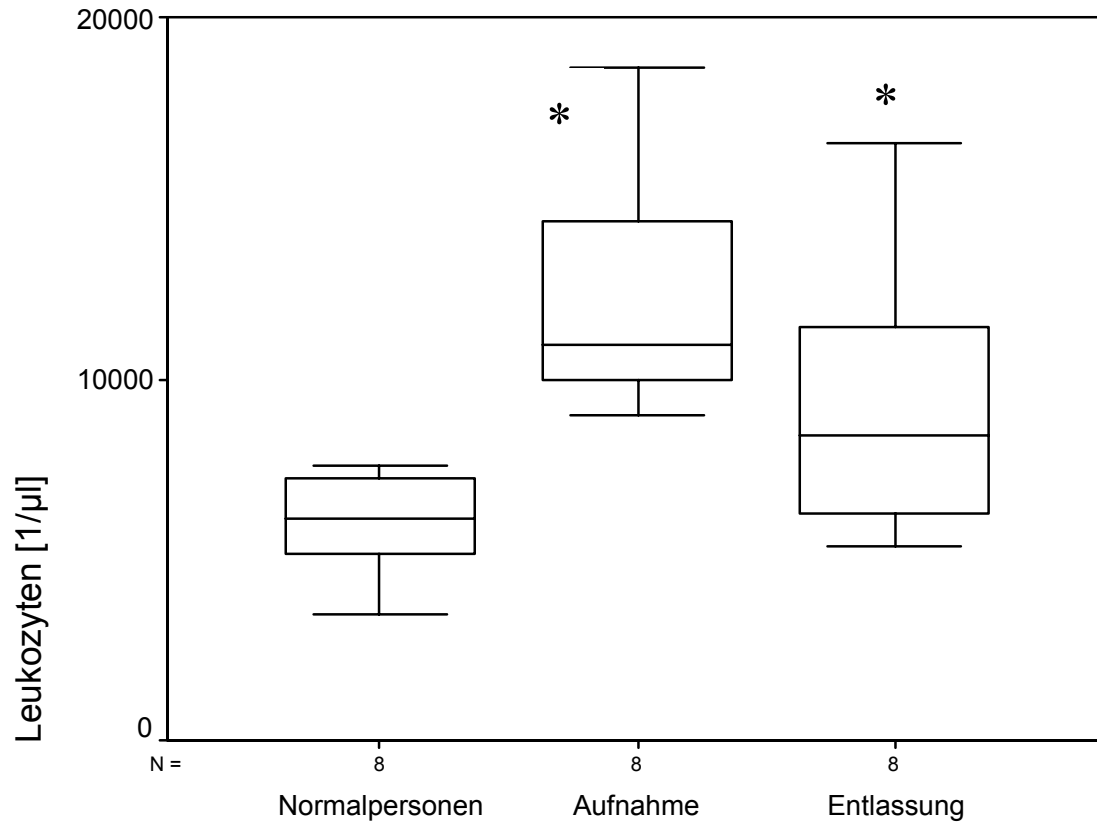


Abbildung 47:

**Abnahme der Leukozytenzahl im Verlauf einer Sepsis:** Während einer Sepsis waren die Leukozytenzahlen signifikant erhöht gegenüber denen der Gesunden ( $p < 0,00016$ ). Während eines Klinikaufenthaltes nahmen die Leukozytenzahlen nicht signifikant ab ( $p < 0,093$ ) gegenüber dem Ausgangswert bei Aufnahme. Bei Entlassung unterschied sich die Anzahl gegenüber den der Gesunden immer noch signifikant ( $p < 0,05$ ). (nach Mann-Whitney und Paar-Differenz-Test)

\* = signifikant gegenüber Gesunden



## 11.9.2 Der Verlauf des C-reaktiven Proteins während einer Sepsis

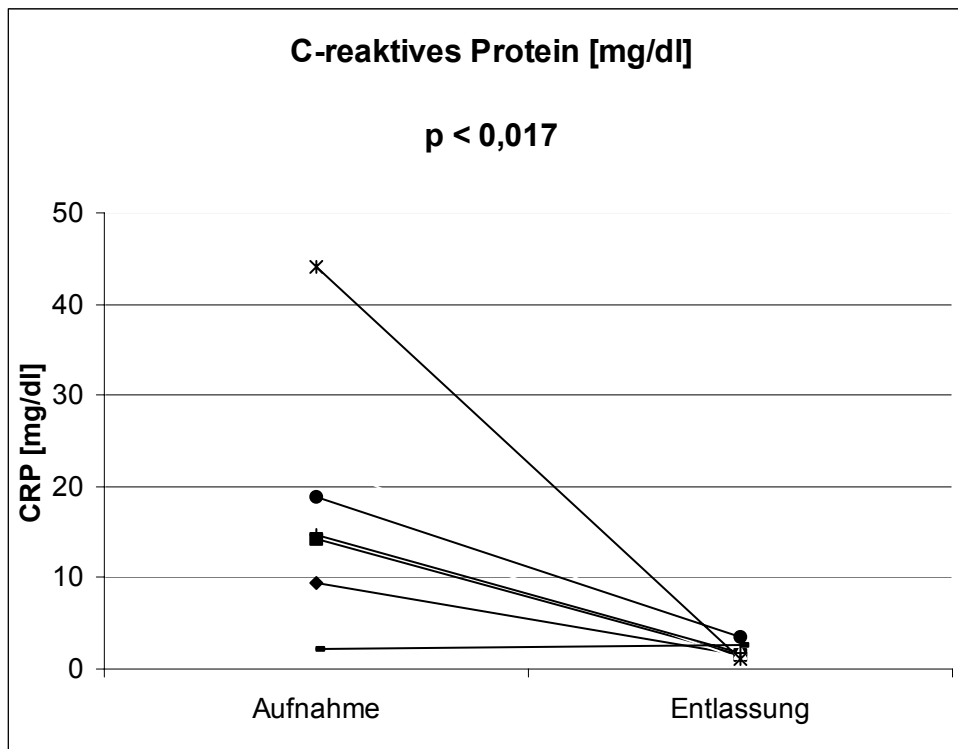


Abbildung 48:

**Abnahme des CRP im Verlauf einer Sepsis:** Aufgetragen wurden das c-reaktive Protein bei Aufnahme und bei Entlassung von Patienten mit einer Sepsis in die Klinik. Bei Entlassung der Patienten war die Sepsis klinisch rückläufig bzw. ausgeheilt. Während des Klinikaufenthaltes nahm das CRP signifikant ab ( $p < 0,017$ ). (nach Mann-Whitney)

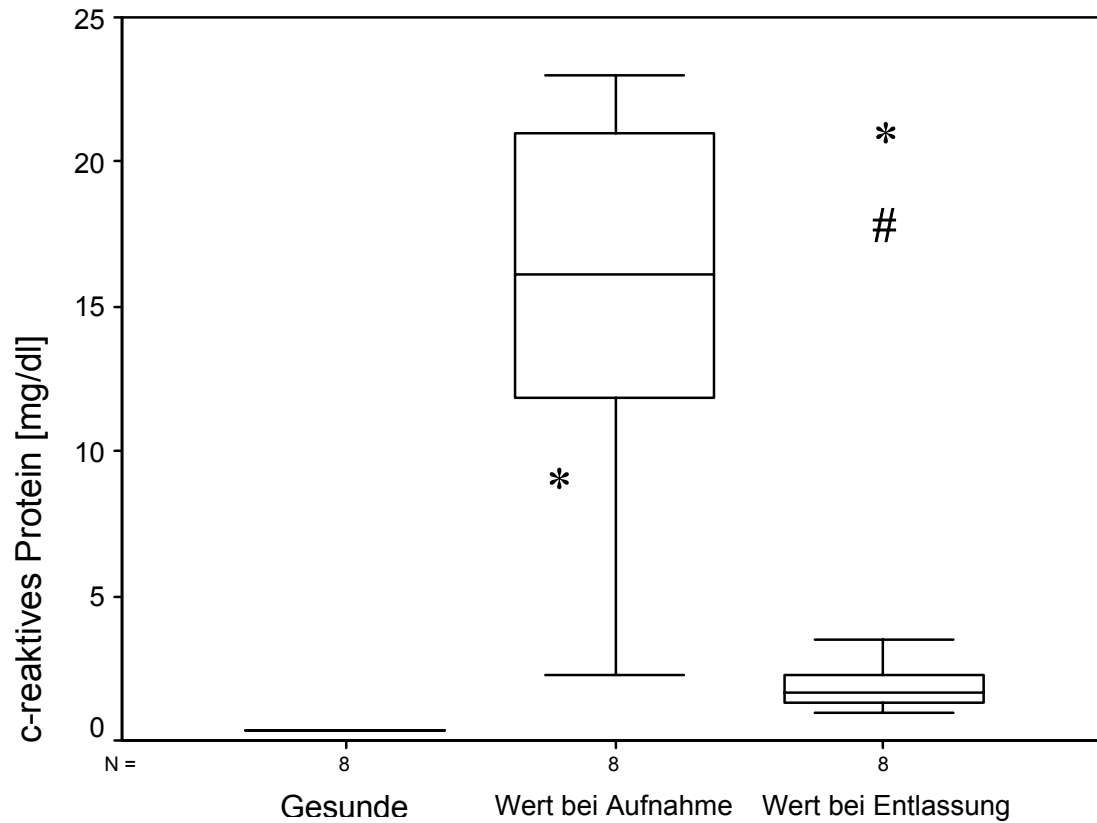


Abbildung 49:

**Abnahme des C-reaktiven Proteins (CRP) im Verlauf einer Sepsis:** Bei Klinikaufnahme der Patienten mit Sepsis war das CRP signifikant erhöht gegenüber dem der Gesunden ( $p < 0,00016$ ). Während eines Klinikaufenthaltes nahm das CRP signifikant ab ( $p < 0,017$ ) gegenüber dem Ausgangswert bei Aufnahme. Bei Entlassung unterschieden sich das CRP gegenüber den Gesunden noch signifikant ( $p < 0,00016$ ). (nach Mann-Whitney und Paar-Differenz-Test)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

# = signifikant gegenüber Aufnahme

## 11.9.3 Der Verlauf der mCD14-Expression während einer Sepsis

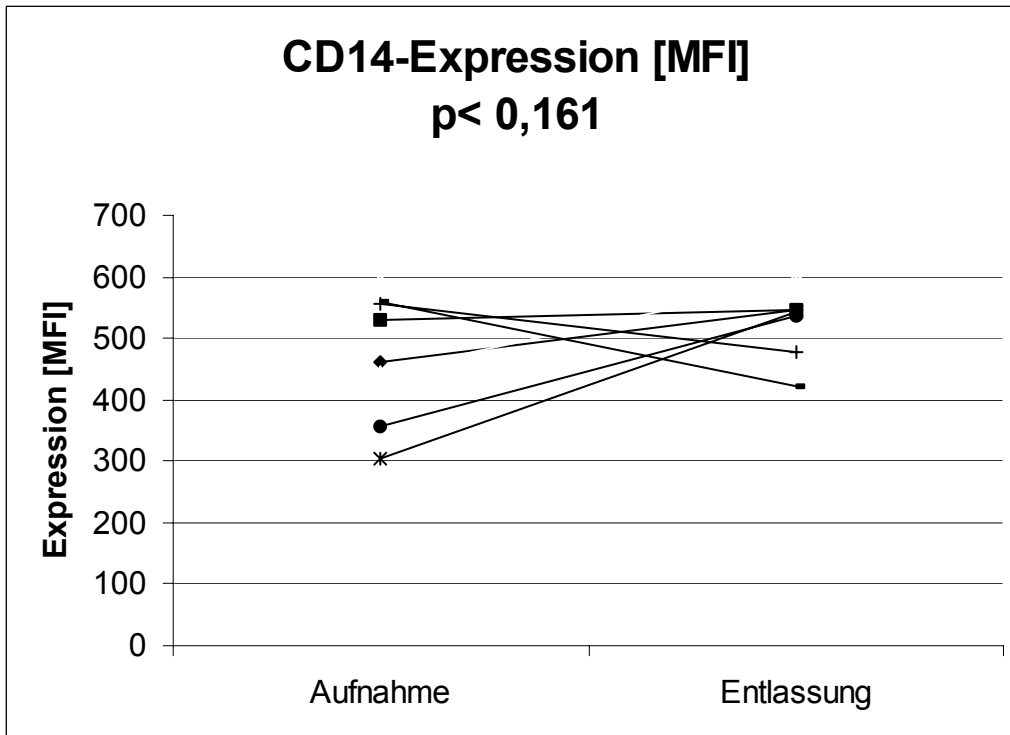


Abbildung 50:

**Verlauf der mCD14-Expression** der Monozyten im Verlauf einer Sepsis: Aufgetragen wurde die mCD14-Expression bei Aufnahme und bei Entlassung von Patienten mit einer Sepsis in die Klinik. Bei Entlassung der Patienten war die Sepsis klinisch rückläufig bzw. ausgeheilt. Während des Klinikaufenthaltes nahm die mCD14 Expression nicht signifikant zu ( $p < 0,161$ ). (nach Mann-Whitney)

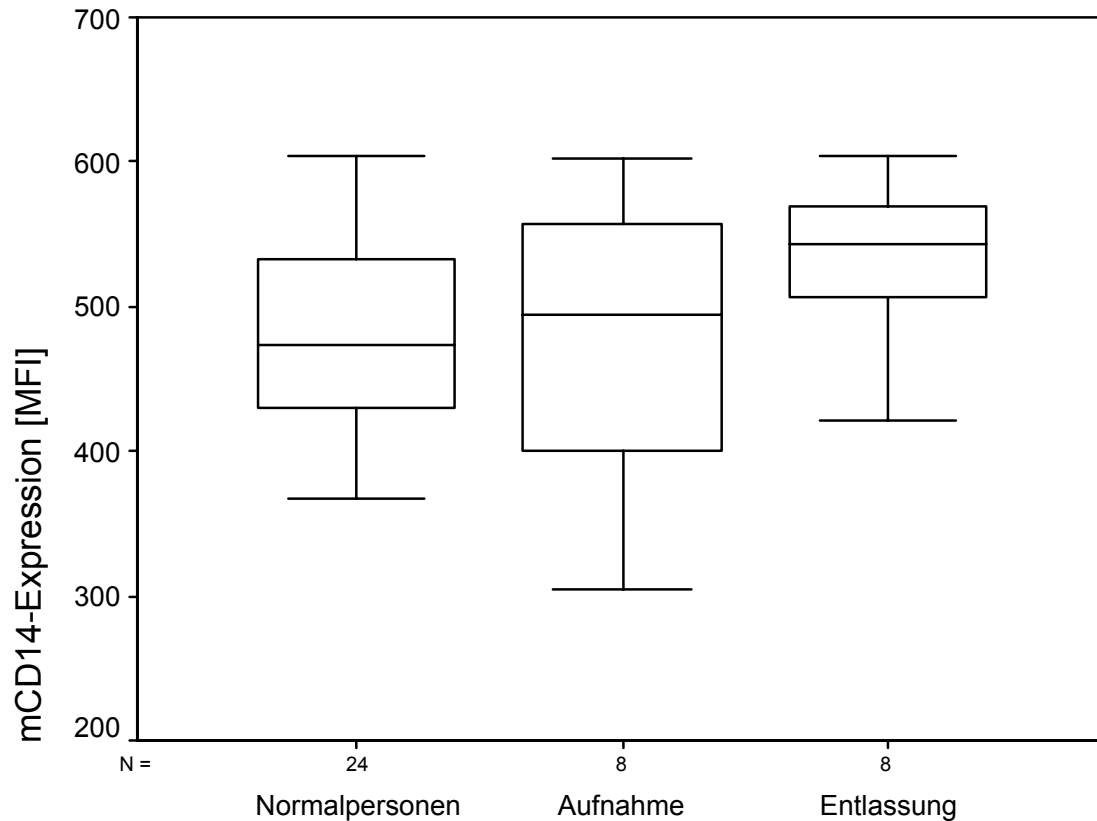


Abbildung 51:

**Zunahme der mCD14-Expression [MFI] im Verlauf einer Sepsis:** Bei Klinikaufnahme der Patienten mit Sepsis war die mCD14-Expression nicht signifikant erhöht gegenüber der der Gesunden ( $p < 0,848$ ). Während eines Klinikaufenthaltes nahm die mCD14-Expression nicht signifikant ( $p < 0,161$ ) gegenüber dem Ausgangswert bei Aufnahme zu. Bei Entlassung unterschieden sich die mCD14-Expression gegenüber der der Gesunden nicht signifikant ( $p < 0,078$ ) (nach Mann-Whitney und Paar-Differenz-Test)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

# = signifikant gegenüber Aufnahme

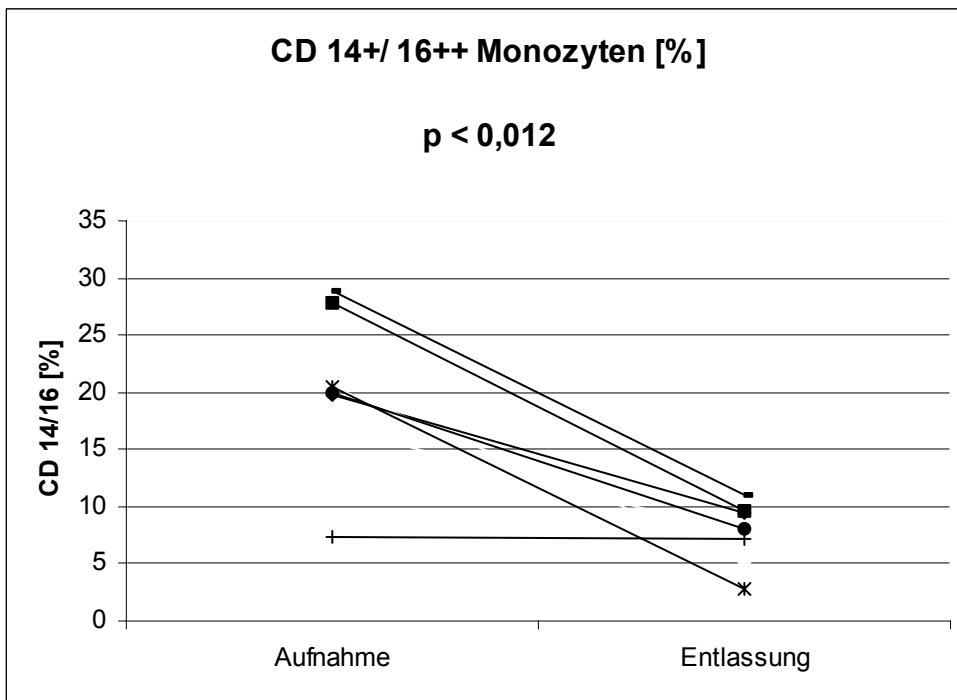
11.9.4 Der Verlauf der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten während einer Sepsis

Abbildung 52:

**Abnahme des Anteils der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten im Verlauf einer Sepsis:** Aufgetragen wurden die %-Anteile der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten bei Aufnahme und bei Entlassung von Patienten mit einer Sepsis in die Klinik. Bei Entlassung der Patienten war die Sepsis klinisch rückläufig bzw. ausgeheilt. Während des Klinikaufenthaltes nahm der %-Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten signifikant ab ( $p < 0,012$ ). (nach Mann-Whitney)

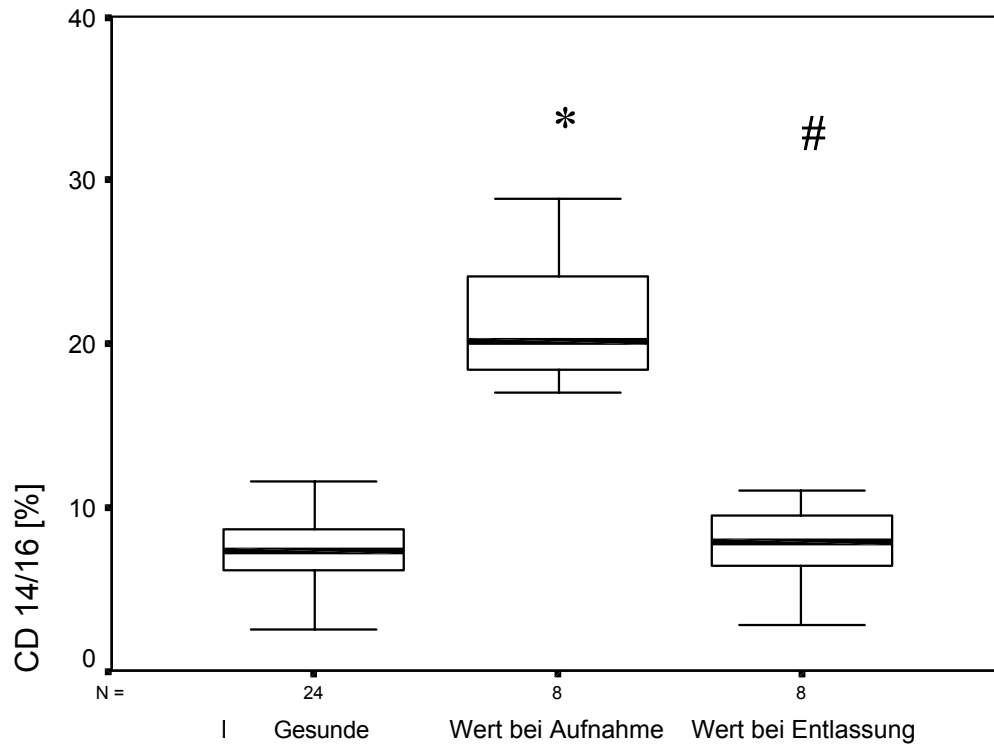


Abbildung 53 :

**Abnahme des Anteils der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten im Verlauf einer Sepsis:** Bei Klinikaufnahme der Patienten mit Sepsis waren die %-Anteile der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten signifikant erhöht gegenüber denen der Gesunden ( $p < 0,000049$ ). Während eines Klinikaufenthaltes nahm der %-Anteil der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten signifikant ab ( $p < 0,012$ ) gegenüber dem Ausgangswert bei Aufnahme. Bei Entlassung unterschieden sich die %-Anteile der  $CD14^{low}CD16^{high}$ -Monozyten gegenüber den der Gesunden nicht mehr signifikant ( $p < 0,623$ ) (nach Mann-Whitney und Paar-Differenz-Test)

\* = signifikant gegenüber Gesunden

# = signifikant gegenüber Aufnahme

## 12 Besprechung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten bei Gesunden, chronisch niereninsuffizienten Patienten und bei Patienten nach Nierentransplantation untersucht.

### 12.1 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Patienten, die unter chronischer Niereninsuffizienz leiden, zeigen deutlich erhöhte Leukozytenzahlen, ein hohes C-reaktives Protein, eine sehr niedrige mCD14-Expression auf Blutmonozyten und eine erhöhte Anzahl proinflammatorischer CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten. Dies ist vereinbar mit dem Bild eines permanenten subtilen inflammatorischen Prozesses (=sogenannte Mikroinflammation).

#### 12.1.1 Ursachen der Mikroinflammation bei chronisch niereninsuffizienten Patienten

Die Mortalität unter Patienten mit Niereninsuffizienz im Terminalstadium ist gegenüber altersnormierten Personen signifikant erhöht. Kardiovaskuläre Erkrankungen stehen bei chron. Nierenversagen an der Spitze der Todesursachen. Bei Patienten mit Hämodialyse ist einer der Hochrisikofaktoren die Hypoalbuminämie. Erhöhte Serumkonzentrationen spezieller Zytokine, nämlich Interleukin-6 und TNF- $\alpha$  oder akute-Phase-Proteinen wie CRP, Fibrinogen und Serum-Amyloid-A sind eng assoziiert mit vaskulären Erkrankungen. Der oben beschriebene proinflammatorische Zustand wird auch durch Endprodukte der Glykosilierung, die während der Nierenerkrankung akkumulieren, ausgelöst und perpetuiert. Abwehrmechanismen gegenüber Infektionserregern sind reduziert. Dies hat die oben genannten Auswirkungen auf das Gefäß-Endothelium [Kaysen G.A. 2001]. Der

oxidative Stress ist unter Hämodialyse deutlich erhöht. Die Sauerstoffradikale verursachen ihrerseits die Mikroinflammation.

In einigen Studien wurde dem CRP im Serum eine hohe Sensitivität für kardiovaskuläre Erkrankungen und Mortalität zugewiesen. Ob das CRP ursächlich an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt ist, oder ob es nur ein Surrogat-Marker ist, ist noch unbekannt.

Die chronische Niereninsuffizienz ist charakterisiert durch die Akkumulation sogenannter „advanced-glycation-end products“ (AGEs) und „advanced oxidation products“ (AOPs). AGEs wurden vermehrt in der Aorta von Hämodialysepatienten nachgewiesen. Die Inkubation von Endothelzellen mit AGEs induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen mit besonderer Attraktivität für Monozyten. Proinflammatorische Effekte der AGEs werden durch einen speziellen Rezeptor (RAGE) ausgelöst. Schwedler et al. [2001] stellten die Hypothese auf, dass eine Verbindung zwischen der gesteigerten hepatischen Produktion des CRP und der Akkumulation der AGEs in der Urämie existieren muss. AGEs könnten die CRP Produktion in den Hepatozyten direkt oder indirekt über eine Interaktion mit Monozyten stimulieren.

An der Mikroinflammation ist auch das Komplement-System beteiligt. Das Komplement-System könnte durch Endotoxine, die im Endstadium der Niereninsuffizienz entstehen, aktiviert werden [Deppisch et al. 2001].

### 12.1.2 sCD14 und CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>- Monozyten

Scherberich und Nockher [1999] untersuchten das Verhalten des sCD14 und der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>- Monozyten bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie und/oder antiinflammatorischer Therapie.

Sie zeigten, dass der Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>- Monozyten bei kompensiert niereninsuffizienten Patienten und unter Hämodialyse-Behandlung signifikant höher ist, als



bei Gesunden. Patienten mit Hämodialyse-Behandlung und chronischen Infektionen haben deutlich höhere prozentuale Anteile an  $CD14^{low}CD16^{high}$ - Monozyten als „stabile“ Hämodialyse-Patienten. Patienten, die unter einer HIV-Infektion leiden, haben ebenfalls signifikant höhere %-Anteile an  $CD14^{low}CD16^{high}$ - Monozyten als Gesunde (siehe Abbildung).

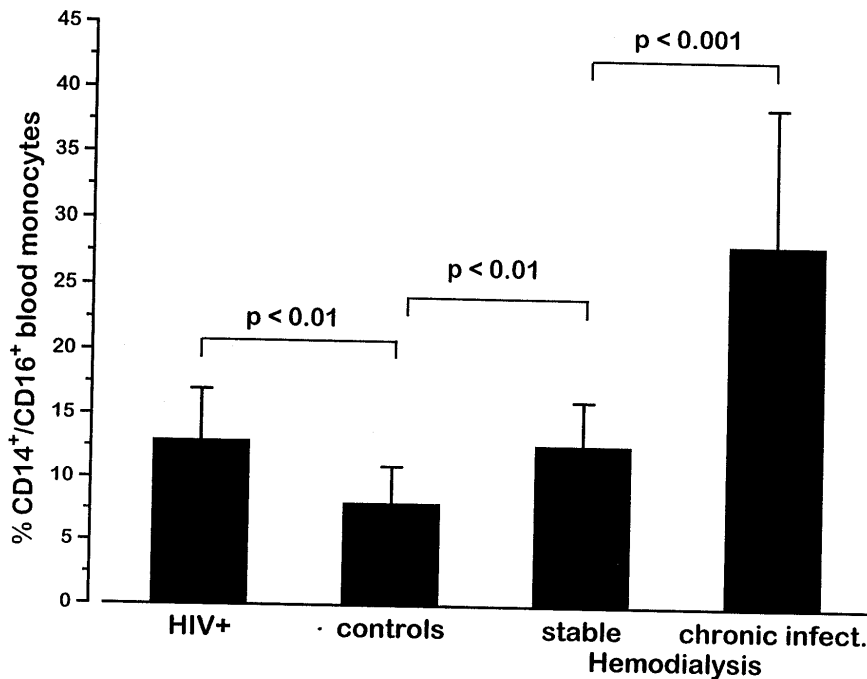


Abbildung 54:

*Patienten, die unter einer HIV-Infektion leiden, haben signifikant höhere Anteile an  $CD14^{+}/CD16^{+}$ -Monozyten als Gesunde. Patienten, die mit einer Hämodialyse behandelt werden, haben signifikant höhere %-Anteile an  $CD14^{+}/CD16^{+}$ -Monozyten als Gesunde. Patienten, die unter der Hämodialysebehandlung unter chronischen Infektionen leiden, haben ebenfalls mehr  $CD14^{+}/CD16^{+}$ -Monozyten als stabile Hämodialyse-Patienten. (aus Scherberich, J.E., Nockher, W.A.,  $CD14^{++}$  monocytes,  $CD14^{+}/CD16^{**}$  subset and soluble  $CD14$  as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37(3): 209-213, 1999).*

### 12.1.3 Interpretation unserer Ergebnisse

Wir untersuchten Patienten, die unter einer Niereninsuffizienz im Endstadium leiden, aber noch nicht einer Hämodialyse-Behandlung unterzogen wurden. Diese Patienten hatten durchschnittlich höhere Leukozytenzahlen im peripheren Blutbild als Gesunde und nierentransplantierte Patienten. Die CRP-Konzentration im Serum war bei den Patienten

mit chronischer Niereninsuffizienz signifikant höher als bei Gesunden und den nierentransplantierten Patienten. Die mCD14-Expression war dagegen bei urämischen Patienten signifikant im Vergleich zu Gesunden vermindert ( $p < 0,001$ ). Der Anteil CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten war bei Patienten mit einer präterminalen Niereninsuffizienz signifikant höher als bei Gesunden oder Nierentransplantierten.

Damit unterliegen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eindeutig einer chronischen Mikroinflammation. Diese kann auf Endotoxine, auf einer Aktivierung des Komplement-Systems oder auf dem oxidativen Stress über die biologischen Effekte der AGEs beruhen. Die chronische Mikroinflammation kann **nicht allein** über den Kontakt mit der Dialysemembran erklärt werden, da unsere Patienten noch nicht einer Nierenersatztherapie (hier Hämodialysebehandlung) unterzogen wurden.

Da Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz vermehrt unter kardiovaskulären Erkrankungen leiden, sollte ein zuverlässiger (zellulärer) Marker gefunden werden, der die Erkrankungstendenz früh anzeigt. Es könnten, neben dem C-reaktiven Protein, auch die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten als „Biomarker“ an Bedeutung gewinnen. Periphere Blutmonozyten sind die hauptsächlichen Ziel- und Effektorzellen einer progredienten Atheromatose (siehe Abbildung). Studien zu dieser Thematik stehen noch aus.

Denkbar wäre auch, dass die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten den entsprechenden Link darstellen, der an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt ist. Eine Blockierung dieser Rezeptoren könnte so die Arteriosklerose verhindern. Auch hierzu stehen noch weitere Studien aus.

## 12.2 Patienten nach Nierentransplantation

Die zelluläre Abstoßungsreaktion ist durch zwei Prozesse gekennzeichnet: 1. der Aktivierung und Proliferation von Empfängerlymphozyten und 2. der Infiltration dieser

Zellen über das Gefäßendothel in das Spenderorgan. Die Zellaktivierung wird primär über die lymphozytäre Produktion und Sezernierung von Interleukin-2 (IL-2) sowie der Exprimierung von IL-2-Rezeptoren vermittelt. Die Steuerung der Lymphozyteninfiltration erfolgt über eine Interaktion lymphozytärer Adhäsionsrezeptoren LFA-1 (Leucocyte function-associated antigen-1), sLeX (Sialyl Lewis X) und VLA-4 (Very late antigen 4) mit endothelialen Liganden ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), E-Selektin bzw. VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1). Immunsuppressive Medikamente hemmen selektiv die IL-2 gesteuerte Immunabwehr, haben jedoch keinen direkten Einfluss auf die Infiltration aktiver Zellen in das Transplantat. Langfristig sollte ein Therapieregime angestrebt werden, das eine Blockade sowohl der Zellproliferation, als auch der Zellmigration erlaubt [Blaheta et al. 1997].

### 12.2.1 Abstoßung des Transplantates

Monozyten spielen auch als Antigen-präsentierende Zellen bei der Abstoßung eines Transplantats eine entscheidende Rolle. Bei bioptisch gesicherten Nieren-Transplantatabstoßungen finden sich Monozyten und Makrophagen stets in hohen Konzentrationen im Gewebe [Vos et al. 2000; Baer et al. 2000]. Gleichzeitig nimmt die Expression von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktoren (GM-CSF) zu. An Ratten lies sich die chronologische Abfolge monozytäre Reaktionen belegen: ein bis zwei Tage nach Nierentransplantation entwickelte sich ein perivaskuläres Infiltrat, das zahlreiche Spender- und Empfänger-Makrophagen enthielt. In den folgenden zwei Tagen vermehrte sich das Infiltrat massiv. Bei einer kompletten Abstoßung waren die Makrophagen den T-Zellen zahlenmäßig weit überlegen. In der letzten Phase wurde das Transplantat zerstört. Die Zahl interstitieller, intraepithelialer (tubulärer) und glomerulärer Monozyten geht parallel mit der Schwere und charakterisiert die chronische Abstoßungsreaktion (chron. Transplantatdysfunktion) [Grau et al. 1998].

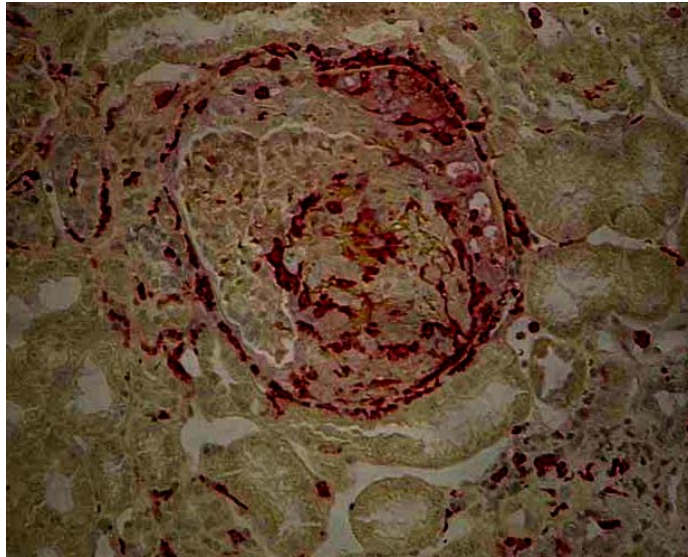


Abbildung 55

*Immunhistochemische Markierung von Monozyten /Makrophagen in einer Nierenbiopsie einer chronischen Transplantatdysfunktion.*

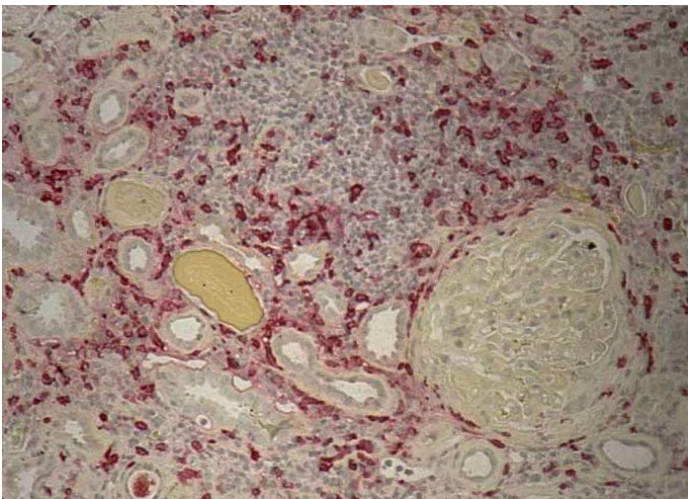


Abbildung 56:

*Immunhistochemische Markierung von Monozyten /Makrophagen in einer Nierenbiopsie einer chronischen Transplantatdysfunktion.*

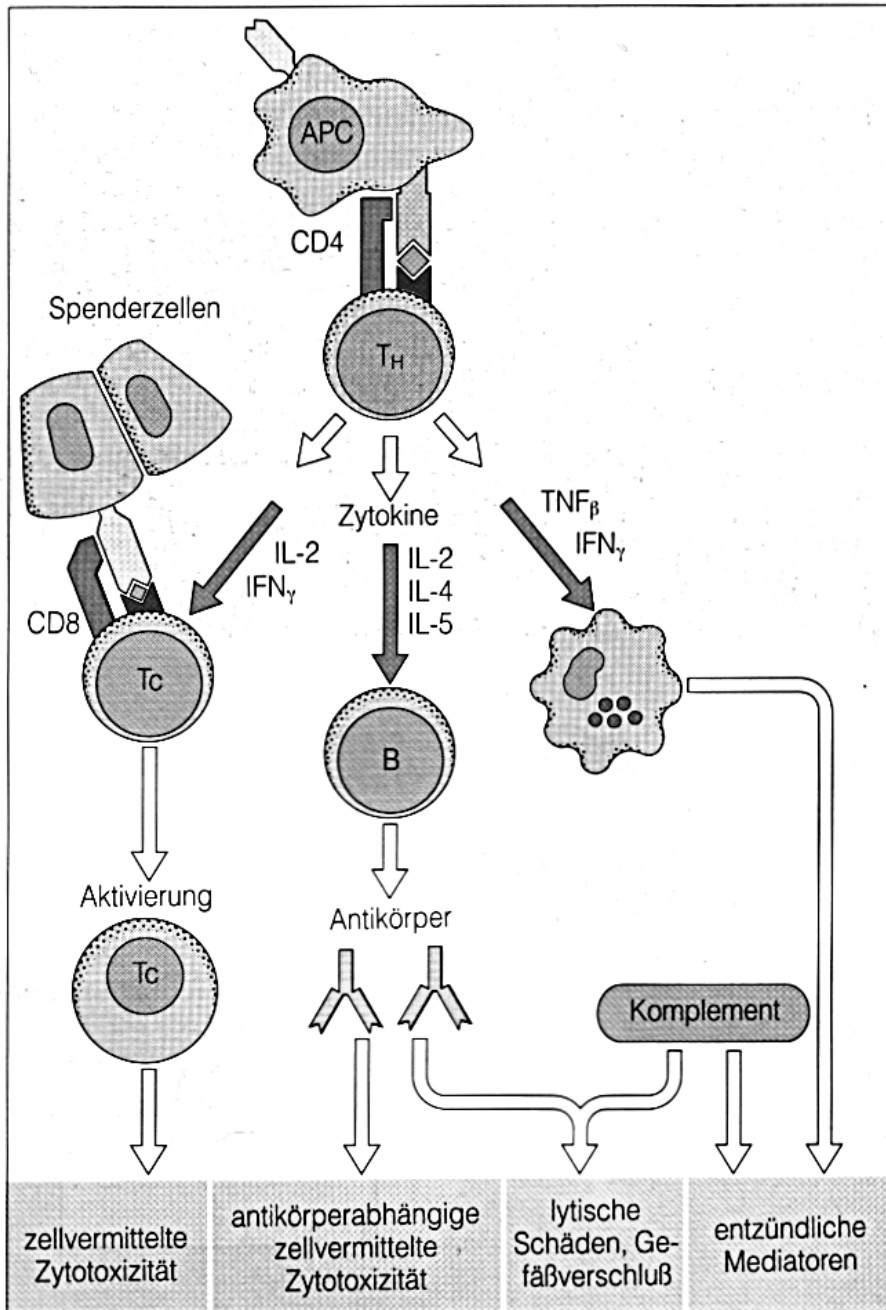


Abbildung 57

Immunologische Komponenten der chronischen Transplantat-Abstoßung. T-Helferzellen werden durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) zur Freisetzung von Lymphokinen stimuliert. IL-2 und IFN<sub>γ</sub> werden für die Aktivierung der T-zytotoxischen Zellen (T<sub>c</sub>) benötigt; IL-2, IL-4 und IL-5 sind an der Aktivierung von B-Zellen beteiligt; ein Gemisch aus TNF<sub>β</sub> und IFN<sub>γ</sub> agiert als makrophagenaktivierender Faktor (MAF). Diese Zellen stoßen das Transplantat entweder durch spezifische zellvermittelte, durch antikörpervermittelte immunologische Reaktionswege oder durch unspezifische entzündliche („Mikroinflammation“) Reaktionen ab. (aus Ivan M. Roitt, Jonathan Brostoff, David K. Male; Kurzes Lehrbuch der Immunologie; Thieme-Verlag; Stuttgart; Vol. 3; 1995)

Die Expression des Monozyten-chemotaktischen-Protein-1 (MCP-1) ist bei einer akuten Transplantatabstoßung in proximalen Tubuluszellen erhöht und wird vermehrt im Harn ausgeschieden. Die erhöhte MCP-1 Expression im Gewebe korreliert mit der Anzahl infiltrierender/ proliferierender Monozyten [Grandaliano et al. 1997; Grau et al. 2000]. Während einer akuten Transplantat-Abstoßung befinden sich im Harn auch vermehrt CD4-positive Helferzellen, CD8-positive Suppressorzellen und Monozyten/Makrophagen, die CD 14 exprimieren. Interessanterweise ist die Verteilung von Lymphozyten und Monozyten im Harn vergleichbar mit der Verteilung dieser immunkompetenten Zellen in einer Transplantat-Biopsie bei Akut-Abstoßung [Grunewald et al. 2000]. Die Anwesenheit CD14-positiver Monozyten in der Transplantat-Biopsie durch Feinnadel-Aspiration ist Hinweis für eine akute nekrotisierende oder für eine steroid-resistente Abstoßungsreaktion [Oliveira et al. 1997]. Die Anzahl dieser Monozyten korreliert mit dem „globalem“ Parenchymschaden [Rossmann et al. 1998]. Somit kann die Zahl CD14-positiver Zellen im Transplantatgewebe als ein unabhängiger immunhistochemischer Marker für die akute aber auch chronische progrediente Abstoßungsreaktion gewertet werden [Dooper et al.1994].

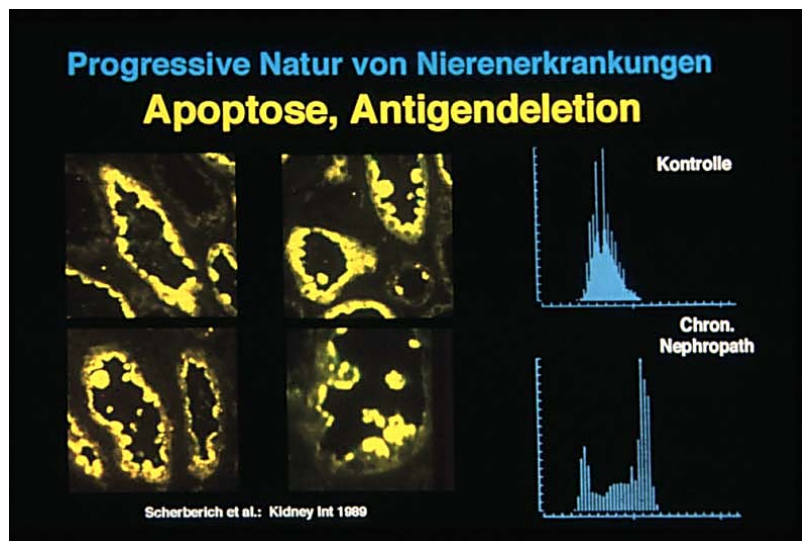


Abbildung 58:

*Verlust nierenspezifischer Membranantigene durch Apoptose tubulärer Epithelzellen („mikrovilläres shedding“) bei quantitativer Auswertung (in der „image-analyses“). Es kommt gegenüber gesunden Kontrollnieren (s.o.) zu einer Verbreiterung und Desintegration der Tubulusepithelzellen an Hand der spezifischen Dichtemarkierung (Immunfluoreszenz) im Nierengewebe. Diese Gewebeschädigung geht Hand in Hand mit der Invasion proentzündlicher Monozyten, durch die erhöhte Expression von HLA-DR auf Nierenepithelzellen. HLA-DR exprimierende Tubulusepithelzellen bilden vermehrt Chemokine wie MCP-1 und RANTES, die aktiv Makrophagen adherieren und die chronische Transplantatabstoßung induzieren (aus Scherberich JE; Wolf G; Albers C; Nowack A; Stuckhardt C; Schoeppe W; Glomerular and tubular membrane antigens reflecting cellular adaptation in human renal failure. Kidney Int Suppl 1989 Nov; 27:S38-51; 1989)*

Zusammenfassend ergibt sich: Monozyten/ Makrophagen spielen nicht nur bei der akuten Abstoßung, sondern auch bei der chronischen Nierentransplantatabstoßung (sog. Transplantatdysfunktion“) eine wichtige pathophysiologische Rolle: eine erhebliche Akkumulation von Monozyten/ Makrophagen (CD14, CD14+/16++, CD68) im Transplantat-Biopsat wird als Indikator für eine nachfolgende chronisch progrediente Abstoßungsreaktion interpretiert [Pilmore et al. 2000]. Die Plasma-Konzentration des Chemokins MCP-1 ist erhöht [Corsi et al. 1999].

### 12.2.2 Interpretation unserer Ergebnisse

Nierentransplantierte hatten signifikant höhere Kreatininkonzentrationen im Serum als gesunde Kontrollpersonen, signifikant niedrigere mCD14-Expression und signifikant höhere Anteile an CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten. Nicht signifikant verändert waren die Leukozytenzahlen und der CRP-Spiegel. Eine mögliche Mikroinflammation, ausgelöst durch das Fremd-Organ, lässt sich also nicht durch Routine-Parameter wie Leukozyten oder CRP beschreiben. Die mCD14-Expression und die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten als Parameter zum „biologischen Monitoring“ scheinen gegenüber dem CRP und den Leukozyten entscheidende Vorteile zu besitzen, denn sie sind wesentlich sensitiver.

Nierentransplantierte, die von uns untersucht wurden, hatten keine Hinweise auf akute Abstoßungsreaktionen. Daher konnten wir keine Aussagen über das Verhalten der mCD14-Expression und der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten machen. Denkbar ist jedoch, dass die mCD14-Expression und die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten bei einer akuten Transplantat-Abstoßungsreaktion früher ansteigen als die weniger sensitiven Routine-Parameter. Klinische Studien hierzu stehen noch aus.



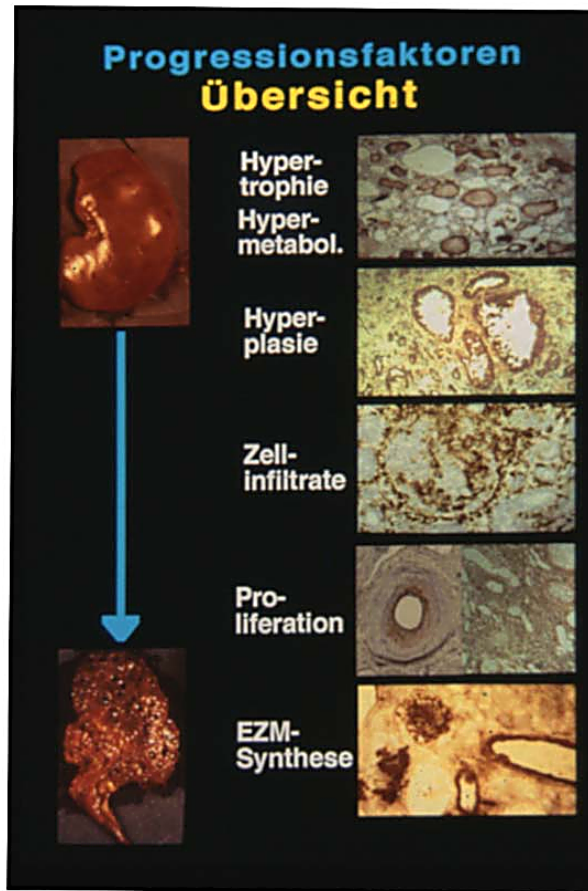


Abbildung 59

Progressionsfaktoren für die Entwicklung einer Niereninsuffizienz einschließlich der chronischen Transplantatabstoßung (Transplantatdysfunktion) [nach Scherberich. J.E., Nockher W.A.; Blood monocyte phenotypes and soluble endotoxin receptor CD14 in systemic inflammatory diseases and patients with chronic **renal** failure. Nephrol Dial Transplant (England), 2000]

### 12.3 Grundlagen zum Mycophenolat-Mofetil (*Cell Cept<sup>®</sup>*)

Bisher zeigte kein konventionelles Immunsuppressivum Präferenz für die alleinige Unterdrückung der Antikörpersynthese durch B-Zellen. Vor wenigen Jahren wurde mit Mycophenolat Mofetil (MMF) ein derartiges Präparat auf den Markt gebracht [Smith et al. 1998].

Der Wirkmechanismus von Mycophenolat beruht auf einer nicht-kompetitiven, reversiblen Hemmung der Inosin-5-monophosphat-Dehydrogenase. Dies führt intrazellulär zu einer Verminderung von Guanodin-Phosphaten bei einem gleichzeitigen Überwiegen von Adenosin-Phosphaten. Diese hemmen die de-novo-Purin-Synthese. Proliferierende B- und T-Lymphozyten sind aber abhängig von der de-novo-Synthese, denn sie können keinen Wiederverwertungs-Stoffwechsel nutzen. Damit erklärt sich die selektive Hemmung der DNA-Synthese in Lymphozyten durch MMF [Vanrenterghem 1997; Hauser et Sterzel 1999; Hood et Zarembski 1997]. Parallel dazu wird die Apoptose gesteigert, die Zellproliferation gehemmt und der Zellzyklus in der s-Phase arretiert [Cohn et al. 1999]. Ein metabolischer Nebeneffekt des Guanodinmangels durch MMF ist der verminderte Transfers von Mannose und Fucose an membranständige lymphozytäre Glycoproteine des VLA-4 und LFA-1 Typs. Durch diesen Effekt vermutet man, dass MMF die Wanderung von Leukozyten an den Ort der „Entzündung“ verhindern kann [Laurent et al. 1996]. Blaheta et al. [1997] konnten nachweisen, dass MMF nicht nur modulierend auf lymphozytärer, sondern auch auf endothelialer Ebene eingreift. So ist in Endothelien unter MMF die IL-1 induzierte E-Selektin-Synthese reduziert, während die IL-1 induzierte ICAM-1 und VCAM-1-Synthese vergleichsweise schwach blockiert wird. Offensichtlich greift MMF zu einem späten Zeitpunkt in der IL-1 getriggerten Signalkaskade ein, so dass gezielt die E-Selektin-Synthese unterbunden wird, nicht jedoch weitere IL-1 abhängige Prozesse. Auf lymphozytärer Seite hemmt MMF die LFA-1-ICAM-1 Interaktion und die Bindung von VLA-4 an seinen Liganden VCAM-1. Der Kontakt von sLeX mit E-Selektin wird nicht beeinflusst. MMF moduliert das Immunsystem auf unterschiedlichen Ebenen: 1. auf der Ebene der Zellproliferation und 2. auf der Ebene der Zellinfiltration.

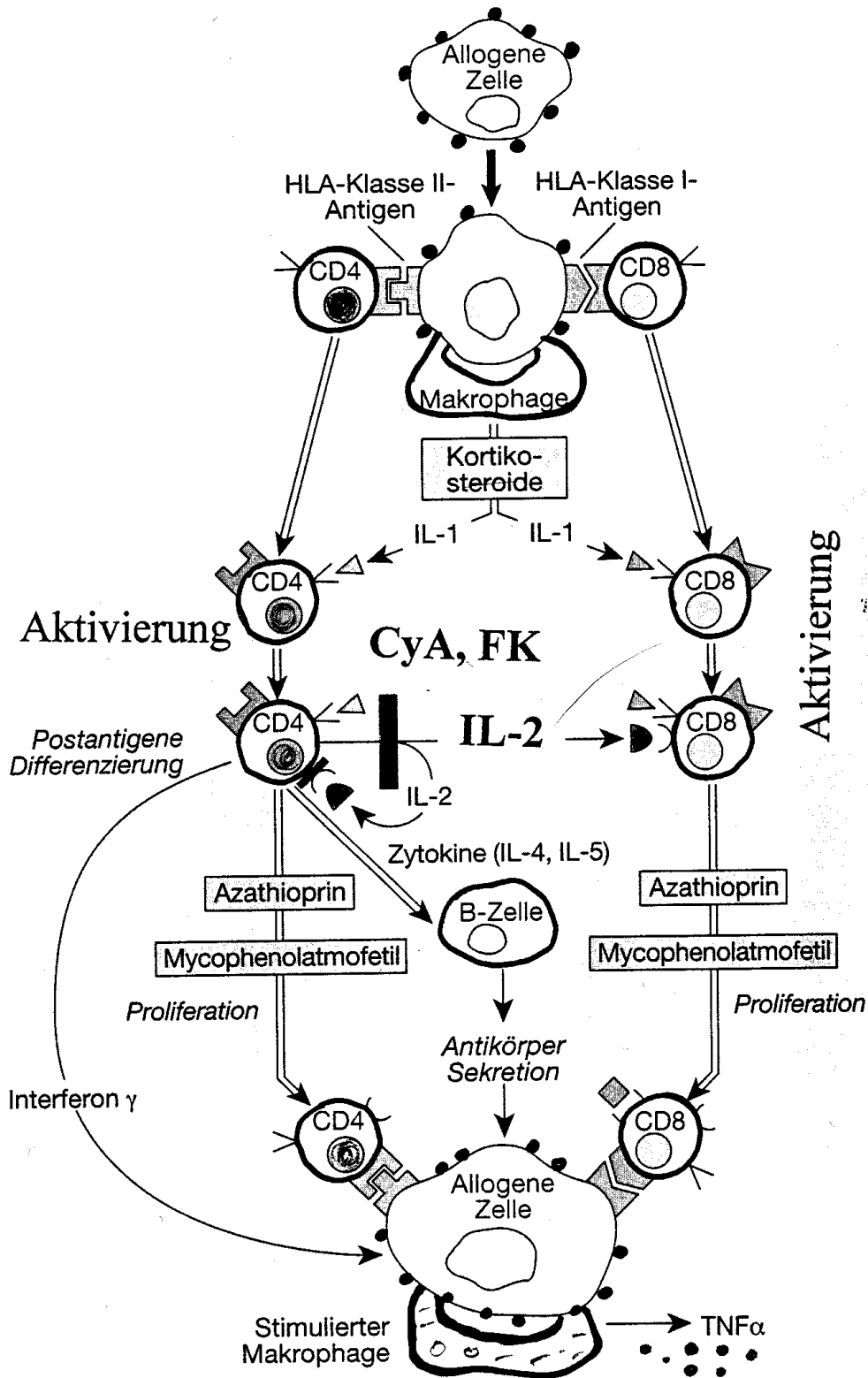


Abbildung 60:

Immunkaskade und die Angriffsorte von MMF, CyA, Tacrolimus (FK) und der Glukokortikoide.

Klinisch bedeutsam ist die Hemmung der **Glykosilierung** von Adhäsionsmolekülen in Lympho- und Monozyten. Somit hat MMF einen deutlich suppressiven Effekt auf die **Adhäsion** von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten an allogenen Endothelzellen. Die Adhäsionsmoleküle werden durch MMF in folgender Reihenfolge herunterreguliert: E-Selektin > VCAM-1 > ICAM-1. Untersuchungen zeigten, dass MMF nicht die Bindung von Lymphozyten an E-Selektin blockiert, sondern die zelluläre Interaktion via LFA-1 oder VLA-4. Somit besitzt MMF neben seinen antiproliferativen Effekten auch infiltrationshemmende Effekte [Blaheta et al. 1997]. In vitro gelang der Nachweis, dass Mycophenolat das Wachstum glatter Muskelzellen und menschlicher Arteriolen hemmt.

Die wichtigste Nebenwirkung des Präparates ist Diarrhoe und Leukopenie. Der Vorteil von MMF ist, dass keine arterielle Hypertonie induziert wird. Außerdem ist das Präparat nicht nephrotoxisch, bei gleicher Effizienz wie Cyclosporin [Abramowicz et al. 1998; Papatheodoridis et al. 1999]. Deshalb können Patienten nach Nierentransplantation mit eingeschränkter Transplantatfunktion von der Umstellung auf MMF Monotherapie profitieren [Hauser et Sterzel 1999; Ducloux et al. 1998]. Das Toxizitätsrisiko ist vergleichbar mit dem des Azathioprin, jedoch bei erhöhter Wirksamkeit [Mathew T.H. 1998; Vanrenterghem et al. 1997]. Verwendet wird MMF zur Dauertherapie und zur Stoßtherapie bei akuter Abstoßung, meist in Kombination mit Steroiden [The mycophenolat mofetil acute renal rejection group]. MMF bietet sich auch als therapeutische Alternative bei sog. „Steroid-resistenten Akutabstoßungsreaktionen“ an [Shapiro et al. 1998].

### 12.3.1 Interpretation unserer Ergebnisse

Nierentransplantierte, die nur Mycophenolat erhielten, hatten in unserer Untersuchung nicht signifikant höhere Leukozytenzahlen als Gesunde ( $p < 0,1$ ), nicht signifikant höhere CRP-Spiegel ( $p < 0,76$ ). Dagegen waren die mCD14-Expressionen signifikant niedriger ( $p < 0,001$ ) und die Anteile an CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten signifikant erhöht ( $p < 0,004$ ).

Gegenüber den anderen – nicht MMF-monotherapierten - Nierentransplantierten waren die Leukozyten, das CRP, die mCD14-Expression und die %- CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten nicht signifikant verändert. Die MMF-Monotherapie war in unseren Analysen nicht mit höheren proinflammatorischen Entzündungszeichen gekennzeichnet als nierentransplantierte Patienten mit anderen Immunsuppressions-Regimes. In den meisten Kliniken kommt MMF insbesondere bei langjährig transplantierten und stabilen Patienten zur Anwendung. Mögliche Bedenken der geringeren Immunsuppression oder der Reaktivierung viraler Infektionskrankheiten, ließ sich in unserer Studie nicht belegen.

#### 12.4 Grundlagen zum Cyclosporin A (Sandimmun<sup>®</sup>)

Cyclosporin A ist ein cyclisches Polypeptid, das vom Pilz *Tolypocladium inflatum* gams. produziert wird. Cyclosporin A (CyA) revolutionierte in den frühen 80-er Jahren die immunsuppressive Therapie nach Organtransplantation und ist seitdem bedeutend in der Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen. Die Wirkung von CyA beruht auf der Hemmung der Interleukin-2 Produktion und dessen Freisetzung aus den T-Helfer-Zellen. Dadurch wird die Aktivierung der T-Lymphozyten gehemmt und die zelluläre Immunantwort unterdrückt. Cyclosporin bindet an sogenanntes Immunosophilin (Cyclophilin) und bindet als Komplex wiederum an Calcineurin, nachfolgend wird über mehrere Zwischenschritte die Calcium-abhängige intrazelluläre Signalübertragung zum Zellkern blockiert. Dadurch werden Bildung und Freisetzung von IL-2 in Antigen-stimulierten Zellen gehemmt. Die wichtigste Nebenwirkung dieses Medikamentes liegt in seiner Nephrotoxizität. Diese ist dosisabhängig und in der Regel nach Dosisreduktion reversibel. Die Ursache könnte in einer initialen renalen Vasokonstriktion liegen, die bei Fortbestehen zur Schädigung der Tubuli und kleinen Gefäße führt. Nachfolgend kommt es zu einem Anstieg der Retentionsparameter und zur Induktion einer Natriurese. Der Effekt der Natriurese kann durch die Gabe von L-Arginin unterdrückt werden [Andres et al. 1997]. Außerdem ist CyA

neurotoxisch was sich in Tremor, Parästhesien und Kopfschmerzen bis hin zu Krampfanfällen manifestieren [Karow T. 2000][Janeway].

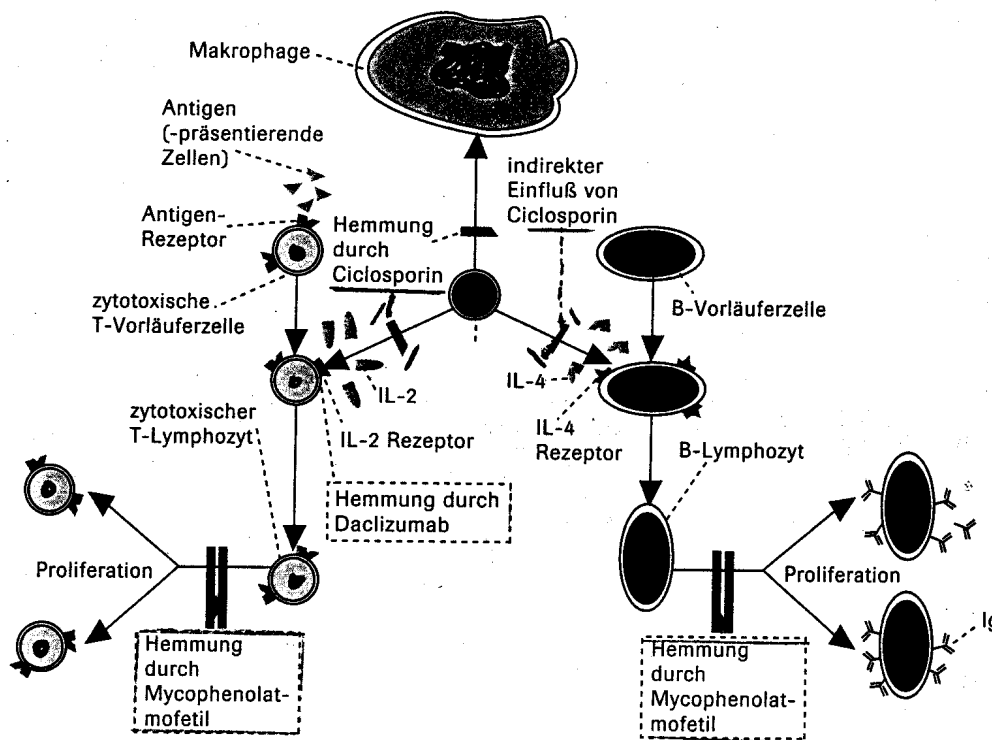


Abbildung 61:

*Angriffsorte von CyA und MMF in der Kaskade des immunologischen Netzwerks (nach Allison et al. 1993, Nadeau et al. 1996, Simmons et al. 1997)*

CyA ist in der Prävention einer Abstoßungsreaktion effektiv, jedoch zur Therapie einer akuten Abstoßung nicht geeignet. Dabei scheint die Bestimmung des Serum-Spiegels drei Stunden nach oraler Gabe von Cyclosporin während der ersten Woche am bedeutensten zu sein (peak volume, sog. „c-2 monitoring“). Dieser Wert erlaubt es wesentlich zuverlässigere Aussagen zu machen über die Wirksamkeit bei Akutabstoßung und Nephrotoxizität, als die quantitative Analyse des Tal-Spiegels [Malahati et al. 2000]. Hauser und Neumayer [1998] konnten nachweisen, dass die Behandlung von Hochrisiko-Patienten mit Tacrolimus gegenüber Cyclosporin erfolgversprechender ist. Als Risikofaktoren gelten ein bereits vorhergegangenes Ereignis einer Akutabstoßung sowie ein hohes Alter des Empfängers [Hsieh et al. 2000]. Interessant sind die Ergebnisse einer

Forschergruppe aus Japan, die zeigen konnten, dass die Anzahl akuter Nt-Abstoßungen in der Gruppe von Patienten, die ein Kadaver-Organ erhielt genauso hoch war, wie die Anzahl in der Vergleichsgruppe mit Lebend-Spenden [Ota et al. 2000].

#### 12.4.1 Interpretation unserer Ergebnisse

In unserer Untersuchung hatten die Patienten, die mit CyA monotherapiert wurden nicht signifikant höhere Leukozytenzahlen oder CRP-Spiegel als Gesunde. **Die mCD14-Expression war bei mit CyA Behandelten signifikant erniedrigt und der Anteil an CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten im Blut signifikant erhöht.**

Gegenüber Nierentransplantierten, die nicht mit CyA monotherapiert wurden, hatten diese Patienten nicht signifikant höhere Leukozytenzahlen, CRP-Spiegel oder %-Anteile an CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten. Die mCD14-Expression war ebenfalls nicht signifikant vermindert.

Diese Ergebnisse unterstreichen, dass auch Nierentransplantierte, die mit CyA-monotherapiert wurden, verstärkt proinflammatorische Marker auf zellulärem Niveau exprimieren. Die Routine-Parameter Leukozyten und CRP im Serum spiegeln diesen Hintergrund nicht genügend sensitiv wieder.

#### 12.5 Immunsuppression mit Ciclosporin A und Mycophenolat

Die Kombinationstherapie aus CyA und MMF, verglichen mit Azathioprin und CyA, bringt den Vorteil, dass unter MMF Therapie signifikant weniger Patienten akute Transplantatabstoßungsreaktion erleiden, signifikant weniger ins Krankenhaus aufgenommen werden müssen und eine 5%ige Verbesserung der 2-Jahres-Transplantat-Überlebenszeit zu verzeichnen ist [Lee et al. 1998]. Die Kombinationstherapie aus MMF

versus Placebo mit Cyclosporin und Kortikosteroiden vermindert signifikant die Zahl bioptisch gesicherter Abstoßungsreaktionen [Wiesel et Carl 1998].

### 12.5.1 Interpretation unserer Ergebnisse

In unseren Untersuchungen hatten Patienten, die mit CyA und MMF kombitherapiert wurden, nicht signifikant höhere Leukozytenzahlen und CRP-Konzentration im Serum als Gesunde. **Die mCD14-Expression von Blutmonozyten war signifikant erniedrigt. Die proinflammatorischen CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten waren dagegen signifikant erhöht.**

Gegenüber Nierentransplantierten, die nicht mit CyA und MMF kombitherapiert wurden, hatten diese Patienten (nicht signifikant) höhere Leukozytenzahlen, CRP-Spiegel, (niedrigere) mCD14-Expressionen oder %-Anteile an CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten. Tendenziell war die mCD14-Expression noch niedriger als bei den nicht mit CyA-MMF-kombitherapierten Patienten und die %-Anteile der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten noch höher.

**Die Kombinationstherapie mit CyA und MMF ist nicht in der Lage den Prozess der Mikroinflammation zu unterbinden.** Proinflammatorischen Marker auf antigenpräsentierenden Zellen waren auch hier erhöht.



## 12.6 Patienten mit Sepsis

Nierentransplantierte (unter lebenslanger Dauerimmunsuppression) sind stark infektgefährdet. Dies gilt sowohl für die Früh- wie Spätphase nach der Organübertragung. Infektionen sind eine Haupt-Todesursache von Nierentransplantierten, neben Herzkreislauferkrankungen und Malignomen.

Viele mehr oder weniger charakteristische „Symptome“ bei Infektpatienten sind unter der Immunsuppression kaschiert. Das völlig uncharakteristische Bild birgt die Gefahr einer verzögerten Diagnosestellung.

Aus diesem Grunde haben wir zusätzliche mögliche Modulationen der Immunphänotypisierung zirkulierender Blutmonozyten bei nicht-Langzeit-immunsupprimierten Patienten untersucht. Damit sollen Ausgangswerte für spätere Analysen bei Nierentransplantierten gelegt werden.

„Wir verfügen heutzutage über ein hochwirksames Arsenal an Antibiotika, wir können auf der Suche nach einem Fokus mit bildgebenden diagnostischen Verfahren jeden Bereich des menschlichen Körpers darstellen und ggf. punktieren und doch sind unsere therapeutischen Erfolge bei der Sepsis nach wie vor niederschmetternd.“ (Zitat aus „Der Internist 12/2001).

Die Letalität der schweren Sepsis liegt bei 40 bis 70 %. Die Inzidenz der Sepsis ist in den letzten Jahren sogar noch angestiegen [Brun Buisson et al. 1995]. In den USA werden jährlich 751000 Fälle mit schwerer Sepsis registriert, dies entspricht 3 Fällen pro 1000 Einwohnern [Angus et al. 2001]. Die daraus resultierenden Behandlungskosten belaufen sich auf 16,7 Milliarden US-Dollar jährlich.

Die klassische „infektiöse“ Definition der Sepsis von Schottmüller 1914 geht von einer systemischen Einschwemmung von Mikroben oder von mikrobiellen Produkten aus einem oder mehreren Foci aus. Dadurch werden viele körpereigene Mediatorsysteme aktiviert, mit der Folge

1. einer inadäquaten Gewebserfusion
2. von diffusen inflammatorischen Prozessen in großen Bereichen der Mikrozirkulation.
3. der Relaxation der glatten Muskeln in der Gefäßwand und
4. einer erhöhten Permeabilität des Endothels.

Typisch sind Perfusionsfehlverteilung, Mikrothrombosierung und „capillary leakage“ mit Flüssigkeitsextravasation in den betroffenen Gewebeprovinzen. Mikrozirkulatorische Störungen führen zu einer Sauerstoffschuld (Laktazidose, Energiedefizit) in den abhängigen organotypischen Zellen. Das Endstadium stellt das septische Multiorganversagen dar.

Zytokine sind integrierte Bestandteile in der Pathogenese bzw. im Verlauf der Sepsis. Sie können sowohl ein proinflammatorisches als auch ein antiinflammatorisches Wirkungsprofil ausüben. Entzündungsverstärkend wirken  $\text{TNF}\alpha$  und IL-1. Immunsuppressiv wirken IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- $\beta$ . Die physiologische Reaktion auf ein Infektionsereignis besteht initial in der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Durch negative Rückkopplungsmechanismen erfolgt dann eine Umschaltung zugunsten antiinflammatorischer Zytokine (s. Abbildung) [Douzinas et al. 1997].

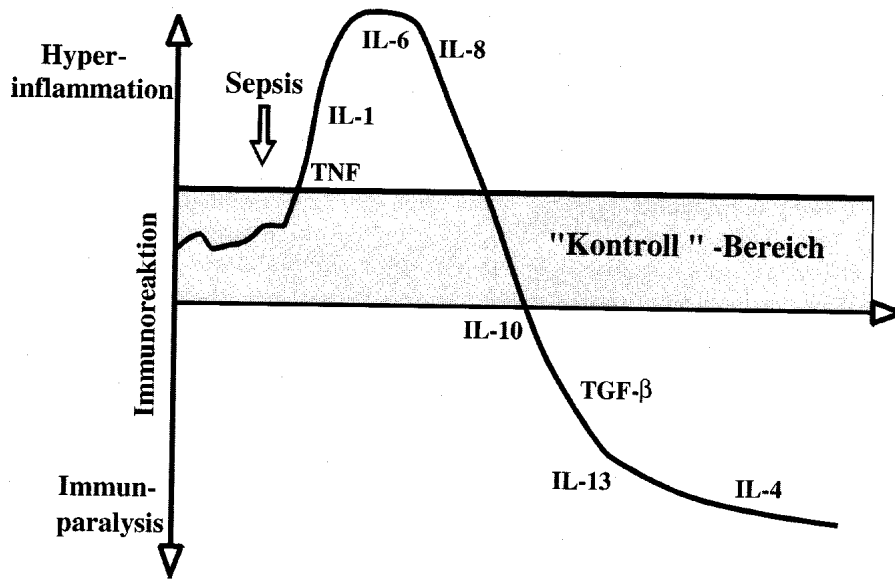


Abbildung 62

Hypothetischer Zeitverlauf der Immunreaktion bei Sepsis (aus Walmrath, D., Grimminger, F., Seeger, W. Schwere Sepsis - neue Therapieverfahren. Der Internist. 42(12): 1619-1630, 2001)

Kommt es zur Hyperinflammation, so versagen die negativen Rückkopplungsmechanismen der Interleukin-Freisetzung und es kommt zu einem „Circulus vitiosus“.

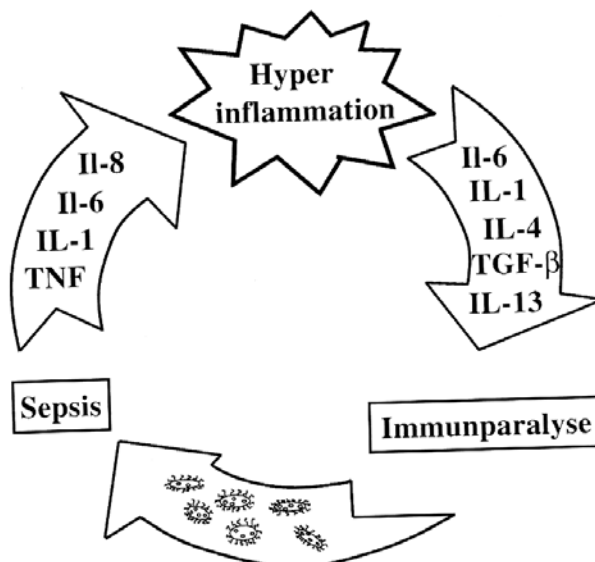


Abbildung 63

Hypothetischer Circulus vitiosus von Hyperinflammation und Immunparalyse bei protrahiert verlaufender Sepsis (aus Walmrath, D., Grimminger, F., Seeger, W. Schwere Sepsis - neue Therapieverfahren. Der Internist. 42(12): 1619-1630, 2001).

Das Wissen um die pathophysiologischen Abläufe ist noch sehr unvollständig. Zahlreiche neue Therapieansätze scheiterten regelhaft. In jüngsten Studien zeichnen sich möglicherweise neue Behandlungsoptionen ab. So ließ sich erstmals die Letalität der schweren Sepsis durch Modulation der Gerinnungsaktivierung mittels aktiviertem Protein C signifikant reduzieren [Bernard et al. 2001].

Je ausgefeilter die Therapieoptionen nach klinischer Manifestation jedoch werden, desto wichtiger wird die frühe Diagnosesicherung der Sepsis. Dieses „Monitoring“ sollte einfach, sensitiv, zeitsparend und kostengünstig sein. Kostengünstig ist die Messung der Körpertemperatur und der Leukozytenzahl, diese Methoden sind aber wenig sensitiv für die Diagnose der „schweren Sepsis“. Das C-reaktive Protein (CRP) kann zwar einfach gemessen werden, ist sensitiv für bakterielle Infekte, aber nicht aussagekräftig bei Patienten mit Lebererkrankungen und bei viralen Erkrankungen. Die CD14-Expression peripherer Blut-Monozyten kann über die FACS-Analyse schnell gemessen werden. Infektassoziierte Modulationen funktioneller monozytärer Oberflächenantigene wie z.B. CD14, CD16, HLA-DR, CD68 und andere könnten künftig wichtige Verlaufsparemeter im Gefolge der prognostischen Einschätzung einer Sepsis werden.

### 12.6.1 Interpretation unserer Ergebnisse

- *Patienten unter Immunsuppression*

Bei nierentransplantierten Patienten, die unter der üblichen immunsuppressiven Therapie standen, war die mCD14-Expression peripherer Blut-Monozyten vermindert. Da CD14 ein multifunktionaler Rezeptor unter anderem für gramnegative und grampositiver Erreger ist, kann dies die relative Immunkompetenz der Transplantatabstoßung widerspiegeln.

Der %-Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten war gegenüber Gesunden erhöht. Dies ist wahrscheinlich auf eine sog. „Mikroinflammation“ zurückzuführen, die mit für den

parechymatösen „inflammatorischen“ Umbau des Transplantates sowie der vermehrten Atheromatose verantwortlich ist. Wichtig ist hier von infektbedingter und nicht-infektbedingter Entzündung (Inflammation) zu unterscheiden. Ungeachtet einer Dauerimmunsuppression unterliegen Nierentransplantierte anhand der erhöhten Anzahl zirkulierender proinflammatorischer CD14/CD16 positiver Blutmonozyten einer chronisch entzündlichen Reaktion (Mikroinflammation). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese an späteren Organkomplikationen beteiligt ist, bzw. hierfür den Boden bereitet.

- *Patienten mit Sepsis*

Die von uns untersuchten Fieber-Patienten hatten zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Klinik signifikant erhöhte Leukozytenzahlen. Bei Entlassung waren diese noch nicht auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt und unterschieden sich immer noch signifikant von denen der Gesunden.

Das C-reaktive Protein war zum Zeitpunkt der Aufnahme der Patienten in die Klinik signifikant erhöht. Es fiel im Laufe des Klinikaufenthaltes signifikant ab.

Die mCD14-Expression war weder zum Zeitpunkt der Aufnahme noch zum Zeitpunkt der Entlassung aus der Klinik signifikant erhöht. Während des Klinikaufenthaltes stieg die Expression nicht signifikant an. Wertet man die Expression als Parameter für die immunologische Kompetenz des Patienten, so ist folgende These denkbar:

Während einer Sepsis steigt die mCD14-Expression der Monozyten an. Während der Genesung bis zum Zeitpunkt der Entlassung steigt die Expression noch weiter, denn die Halbwertszeit dieses Oberflächenmerkmals ist länger als die Zeit der Rekonvaleszenz. Gleichzeitig ist die Immunkompetenz des Patienten durch die Keime aber geschwächt, so dass die Expression abfällt. Daher steigt die Expression nicht signifikant an. Weitere Studien müssen diese These aber noch mit einer größeren Patientenzahl belegen.

---

Der %-Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten war zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Klinik signifikant höher als der der Gesunden. Dies ist zu erwarten, da CD14+/CD16++ Monozyten bessere Phagozytoseeigenschaften besitzen als CD16-negative Zellen. Bei Klinikentlassung war der Anteil wieder stark abgefallen und unterschied sich nicht mehr signifikant von den der Gesunden. Damit ist ein Marker gefunden worden, der den Verlauf einer Sepsis sehr sensitiv beschreibt, wenig störanfällig ist und zeitnah reagiert.

## 12.7 Kasuistiken (Infekt-Patienten)

Um die mögliche klinische Bedeutung von CD 14<sup>low</sup>16<sup>high</sup>-Monozyten während Entzündungsreaktionen zu untersuchen, beobachtete ich den Verlauf der Gesamt-Leukozyten, des C-reaktiven Proteins, der mCD14-Expression und der 14<sup>low</sup>16<sup>high</sup> – Monozyten während der Krankheitsphasen.

### 12.7.1 Kasuistik Harnwegsinfektion

- *Anamnese*

Die stationäre Aufnahme der 85-jährigen Frau H. erfolgte auf Grund eines seit etwa zwei Tagen bestehenden hochfieberhaften Infektes sowie einer Tachykardie von bis zu 170 S/min. Die Patientin selbst konnte bei der Aufnahme nur ungenaue Angaben über Art und Beginn ihrer Krankheit machen. Fremdanamnestisch wurde ein insulinpflichtiger Diabetes mellitus Typ II, biventrikuläre Herzinsuffizienz bei hypertensiver Herzerkrankung bei arterieller Hypertonie und kombiniertem Mitralvitium, Z. n. Beckenringfraktur sowie Z. n. transitorischer ischämischer Attacke erhoben.

- *Klinischer Aufnahmebefund*

Auffallend waren bei der Patientin in reduziertem Allgemeinzustand, die aber zeitlich und örtlich orientiert war, bei der Aufnahmeuntersuchung ein unregelmäßiger Puls (~100/min), auskultatorisch im Anschluss an kompensatorische Pausen 2/6-Systolikum mit Punktum maximum über P. Erb, auffallend livid-rötliche Wangen, weiche Bauchdecke aber kugelig vorgewölbter Unterbauch, kein Druckschmerz, keine Resistenz, rege Peristaltik, außerdem nicht tastbare distale arterielle Fußpulse.

- *Klinisch-chemische Befunde*

Bei Aufnahme CRP 17,7 mg/dl, zunächst Anstieg auf 21,2 mg/dl, unter Antibiose deutlicher Rückgang auf 0,6 mg/dl. Leukozyten zunächst 18600/μl, Kreatinin 1,9 mg/dl,

Harnstoff 92 mg/dl, Harnsäure 9,0 mg/dl, Die übrigen bestimmten Routineparameter im Normbereich. Blutkulturergebnis positiv mit *E. coli* (Cefotaxim-sensibel).

- *Ergänzende Untersuchungen*

EKG: Tachyarrhythmia absoluta, HF 130-160/min, ST-Streckensenkungen V4-V6, R-Reduktion V1-V4. Kontroll-EKGs mit unverändertem Bild bei deutlich langsameren Frequenzen.

Röntgen-Thorax: Verbreiterung der Herzsilhouette vorwiegend nach links, leichte pulmonale Stauung, infiltrationsverdächtige Zeichnung in der kaudalen Auffächerung des rechten Hilus, beidseits Kuppenschwielen, elongierte und sklerosierte Aorta, deutliche Entkalkungen der Knochenstrukturen.

Farbkodierte Ultraschallkardiographie: Linker und rechter Vorhof deutlich erweitert, linker Ventrikel eher klein, linke Ventrikelwand konzentrisch mäßig verdickt, Aortenklappe unauffällig, Mitralling deutlich verkalkt mit Einbeziehung des hinteren Mitralsegels und geringer Stenose, kein Perikarderguss.

Abdomen-Sonographie: Harnblase maximal gefüllt (ca. 1,5 l).

Sonographie nach Entfernung des Dauerkatheters ergibt deutliche Restharnbildung von Volumina über 500 ml.

Urologisches Konsil: V.a. hypotone Blase bei Diabetes mellitus, Restharn 700 ml, trüb. Dauerkatheter erforderlich.

- *Verlauf*

In der **Blutkultur** fanden sich **E. coli-Bakterien**. Als ursächlich für die Bakteriämie wurde ein Harnwegsinfekt bei Überlaufblase diagnostiziert. Unter Ableitung des Harns über einen Blasenkateter sowie unter einer Therapie mit Spizef i. v. zeigte sich rasch eine



Besserung der Symptomatik. Das Fieber und die serologischen Entzündungsparameter Leukozyten und CRP waren rückläufig. Die bei der Aufnahme erhöhten Nierenretentionswerte waren bei Entlassung unauffällig. Nach fünf Tagen Gabe von Spizef entwickelte die Patientin ein Ganzkörpersexanthem, so dass die antibiotische Therapie abgebrochen wurde und die Patientin nur symptomatisch weiterbehandelt wurde. Nach probeweiser Entfernung des Blasenkatheters bildeten sich rasch wieder Restharnvolumina von mehr als 500 ml sowie erneut ein signifikanter bakterieller Kulturbefund im Harn. Im urologischem Konsil wurde der V.a. hypotone Blase bei Diabetes mellitus (Polyneuropahie) gestellt.

Die bei Entlassung immer noch erhöhten Entzündungszeichen gingen z. T. auch auf ein Ulcus an der linken Ferse zurück.

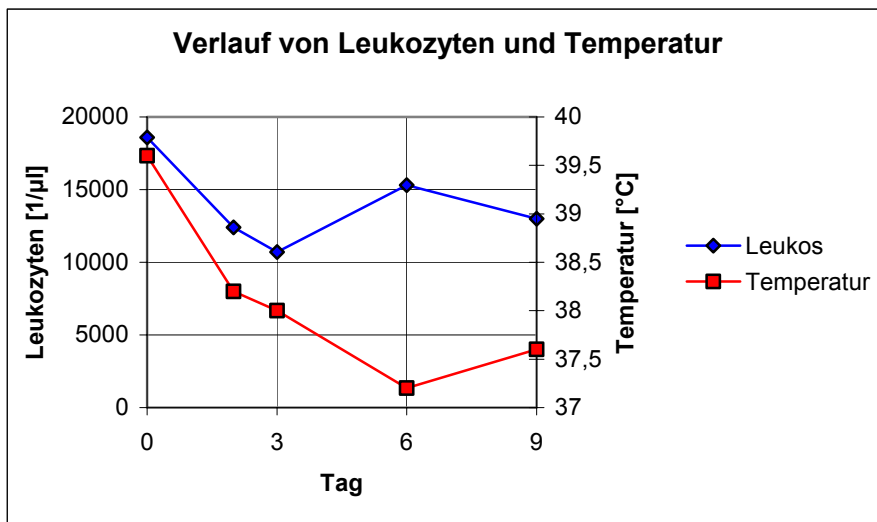


Abbildung 64:

Verlauf von **Temperatur und Leukozytenzahlen** im peripheren Blut während einer fieberhaften Harnwegsinfektion und positiver Blutkultur (*E.coli*). Bei Klinikeinweisung hatte die Patientin Fieber (39,6°C) und eine Leukozytose von 19000/µl. Während der Ausheilung der Sepsis unter Antibiose fiel das Fieber am dritten Tag unter 38°C mit einem Minimum am 6.Tag nach Aufnahme. Die Leukozyten fielen bis zum dritten Tag auf 11000/µl und stiegen dann aber bis zum 6. Aufnahmetag wieder auf 15500/µl um danach wieder abzufallen.

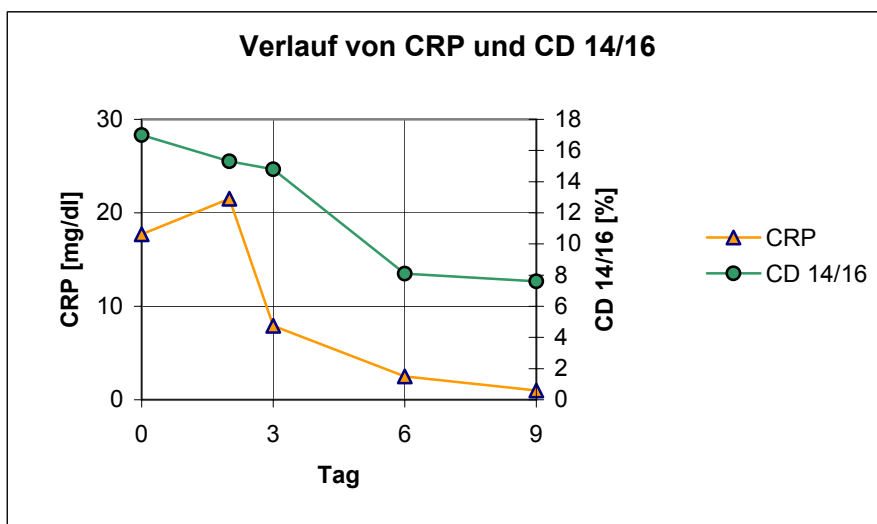


Abbildung 65:

Verlauf des c-reaktiven Proteins (CRP) im Serum und der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten im Blut während einer fieberhaften Harnwegsinfektion: Das CRP war bei Aufnahme in die Klinik deutlich erhöht, wobei das Maximum erst am 2. post-Aufnahmetag erreicht wurde. Danach fiel das CRP kontinuierlich ab. Der %-Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten war bei Aufnahme in die Klinik deutlich erhöht, nahm bis zum 3. post-Aufnahmetag nur wenig ab und fiel danach so stark ab, dass am 6. post-Aufnahmetag Normwerte erreicht wurden.

- *Interpretation:*

Der Verlauf der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten entsprach am ehesten der Körpertemperaturkurve. Obwohl die Patientin am 5. Tag ein Ganzkörperexanthem entwickelte, spiegelte sich dies nicht im CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten-Anteil und in der Körpertemperatur wieder, wohl aber in der Leukozytenzahl. Entsprechend könnte man interpretieren, dass die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten die Sepsis besser beschreiben als die Gesamtleukozytenzahlen. Die Leukozyten stiegen auch während des Exanthems an, obwohl die Patientin sich klinisch von der septischen Harnwegsinfektion erholte.

### 12.7.2 Kasuistik Pneumonie

- *Anamnese*

Die stationäre Aufnahme des 61-jährigen Herrn B. erfolgte wegen eines hochfieberhaften Infektes mit Temperaturen bis 40°C und deutlichem Krankheitsgefühl und Atemnot. Bei Herrn B. bestand seit vielen Jahren eine Gammopathie IgM leichte Kette Kappa, die bei wiederholten Kontrollen weder eine Zunahme des Gesamt-IgM gezeigt hatte, noch andere Zeichen für ein therapiepflichtiges Immunozytom. Die bei dem Patienten vorbestehende mäßiggradige Niereninsuffizienz (Kreatinin 1,8 mg/dl) wurde auf eine „Nephrosklerose“ bei arterieller Hypertonie zurückgeführt. Außerdem war eine Sigmadivertikulose und eine Polyposis coli mit mehrfacher Polypektomie bekannt.

- *Klinischer Aufnahmebefund*

Der Patient ist bei Aufnahme wach, voll orientiert, Temperatur 39 Grad, Puls regelmäßig, 62 / min, arterieller Blutdruck 160/80 mmHg. Die Atmung ist seitengleich, linksbasale feuchte Rasselgeräusche, keine Spastik.

- *Klinisch-chemische Befunde*

Auffällig waren bei der Aufnahme folgende Laborparameter: Natrium 121 mMol/l, Chlorid 95 mMol/l, Kreatinin 5,0 mg/dl, Harnstoff 128 mg/dl, Harnsäure 9,2 mg/dl, Eiweiß gesamt 6,0 g/dl, Albumin 2,8 g/dl, CRP 23,4 mg/dl, GOT 19 U/l, GPT 41 U/l, Gamma-GT 150 U/l, AP 470 U/l, Cholinesterase 2122 U/l, Alpha-1-Glob. 6,2 rel.%, alpha-2- 13,0 rel%, beta-Glob. 9,8 rel%, gamma-Gob. 14,4 %, fraglicher M-Gradient in der Gammafraktion. Leukozyten 15200/µl, Linksverschiebung, Erythrozyten, 3,2 Hb 9,1, Hkt 28%, Proteinurie 2,7 g/24h, Urineiweißdifferenzierung: gemischt glomeruläre und tubuläre Proteinurie, kein Hinweis für relevante Paraproteinurie.

Harnsediment: Eiweiß +++, vereinzelt Leukozyten, vereinzelt hyaline und granulierte Zylinder, keine Erythrozytenzylinder, Procalcitonin 2,6 ng/l. Immunglobuline quantitativ: IgG 510 mg/dl, IgA 84 mg/dl, IgM 226 mg/dl.

Immunfixation des Serums: monoklonale Gammopathie vom IgM-Kappa Typ.

Bakteriologie des Bronchialsekretes: mäßig viele Enterokokken.

Die übrigen Laborparameter lagen im Normbereich.

- *Ergänzende Untersuchungen*

Im Röntgen-Thorax Herz gering linksverbreitert, geringe Stauung, Infiltrat linksbasal (siehe Abbildung). Kontroll-Thorax am dritten stationären Tag deutlich größer, linksbasaler Erguß, Stauungszeichen eher deutlicher ausgebildet.

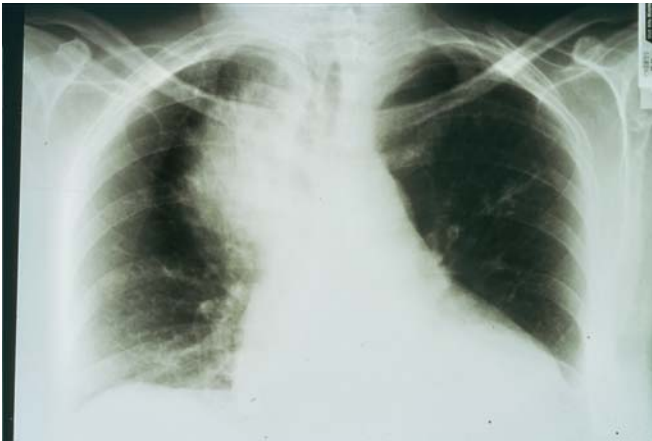


Abbildung 66: Röntgen-Thorax in a.p. Aufnahme: Herz gering linksverbreitert, geringe Stauung, Infiltrat linksbasal.



Abbildung 67: seitliche Röntgen-Thorax Aufnahme

Im Pleurapunktat ließen sich reichlich mesotheliale Zellen mit deutlicher Proliferation und gering unspezifischen entzündlichen Veränderungen nachweisen. Die bakteriologischen Untersuchungen waren negativ. Unauffällig waren EKG, UKG, Duplexsonographie der Hals-/Kopfarterien und Abdomen-Sonogramm.

- *Verlauf*

In der Lunge des Patienten B. zeigte sich zunächst trotz antibiotischer Therapie mit i.v. Cephalosporin eine Zunahme der linksseitigen Infiltration und weiter anhaltende Fieberschübe. Auch nach Umsetzen auf Erythromycin ergab sich keine wesentliche Besserung. Am 11. stationären Tag wurde nach Erhalt der bronchoskopisch gewonnenen Bakteriologie (mäßig viele Enterokokken) auf Tazobaktam umgestellt. Zusätzlich bekam der Patient wegen Nachweis von mäßig viel Candida im Sputum Fluconazol. Der klinische Zustand des Patienten besserte sich, auch radiologisch lockerte sich das linksseitige Lungeninfiltrat auf. Die bereits bei Aufnahme deutlich eingeschränkte Nierenfunktion besserte sich unter der Infektbehandlung langsam, Hinweise für eine eigenständige neu aufgetretene Nierenerkrankung oder für ein immunologisches Geschehen fanden sich nicht. Insbesondere ergab sich auch kein Hinweis für eine Veränderung der bekannten Paraproteinämie oder die Entwicklung einer Kryoglobulinämie.

Am 20. stationären Tag entwickelte der Patient ein Exanthem am ganzen Körper mit Juckreiz, d.h. das klassische Bild einer medikamentös-allergischen Reaktion. Nach Absetzen von Tazobactam bildete sich der Ausschlag langsam zurück, bei Entlassung war der Patient vollständig beschwerdefrei. Die passagere, im Rahmen der deutlich eingeschränkten Nierenfunktion aufgetretene pulmonale Stauung bildete sich bis zur Entlassung vollständig zurück.

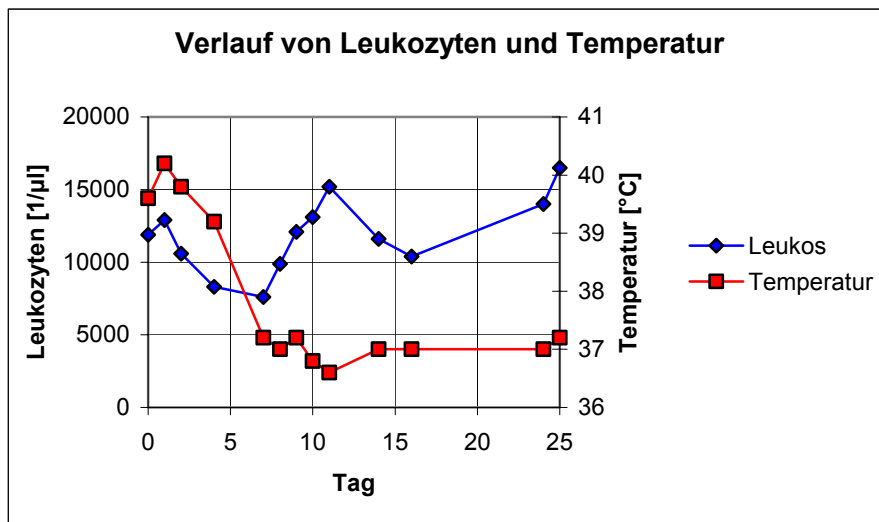


Abbildung 68:

**Verlauf von Temperatur und Leukozytenzahlen im peripheren Blut während einer Pneumonie:** Der Patient hatte bei Klinikaufnahme hohes Fieber, das sich bis zum 6. post-Aufnahmetag zurückbildete. Die Leukozytenanzahl lag bei Aufnahme mit 14000/µl deutlich über der Norm, sank bis zum 7. post-Aufnahmetag, um dann wieder auf bis zu 15000/µl anzusteigen. Bei Entlassung des Patienten in klinisch deutlich gebesserten Zustand waren die Leukozyten auf 16500/µl erhöht.

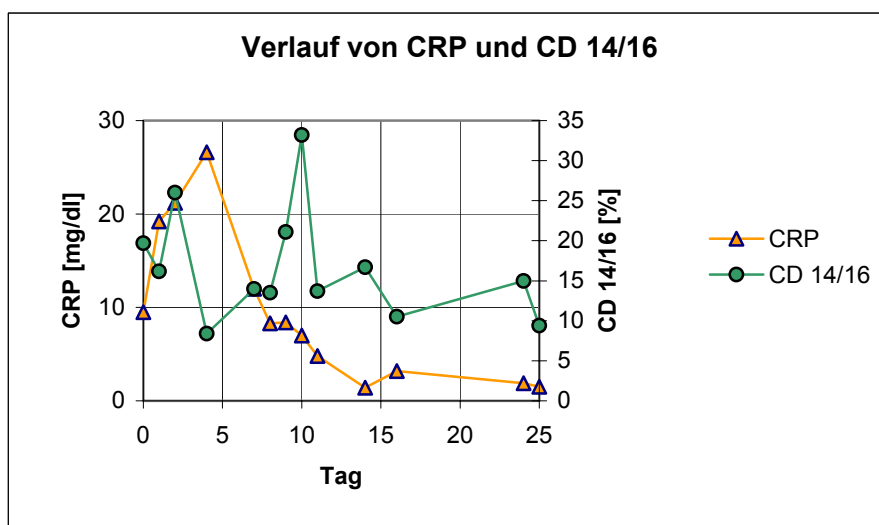


Abbildung 69:

**Verlauf des c-reaktiven Proteins (CRP) und der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten während einer Pneumonie:** Das CRP war bei Aufnahme in die Klinik deutlich erhöht, stieg bis zum 4. post-Aufnahmetag weiter an um dann bis zum 14. post-Aufnahmetag Normwerte zu erreichen. Der %-Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten war bei Aufnahme erhöht, das Maximum wurde am 10. post-Aufnahmetag erreicht.



- *Interpretation:*

Der prozentuale Verlauf der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten spiegelte den Verlauf der Sepsis wieder. Bis zum 10. post-Aufnahmetag war die antibiotische Therapie noch nicht optimiert, die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten stiegen deshalb wieder an. Nachdem das Antibiotikum geändert wurde, fielen die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten deutlich ab. Der Patient entwickelte am 20. stationären Tag ein Exanthem, parallel fand sich eine Leukozytose von 15000/ $\mu$ l. Die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten stiegen dagegen nicht an. Somit konnte man auch hier die CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten als klinisch mit der Grunderkrankung besser reflektierenden Parameter zur Verlaufskontrolle der Infektionserkrankung verwenden.

### 12.7.3 Kasuistik Harnwegsinfektion

- *Anamnese*

Die stationäre Aufnahme der 82-jährigen Frau D. erfolgte wegen eines unklaren kollaptischen Zustandes ohne Bewusstseinsverlust, ohne Urinabgang oder Zungenbiss. Dabei hatte die Patientin leicht Übelkeit mit einmaligem Erbrechen bemerkt. In den Tagen zuvor hatte Frau D. bereits Pollakis-/ und Dysurie sowie mehrfache Nykturie bemerkt. Außerdem waren bereits Schwindel, leichte Übelkeit und allgemeine Schwäche aufgefallen.

Anamnestisch lag des weiteren ein (diätetisch behandelter) Diabetes mellitus Typ II, ein Apoplex vor zwei Jahren, sowie rezidivierende fokale zerebrale Anfälle im Anschluss an den Schlaganfall vor.

- *Klinischer Aufnahmebefund*

Patientin in reduziertem Allgemeinzustand, bewusstseinsklar, insgesamt verlangsamt. Über der Lunge fand sich ein gering verschärftes Atemgeräusch rechts basal, keine Rasselgeräusche. Im neurologischen Status deutlich verlangsamte und verwaschene Sprache, kein Meningismus, Pupillen bei Zustand nach Cataract-Operation isokor. Patellarsehnenreflex beidseits nicht auslösbar, grobe Kraft im rechten Arm etwas vermindert (vereinbar mit dem Apoplex vor zwei Jahren). Restliche Untersuchungsergebnisse insgesamt unauffällig.

- *klinisch-chemische Befunde*

Pathologisch waren bei Aufnahme: CRP 18,6 mg/dl (Normwert < 0,6 mg/dl), gamma-GT 19 U/l, im Blutbild 13900/μl Leukozyten, im Differentialblutbild 73% Neutrophile, 13 % Lymphozyten, 11 % Monozyten.

Im Urinstatus massenhaft Leukozyten, signifikante Bakteriurie > 100000 KBE. In der Urinkultur Nachweis von E. coli und Enterokokken.

- *Ergänzende Untersuchungen*

EKG und Echokardiographie zeigten Zeichen eines alten Myokardinfarktes über der Vorderwand (pathologisches Q in den Ableitungen III, aVF und V1-V5, sowie präterminale T-Negativierung in V1-V2).

Im Röntgen-Thorax Herz gering links verbreitert. Aortenelongation und -sklerose. Im Abdomen-Sonogramm alle Oberbauchorgane insgesamt unauffällig, jedoch nach Miktion eine Restharnbildung von ca. 200 ml.

- *Verlauf*

Zunächst erfolgte die Antibiose mit Ofloxacin, hier allerdings nur mäßiger Erfolg. Nach Umsetzen der Therapie gemäß Antibiogramm auf Ampicillin / Sulbactam besserten sich die Infektzeichen rasch.

Der Kreislaufkollaps wurde als Folge des Infektes gedeutet, für einen erneuten zerebralen Krampfanfall ergab sich kein Hinweis.

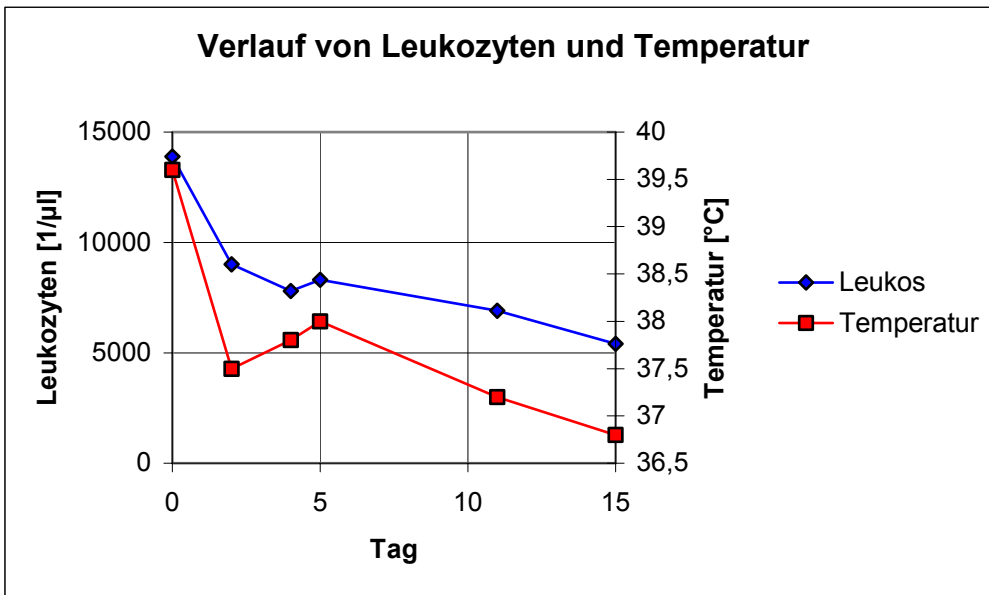


Abbildung 70:

Verlauf von **Temperatur und Leukozytenzahlen** im peripheren Blut während einer Harnwegsinfektion: Bei Aufnahme hatte die Patientin hohes Fieber. Dieses fiel in den ersten Tagen rasch auf unter 38°C. Die Leukozytenzahl war bei Aufnahme deutlich erhöht und fiel in den ersten Tagen nach antibiotischer Therapie auf unter 10000/µl ab.

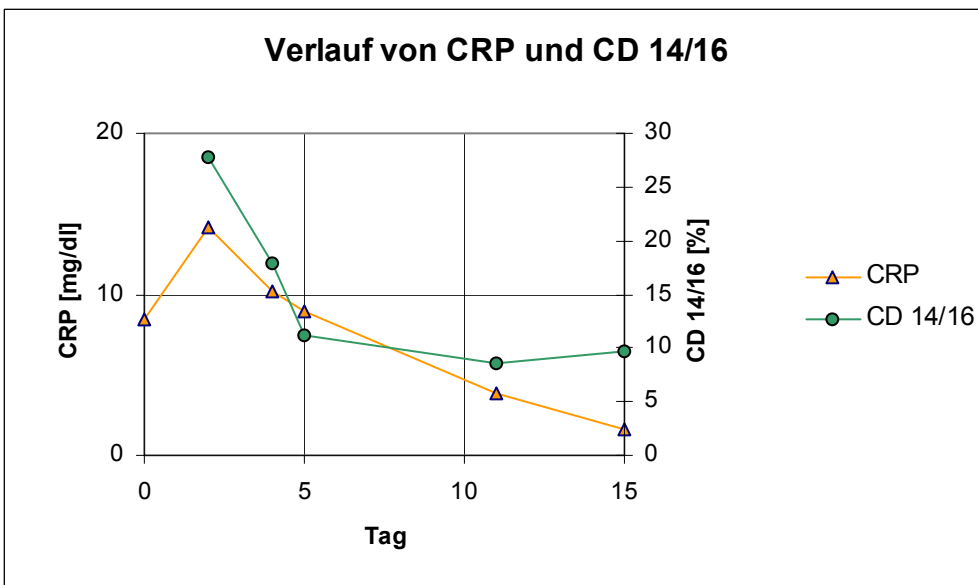


Abbildung 71:

Verlauf des **c-reaktiven Proteins (CRP)** und der **CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten** während einer Harnwegsinfektion: Bei Aufnahme hatte die Patientin deutlich erhöhte CRP-Serumkonzentrationen und %-Anteile der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten. Beide Parameter fielen nach antibiotischer Therapie rasch auf Normwerte ab.

- *Interpretation*

Der Verlauf der %-Anteile der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten beschreibt die Erholung von der Sepsis auch in diesem Fall sehr gut.

#### 12.7.4 Kasuistik: Pneumonie bei Morbus Wegener

- *Anamnese*

Die stationäre Aufnahme der 65 Jährigen Frau U. erfolgte unter dem Bild eines bronchialen Infektes mit Brechdurchfällen.

Bei der 65-jährigen Patientin war seit 11 Jahren eine pararheumatische Systemerkrankung (Systemische Vaskulitis), nämlich ein behandlungsbedürftiger c-ANCA positiver Morbus Wegener bekannt. Zuletzt wurde die Patientin immunsuppressiv mit Prednisolon (5 mg/die) therapiert. Außerdem litt die Patientin unter einer chronisch kompensierten Niereninsuffizienz bei Nephrosklerose durch arterielle Hypertonie in Zusammenwirken mit der Organbeteiligung bei Grunderkrankung Morbus Wegener. Bekannt war auch intermittierendes Vorhofflimmern.

- *klinischer Aufnahmebefund*

Die Patientin befand sich in reduziertem Allgemeinzustand. Insbesondere fielen eine deutliche Ruhe-Dyspnoe auf. Puls regelmäßig mit 80 Schlägen/ Minute, RR 150/70 mmHg., keine Ödeme, jedoch Lippenzyanose bei geringster Belastung. Über der Lunge Vesikuläratmen und zentrale Rasselgeräusche auskultierbar. Herztöne leise, atemüberlagert, nicht sicher beurteilbar. Bei der orientierend neurologischen Untersuchung fielen eine allgemeine Schwäche und Unsicherheit auf. Die übrigen Untersuchungsergebnisse waren unauffällig.

- *klinisch-chemische Befunde*

Pathologische Befunde bei Aufnahme: Natrium 126 mmol/l, Chlorid 89 mg/dl, anorg. Phosphat 2,0 mmol/l, Albumin 2,9 g/dl (Norm >3,5), CRP 44,0 mg/dl (Norm <0,6), Harnsäure 9,6 mg/dl, Harnstoff 122 mg/dl, Kreatinin 3,7 mg/dl, GOT 27 U/l, GPT 38 U/l, Gamma-GT 158 U/l, AP 233 U/l, LDH 375 U/l, P-Amylase 93 U/l, in der Eiweißelektrophorese Albumin 40,5 rel.%,  $\alpha$ 1- 8,4 rel.%,  $\alpha$ 2- 26,6 rel.%,  $\beta$ - 14,7 rel.% und  $\gamma$ -Globuline 9,8 rel.%. Hk 36,9%, im Differentialblutbild 97% Neutrophile, 1% Lymphozyten sowie 1% Monozyten. Die restlichen Laborwerte insgesamt unauffällig (Leukozyten 9800/ $\mu$ l).

weitere Laboruntersuchungen: c-ANCA-Titer 1:20, p-ANCA 5IU/ml, c-ANCA (PR3) 2 IU/ml.

- *Ergänzende Untersuchungen*

Im Röntgen-Thorax fiel ein ausgedehntes, paramediastinal lokalisiertes Infiltrat im rechten Oberlappen auf, diese Veränderungen waren auch im durchgeführten Thorax-CT nachweisbar (siehe Abbildungen) Kein Erguss, kein Zeichen einer Überwässerung.

Im HNO-Konsil: Borken der Nasenschleimhaut, vereinbar mit Beteiligung des Morbus Wegener.



Abbildung 72 :

*Röntgen-Thorax a.p.Aufnahme: deutlich sichtbar die diffusen Verschattungen und das paramediastinal sitzendes Infiltrat im rechten Oberlappen. (Grunderkrankung = M. Wegener)*



Abbildung 73:

*seitliches Röntgen-Thorax: diffuse Verschattungen im Oberfeld und posterobasal. (Grunderkrankung = M. Wegener). Weitere Bildgebung siehe CT-Bilder.*



Abbildung 74:

*CT-Thorax, pneumonische Infiltrate der rechten Lunge (M. Wegener)*



Abbildung 75:

*CT-Thorax pneumonische Infiltrate der rechten Lunge (M. Wegener)*



Abbildung 76:



---

*CT-Thorax pneumonische Infiltrate der rechten Lunge (M. Wegener)*

- *Verlauf*

Wegen des dringenden Verdachts auf eine Pneumonie erfolgte zunächst i.v. eine Antibiose mit Piperacillin / Tazobactam, *hierunter* zeigten sich jedoch weiter *steigende* Entzündungszeichen und eine deutliche Verschlechterung der Nierenparameter bis hin zum akuten, oligoanurischen Nierenversagen (Kreatinin bis 7,1 mg/dl, Harnstoff bis 223 mg/dl am 3 stationären Tag) mit Akutdialysen über einen Shaldon-Katheter.

Zu diesem Zeitpunkt entschlossen wir uns unter der Annahme einer möglichen Reaktivierung der systemischen Vaskulitis (Morbus Wegener) am dritten stationären Tag zu einer erneuten Bolustherapie mit 700 mg *Cyclophosphamid* und insgesamt 1250 mg *Prednisolon* i.v.. Die im Anschluss hieran aufgetretene Leukopenie mit 700/µl hat sich unter Neupogengabe rasch *normalisiert*. Im weiteren Verlauf zeigten sich dann deutlich *abfallende Entzündungszeichen* und eine weitgehende Erholung der Nierenfunktion unter zusätzlich erweiterter Antibiose mit Piperacillin/ Tazobactam, Metronidazol und Fluconazol.

Bei der Entlassung nach 27 Tagen war jegliche antibiotische Therapie beendet, das CRP im Serum lag anhaltend unter 1,5 mg/dl. Zur Dauermedikation wurden täglich 15 mg Prednisolon verordnet.

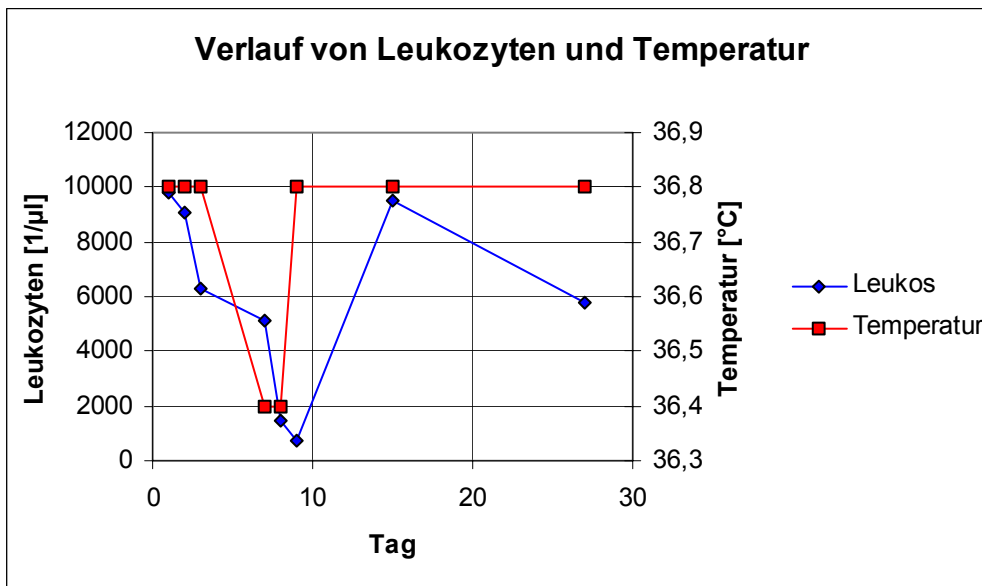


Abbildung 77:

Verlauf von **Temperatur und Leukozytenzahlen** im peripheren Blut während einer Pneumonie bei Morbus Wegener: Die Patientin entwickelte während ihres pneumonischen Infiltrates kein Fieber. Die Leukozytenzahlen waren bei Aufnahme nicht erhöht. Bis zum 8. stationären Tag entwickelte die Patientin eine deutliche Leukopenie, die etwa vier Tage anhält.

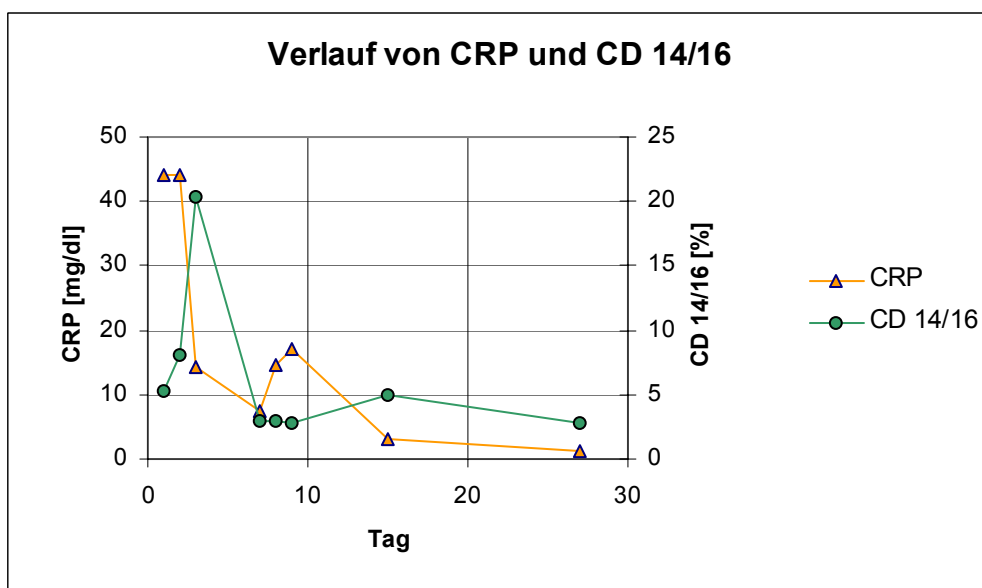


Abbildung 78:

Verlauf des **C-reaktiven Proteins (CRP)** und der **CD14<sup>low</sup> CD16<sup>high</sup>-Monozyten im Vollblut** während einer „Pneumonie“ bei Morbus Wegener. Das CRP war bei Aufnahme stark erhöht und fiel in den ersten Tagen ab; Normwerte wurden erst am 13. Aufnahmetag erreicht. Der %-Anteil der CD14<sup>low</sup> CD16<sup>high</sup>-Monozyten war bei Aufnahme erhöht, stieg dann bis zum 3. stationären Tag weiter an und fiel schon am 8. Tag auf Normwerte ab.

- *Interpretation*

Bei Patienten mit Morbus Wegener und einer Pneumonie ist die Identifikation des „genauesten“ Entzündungs-Parameters besonders schwierig. Dies deshalb, da das pneumonische Infiltrat nicht unbedingt einer „bakteriellen“ Pneumonie, also einer infektiösen Erkrankung entsprechen muss: auch eine Rekurrenz der systemischen Vaskulitis (Vaskulitis der Lunge) kam differentialdiagnostisch in Frage. Die Leukozytenzahlen waren nicht aussagekräftig, denn sie fielen medikamentös bedingt auf sehr niedrige Werte ab, was aber nicht mit der Genesung von der Pneumonie verwechselt werden darf. Erhöhte Körpertemperaturen entwickelte diese (immunsupprimierte) Patientin nicht. Die %-Anteile der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten stiegen bis zur Dialysebehandlung deutlich an. Danach fielen sie auf unter 10% ab, so dass man dies auf das Ansprechen auf die antibiotische Therapie zurückführen könnte. Somit war die Bestimmung der %-Anteile der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>-Monozyten auch in diesem Falle in der Verlaufsbeobachtung hilfreich.

### 12.7.5 Oberflächenmarker auf Monozyten

Zusammenfassend seien die wichtigsten Oberflächenmarker auf menschlichen Monozyten aufgeführt:

MFR: An den Mannosyl-Fucosyl-Rezeptor werden die Zucker der Mikroorganismen gebunden.

CD14-Rezeptor: 55 kDalton großer Rezeptor, der spezifisch den Komplex aus Lipopolysaccharid und lipopolysaccharidbindendes Protein, das normalerweise im Serum vorhanden ist und gramnegative Bakterien umhüllt.

Fc $\gamma$ RI (CD 64): hoch-affiner, 72 kD schwerer Fc $\gamma$ -Rezeptor, der eine Makrophagenaktivierung induziert und Phagozytoseeigenschaften besitzt [Abbas]. Bindet IgG3 > IgG1 > IgG4 >>> IgG2.

Fc $\gamma$ RII (CD 32): 40 kD großer Rezeptor mit mittlerer Affinität für aggregiertes IgG, bedeutsam für die „feedback“-Hemmung von B-Lymphozyten

Fc $\gamma$ RIII (CD16): 50-80 kD großer Fc-Rezeptor mit niedriger Affinität, kann NK-Zellen aktivieren und vermittelt damit Phagozytose und antikörperabhängige Zytotoxizität.

Komplementrezeptor CR1 (CD 35): 250 kD schwerer Komplementrezeptor, der Bindung und Aufnahme von C3b und C4b opsonierten Partikeln und Immunkomplexen induziert und bei der Phagozytose beteiligt ist.

Komplementrezeptor CR3: ( $\alpha^M$ -Untereinheit entspricht CD 11b): 170 kD schwer, bindet CD54, die Komplementkomponente C3b sowie extrazelluläre Matrixmoleküle und vermittelt deren Phagozytose.

## Literatur:

- Abramowicz, D., Broeders, N., Wissing, M., Sternon, J. Mycophenolate mofetil. *Rev. Med. Brux.* 19(3): 139-143, 1998
- Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol. Rev. (Denmark)*. 136: 5-28, 1993
- Andres, A., Morales, J.M., Praga, M., Campo, C., Lahera, V., Garcia-Robles, R., Rodicio, J.L., Ruilope, L.M. L-arginine reverses the antinatriuretic effect of cyclosporin in renal transplant patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 12(7): 1437-1440, 1997
- Angus D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., Pinsky, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit.Care Med.* 29: 1303-1310, 2001
- Baer, P.C., Gauer, S., Hauser, I.A., Scherberich, J.E., Geiger, H. Effects of mycophenolic acid on human renal proximal and distal tubular cells in vitro. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15(2): 184-190, 2000
- Bernard, G.R., Vincent, J.L., Laterre, P.F. Efficacy and safety of recombinant human activated protein c for severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 344: 699-709, 2001
- Blaheta, R.A., Wittig, B., Leckel, K., Scholz, M., Weber, S., Kronenberger, B., Auth, M., Encke, A., Markus, B.H. Untersuchungen zur infiltrationshemmenden Eigenschaften von Mycophenolat Mofetil (CellCept®). *Transplantationsmedizin*, 9(3): 128-131, 1997
- Brun-Buisson, C., Doyon, F., Carlet, J. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA* 274: 968-974, 1995
- Cohn, R.G., Mirkovich, A., Dunlap, B., Burton, P., Chiu, S.H., Eugui, E., Caulfield, J.P. Mycophenolic acid increases apoptosis, lysosomes and lipid droplets in human lymphoid and monocytic cell lines. *Transplantation.* 68(3): 411-418, 1999
- Corsi, M.M., Leone, G., Fulgenzi, A., Wasserman, K., Leone, F., Ferrero, M.E. RANTES and MCP-1 chemokine plasma levels in chronic renal transplant dysfunction and chronic renal failure. *Clin. BioChem.* 32(6): 455-460, 1999
- Deppisch, R.M., Beck, w., Goehl, H., Ritz, E. Complement components as uremic toxins and their potential role as mediators of microinflammation. *Kidney Int. Suppl.* 78: 271-277, 2001
- Dooper, I.M., Hoitsma, A.J., Maass, C.N., Assmann, K.J., Tax, W.J., Koene, R.A., Bogman, M.J. The extend of peritubular CD14 staining in renal allografts as an

- independent immunohistological marker for acute rejection. *Transplantation*. 58(7): 820-827, 1994
- Douzinas, E.E., Tsidamiadou, P.D., Pitaridis, M.T., Adrianakis, I., Roussos, C., The regional production of cytokines and lactate in sepsis-related multiple organ failure. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 155: 53-59, 1997
  - Ducloux, D., Fournier, V., Bresson-Vautrin, C., Rebibou, J.M., Billerey, C., Saint-Hillier, Y., Chalopin, J.M. Mycophenolat mofetil in renal transplant recipients with cyclosporine-associated nephrotoxicity: a preliminary report. *Transplantation* 65(11): 1504-1506, 1998
  - Grandaliano, G., Gesualdo, L., Ranieri, E., Monno, R., Stallone, G., Schena, F.P. Monocyte chemotactic peptide-1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection. *Transplantation*, 63(3): 414-420, 1997
  - Grau, V., Gemsa, D., Steiniger, B., Gam, H. Chemokine expression during acute rejection of rat kidneys. *Scand. J. Immunol.* 51(5): 435-440, 2000
  - Grau, V., Herbstz, B., Steiniger, B. Dynamics of monocytes/macrophages and T lymphocytes in acutely rejecting rat renal allografts. *Cell tissue Res.* 291(1): 117-126, 1998
  - Grunewald, R.W., Fiedler, G.M., Stock, B., Grunewald, J.M., Muller, G.A. Immunocytological determination of lymphocytes and monocytes/macrophages in urinary sediments of renal allografts recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15(6): 888-892, 2000
  - Hauser, I.A., Neumayer, H.N. Tacrolimus and cyclosporine efficacy in high-risk kidney transplantation. European Multicentre Tacrolimus (FK506) Renal Study Group. *Transplant. Int. Suppl.* 1: 73-77, 1998
  - Hauser, I.A., Sterzel, R.B. Mycophenolat mofetil: therapeutic applications in kidney transplantation and immune-mediated renal disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 8(1): 1-6, 1999
  - Hood, K.A., Zarembski, D.G. Mycophenolat mofetil, a unique immunosuppressive agent. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 54(3): 285-294, 1997
  - Hsieh, H.H., Chien, Y.S., Hsu, K.T., Chung, H.M., Huang, H.F. Risk factors for renal allograft survival in patients receiving cyclosporine immunosuppression. *J. Formos. Med. Assoc.* 99(6): 453-458, 2000
  - Karow, T., Lang, R. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie.*, F. Hansen, 2000
  - Kaysen, G.A. The microinflammatory state in uremia: causes and potential consequences. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12(7): 1549- 1557, 2001
  - Laurent, A.F., Dumont, S., Poindron, P., Muller, C.D. Mycophenolic acid suppresses protein N-linked glycosylation in human monocytes and their adhesion to endothelial cells and to some substrates. *Exp. Hematol.* 24: 59-67, 1996

- Lee, C.M., Markezich, A.J., Scandling, J.D., Dafoe, D.C., Alfrey, E.J. Outcome in cadaveric renal transplant recipients treated with cyclosporine A and mycophenolate mofetil versus cyclosporine A and azathioprine. *J. Surg. Res.* 76(2): 131-136, 1998
- Mahalati, K., Belitsky, p., West, K., Kiberd, B., MacDonald, A., McAlister, V., Lawen, J. A 3-hour postdose cyclosporine level during the first week after kidney transplantation predicts acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity more accurately than trough levels. *Transplant. Proc.* 32(4): 786-787, 2000
- Mathew, T.H. A blinded, long-term, randomized multicenter study of mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation: results at three years. Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group, *Transplantation*, 65(11): 1450-1454, 1998
- Nadeau KC, Azuma H, Tilney NL. Sequential cytokine expression in renal allografts in rats immunosuppressed with maintenance cyclosporine or mycophenolate mofetil. *Transplantation* 62(9): 1363-1366, 1996
- Oliveira, J.G., Xavier, P., Neto, S., Mendes, A.A., Guerra, L.E. Monocytes-macrophages and cytokines/chemokines in fine-needle aspiration biopsy cultures: enhanced interleukin-1 receptor antagonist synthesis in rejection-free kidney transplant patients. *Transplantation* 63(12): 1751-1756, 1997
- Ota, K., Takahashi, K., Uchida, K., Takahara, S., Yagisawa, T., Tanabe, K. A 10-year follow-up study of renal transplant recipients treated with cyclosporine. Japanese Cyclosporine Kidney Transplant Study Group. *Clin. Nephrol.* 53(3): 182-187, 2000
- Papatheodoridis, G.V., O'Beirne, J., Mistry, P., Davidson, B., Rolles, K., Burroughs, A.K. Mycophenolate mofetil monotherapy in stable liver transplantation patients with cyclosporine-induced renal impairment: a preliminary report. *Transplantation* 68(1): 155-157, 1999
- Pilmore, H.L., Painter, D.M., Bishop, G.A., McCaughan, G.W., Eris, J.M. Early up-regulation of macrophages and myofibroblasts: a new marker for development of chronic renal allografts rejection. *Transplantation* 69(12): 2658-2662, 2000
- Roitt I.M., Brostoff J, Male D.K.; *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*; Thieme-Verlag; Stuttgart; Vol. 3 neubearbeitet, S. 326; 1995
- Rossmann, P., Jirka, J., Matousovic, K. Immunohistochemistry of a biopsy of an allotransplanted kidney. *Cas. Lek. Cesk.* 137(24): 757-762, 1998
- Scherberich JE; Wolf G; Albers C; Nowack A; Stuckhardt C; Schoeppe W; Glomerular and tubular membrane antigens reflecting cellular adaptation in human renal failure. *Kidney Int Suppl* 1989 Nov; 27:S38-51; 1989
- Scherberich, J.E., Nockher, W.A., CD14++ monocytes, CD14+/CD16\*\* subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and

monitoring immunosuppressive therapy. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37(3): 209-213, 1999

- Schwedler, S. Schinzel, R., Vaith, P., Wanner, C. Inflammation and advanced glycation end products in uremia: simple coexistence, potentiation or causal relationship? *Kidney Int. Suppl.* 78: 32-36, 2001
- Shapiro, R., Jordan, M.L., Scantlebury, V.P., Vivas, C., Gritsch, H.A., Casavilla, F.A., McCauley, J., Johnston, J.R., Randhawa, P., Irish, W., Hakala, T.R., Fung, J.J., Starzl, T.E. A prospective, randomized trial to compare tacrolimus and prednisone with and without mycophenolate mofetil in patients undergoing renal transplantation: first report. *J.Urol.* 160(6Pt1): 1982-1985, 1998
- Simmons W.D., Rayhill S.C., Sollinger H.W. Preliminary risk-benefit assessment of mycophenolate mofetil in transplant rejection. *Drug Saf.* 17(2): 75-92, 1997
- Smith, K.G.C., Isbel, N.M., Catton, M.G., Leydon, J.A., Becker, G.J., Walker, R.G. Suppression of the humoral immune response by mycophenolat mofetil. *Nephrol. Dial. Transplant.* 13: 160-164, 1998
- Vanrenterghem, Y. The use of Mycophenolat Mofetil (Cellcept) in renal transplantation. *Nephron.* 76(4): 392-399, 1997
- Vos, I.H., Govers, R., Grone, H.J., Kleij, L., Schurink, M., De Weger, R.A., Goldschmeding, R., Rabelink, T.J. NfkappaB decoy oligodeoxynucleotides reduce monocyte infiltration in renal allografts. *FASEB J.* 14(5): 815-822, 2000
- Walmrath, D., Grimminger, F., Seeger, W. Schwere Sepsis - neue Therapieverfahren. *Der Internist.* 42(12): 1619-1630, 2001
- Wiesel, M., Carl, S. A placebo controlled study of mycophenolate mofetil used in combination with cyclosporine and corticosteroids for the prevention of acute rejection in renal allograft recipients: 1-year results. The European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. *J. Urol.* 158(1): 28-33, 1998



## 13 Zusammenfassung

### **Monozytäre Expression von CD 14 („Endotoxin-Rezeptor“) und proinflammatorische Subpopulationen Antigen-präsentierender Leukozyten**

Durchflusszytometrische Analysen bei Gesunden, Patienten mit chronischem Nierenversagen, Patienten nach Nierentransplantation sowie Patienten mit infektiösen Komplikationen

Von Heidi Estner, München 2002

#### 13.1 Fragestellung

Um mögliche proinflammatorische Zeichen bzw. Frühindikatoren (sog. **Mikroinflammation**) bei Patienten mit chronischem Nierenversagen und nierentransplantierten Patienten aufzuspüren, die an späteren Organkomplikationen (chronische Transplantatdysfunktion, Herz-Kreislaufmorbidity, endotheliale Dysfunktion, Infektanfälligkeiten) beteiligt sein können, untersuchten wir die Expression funktioneller monozytärer Oberflächenantigene.

Als immunologischen Marker der Aktivität einer Entzündungsreaktion verglichen wir die in der Durchflusszytometrie (**fluorescence-activated cell sorter (FACS)**) gemessene Expression sog. mCD14-Rezeptoren und der CD14+CD16++-Rezeptoren auf peripheren Blut-Monozyten mit serologischen Parametern wie C-reaktives Protein und Leukozytenzahl.

Die Frage, ob die beiden Oberflächenantigene CD14 und CD16 sowie die Koexpression beider Antigene (proinflammatorisch aktivierte Monozyten) zum „immunologischen Monitoring“ geeignet sind, sollte erstmalig klinisch an Gesunden, Patienten nach Nierentransplantation sowie Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Endstadium ohne Dialysebehandlung untersucht werden. Ergänzend wurden nicht-organtransplantierte Patienten mit akuten infektiösen Komplikationen auf mögliche Modulationen proinflammatorischer Blutmonozyten (CD14+/CD16++-Zellen) hin untersucht.

**CD14** existiert membrangebunden (mCD14) und in löslicher Form (sCD14) und ist verantwortlich für die Interaktion von Endotoxin (LPS) mit Monozyten und Neutrophilen.

LPS ist ein Glykoprotein der äußeren Membranschicht gramnegativer Bakterien. CD14 ist der wichtigste Rezeptor für gram-negative bakterielle Lipopolysaccharide (Endotoxin), jedoch auch für Peptidoglykan und Lipoteichonsäure gram-positiver Erreger.

**CD 16** ist der funktionell wichtige  $Fc\gamma$ -Rezeptor Typ III ( $Fc\gamma RIII$ , IgG-Rezeptor Typ III), der mit niedriger Affinität monomeres IgG sowie polymeres IgG oder Immunkomplexe bindet. Er vermittelt wichtige immunphysiologische Funktionen wie antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, Beseitigung zirkulierender Immunkomplexe, Superoxidbildung und ist auch an der Signaltransduktion beteiligt.

Die untersuchten **CD14+CD16++-Monozyten** bewirken im Zusammenwirken von  $TNF\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-10 bewirkt eine stärkere Entzündungsreaktion als die konventionellen CD14++CD16negativen-Zellen; sie sind sehr potente Antigen-präsentierende Zellen, besitzen eine hohe Phagozytoseaktivität und verstärken die endotheliale Adhäsion.

### 13.2 Untersuchungsaufbau

Wir untersuchten 69 Patienten nach Nierentransplantation (23 Frauen, 46 Männer) im Alter von durchschnittlich 52,63 +/- 11,42 Jahren (Median 53,84 Jahre). Die Patienten erhielten durchschnittlich vor 6,38 +/- 5,2 Jahren ein Nieren- Transplantat (Median 8,16 Jahre). Wir unterschieden diese Patienten hinsichtlich ihrer Immunsuppression in folgende Gruppen: 1) Mycophenolat-Mofetil-Monotherapie (MMFmono), 2) Cyclosporin-Monotherapie (CyAmono) und 3) einer Kombination aus MMF und CyA (MMF-CyA-kombi). In die Gruppe mit MMF-Monotherapie wurden 16 Personen eingeschlossen (3 Frauen, 13 Männer) im Alter von durchschnittlich 51,29 +/- 10,47 Jahren (Median 51,15 Jahre). In der Gruppe der CyA-monotherapierten Patienten befanden sich 11 Personen (3 Frauen, 8 Männer) im Durchschnittsalter von 58,43 +/- 8,01 Jahren (Median 59,96 Jahre). Zur Gruppe der MMF-CyA-kombinationstherapierten Patienten gehörten 18 Patienten (3 Frauen, 15 Männer) im Alter von 46,69 +/- 10,22 Jahren (Median 47,44 Jahre).

Des Weiteren wurden 13 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (12 Männer, eine Frau) im Alter von 32 bis 74 Jahren (Median 65,0 Jahre; Mittelwert 63,5 Jahre +/- 10,3 Jahre) in die Analysen miteinbezogen.

Parallel wurden 8 Patienten (6 Frauen, 2 Männer) im Verlauf einer akuten Infektion erfasst (Mittelwert 74,6 +/- 10,53 Jahre; Median 78 Jahre).

Unser Kontrollkollektiv bestand aus 18 klinisch gesunden freiwilligen Probanden im Alter zwischen 24 und 54 Jahren (Median 31 Jahre; Mittelwert 33,42 +/- 9,91 Jahre; 10 Frauen, 8 Männer).

### 13.3 Ergebnisse

1. Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz hatten signifikant höhere **CRP-Serumkonzentrationen** als Gesunde ( $p=0,010$ )(Gesunde 0,33 mg/dl vs. Urämiker 0,7 mg/dl).
2. Die **mCD14-Expression** auf peripheren Blutmonozyten war bei Urämikern ( $p=0,024$ ) und bei nierentransplantierten Patienten ( $p=0,026$ ) signifikant niedriger als bei Gesunden.(Gesunde 517 MFI vs. Urämiker 426 MFI vs. NTX 433 MFI)
3. Der prozentuale Anteil **CD14+CD16++-Monozyten** im Blut war sowohl bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ( $p=0,00000487$ ; MFI= 13,0%) als auch bei Patienten nach Nierentransplantation ( $p=0,00298$ ; MFI=9,3%) signifikant höher.
4. Die Leukozytenzahl im Blut war weder bei immunsupprimierten Nierentransplantierten noch bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Endstadium signifikant gegenüber Gesunden verändert.
5. Hinsichtlich der verschiedenen Strategien der immunsuppressiven Therapie ließen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen der MMF-mono, der CyA-mono und der MMF-CyA-kombi-behandelten Nt-Patienten feststellen.
6. Die Absolutzahl CD14+CD16++-Monozyten war sowohl bei urämischen Patienten ( $p=0,003$ ; 430/ $\mu$ l) als auch bei nierentransplantierten Patienten ( $p=0,005$ ; 413/ $\mu$ l) gegenüber Gesunden signifikant erhöht.
7. Bei Nierentransplantierten fiel die CRP-Konzentration im Serum mit steigendem Alter des Transplantates logarithmisch ab ( $p=0,065$ ), die mCD14-Expression fiel linear ab ( $p=0,063$ ) wohingegen der prozentuale Anteil der CD14+CD16++-Monozyten invers ansteigt ( $p=0,0036$ ).
8. Im Verlauf akuter infektiöser Erkrankungen war der Anteil der CD14+CD16++-Monozyten signifikant höher als bei Gesunden ( $p=0,000049$ ) und fiel bis zur stationären Entlassung so signifikant ab ( $p=0,012$ ), so dass kein Unterschied mehr zwischen Gesunden und Kranken mehr nachweisbar war.

### 13.4 Schlußfolgerungen

1. Sowohl bei Patienten mit **chronischer Niereninsuffizienz** wie bei **Nierentransplantierten** finden sich anhand **erhöhter** Zahlen proinflammatorischer Blutmonozyten (CD14+CD16++-Phänotyp) eindeutig Zeichen einer sog.

„Mikroinflammation“; dies ausdrücklich auch bei NTX-Patienten, obwohl diese unter einer dauerhaften immunsuppressiven Behandlung stehen.

2. Proinflammatorische Blutmonozyten sind Ziel- und Effektorzellen der Immunabwehr. Darüber hinaus sind sie pathophysiologisch an den Vorgängen einer **Atheromatose** beteiligt. CD14+CD16++-Blutmonozyten entsprechen dem Phänotyp von Gewebsmakrophagen. Erhöhte Anteile CD14+CD16++-Blutmonozyten gehen möglicherweise parallel mit der erhöhten **Progressionsrate** der Atheromatose von Organtransplantierten und Patienten mit Niereninsuffizienz. Andererseits sind sie an der Auslösung und Perpetuation der chronischen **Transplantatdysfunktion** (chronisches Transplantatversagen) ursächlich beteiligt, was aus Biopsiedaten hervorgeht. Die hier erfolgten Blutzellanalysen unterstützen diese These.
3. Dauerimmunsuppression bei Nierentransplantierten vermag **nicht** den proinflammatorischen Status dieser Patienten zu unterdrücken. Damit gilt für alle NTX-Patienten, dass sich mehr oder weniger schnell trotz potenter Immunsuppression irgendwann ein Transplantatversagen einstellt. Es spricht alles dafür, dass aktivierte Blutmonozyten hier die Schlüsselrolle spielen. Wir postulieren, dass dies nur dann abgeschwächt oder vermindert werden könnte, wenn sich die zellulären Marker, die auf chronische inflammatorische Aktivität hinweisen, pharmakologisch günstig beeinflussen ließen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Heidi Luise Estner
Geburtsdatum	13.Juni 1975
Geburstort	München
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulbildung

von / bis	
1981-1985	Grundschule an der Klosterschule, Dachau
1985-1994	Josef-Effner-Gymnasium, Dachau Abschluss: Abitur

## Studium

1994-1995	Architektur, Fachhochschule München
1996-1998	Humanmedizin, Vorklinik LMU München
1998-2002	Humanmedizin, Klinik TU München
2001/2002	Praktisches Jahr, TU München Wahlfach Pädiatrie, Schwabing

## Sonstiges

- 1995 Abschluss der Ausbildung zum Rettungssanitäter (Zeugnis liegt bei). Aktive, ehrenamtliche Mitarbeit im Rettungsdienst des BRK Dachau
- 1999-2001 abgeschlossene Dissertation „CD 14/16 aktivierte Monozyten“ bei Prof. Dr. Scherberich, Harlaching
- 2001 Veröffentlichung: „Evaluation of Training and Quality Management during 8 Years“ (Prehosp Disast Med 2001;16(2):s83).
- 2001 Veröffentlichung: “Trauma Management in the Rescue Service: Circle Training as an Educational Concept an Analysis of an New Training Method” (Prehosp Disast Med 2001;16(2):s84).
- 2001 Veröffentlichung: “Quality management in the Rescue Service: Resuscitation Analysis in a Rescue Service Area” (Prehosp Disast Med 2001;16(2):s84).
- 2001 Veröffentlichung: “Quality Management in the Rescue Service: Development of Standards for Treatment of Stroke Patients” (Prehosp Disast Med 2001;16(2):s85).
- 2002 Laufende Veröffentlichung: “The Role of Abdominal Sonography in the Organized Emergency Service - A Contribution to how to Cut Costs and Raise Efficiency”
- 2000-2002 Mit-Organisation des “Dachauer Trauma-Training”; traumatologische Fortbildungsveranstaltung für Notärzte (Organisation, Stationsleitung, Presse)
- 2002 Mit-Organisation des Kongresses: „Moderne Katastrophen – neue Herausforderungen für die Notfallmedizin“; internationaler Kongress, Dachau (Organisation, Referentenbetreuung, Schriftleitung)













