Expression der Membranantigene CD14, CD16, HLA-DR sowie der Toll-Like-Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 auf Blutmonozyten von Patienten mit Nierenerkrankungen

Stefan Beeck

Aus dem Städt. Klinikum München-Harlaching

Klinik für Nieren-& Hochdruckkrankheiten- Klinische Immunologie
Akademisches Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilians-Universität München

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

Expression der Membranantigene CD14, CD16, HLA-DR sowie der Toll-Like-Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 auf Blutmonozyten von Patienten mit Nierenerkrankungen

Durchflusszytometrische Analysen bei Gesunden, Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, Dialysepatienten und Patienten nach Nierentransplantation

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

vorgelegt von

Stefan Beeck

aus

Konstanz

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. J.E. Scherberich
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Volker Vielhauer Prof. Dr. Ralph Mocikat
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter :	---
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	20.05.2010

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern

Danksagung

Mein besonderer Dank für die Bereitstellung der Thematik und Hilfestellung bei der Anfertigung der Arbeit gilt Herrn Prof. Dr. J.E. Scherberich, Klinikum München-Harlaching.

Des Weiteren bedanke ich mich bei folgenden Personen:

- Frau Ried (MTA) für technische Assistenz

- Den Herren Prof. Dr. med. Ziegler-Heitbrock (Helmholtz Institut in Gauting) und PD Dr. Carsten Kirschning (Institut für Mikrobiologie der TU München, jetzt Universität Essen) für ihre weiterführenden wissenschaftlichen Ratschläge und Diskussionen

- Dem Kuratorium der Dr. Sepp und Hanne Sturm-Gedächtnis-stiftung für die Gewährung einer Projektmittelförderung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung……..S. 1
1.1 Spezifische Fragestellung……S. 2
1.2 Monozyten……...S. 3
1.2.1 CD14++CD16neg.-Monozyten……..S. 3
1.2.2 CD14+CD16+-Monozyten…… S. 3
1.2.3 CD14+CD16++-Monozyten……S. 5
1.2.4 CD14 Rezeptor und Heat Shock Protein……S. 6

2. Toll Like Rezeptoren……...S. 8
2.1 Allgemeines……S. 8
2.2 TLR2……S. 11
2.3 TLR3……S. 13
2.4 TLR4……S. 13
2.5 TLR und Entzündungsreaktionen/Sepsis……S. 15

3. Methoden……S. 17
3.1 Proben……..S. 17
3.2 Extrazelluläres Messverfahren……S. 17
3.3 Intrazelluläres Messverfahren…….. S. 18

4. Durchflusszytometrie……S. 19
4.1 Das FACS – Gerät……..S. 19
4.2 Lichtstreuung……...S. 19
4.3 Hydrodynamische Fokussierung……..S. 20
4.4 Fluoreszenzmessung……S. 20
4.5 Darstellung der Messungen……S. 21
4.6 Statistische Auswertung……S. 22

5. Materialien……..S. 23

6. Patienten…… S. 24
6.1 Daten……S. 24
6.2 Kontrollkollektiv……S. 24
6.3 Ausschlusskriterien……..S. 24
6.4 Patienten mit Nierenerkrankungen……..S. 25
6.5 Patienten nach Nierentransplantation……S. 26
6.6 Patienten unter Hämodialysebehandlung……...S. 26
6.7 Patientenkohorten der einzelnen Messungen……S. 26
6.7.1 Verhalten inflammatorischer Monozyten und ihrer Oberflächenrezeptoren bei verschiedenen Krankheitsgruppen……S. 26
6.7.2 Vergleich humoraler und zellulärer Inflammationsmarker bei HD-Patienten mit unterschiedlichen Gefäßzugängen…….S. 26
6.7.3 Vergleich inflammatorischer Marker bei Tages- und Nachtdialysepatienten……...S. 27
6.7.4 Vergleich der intra- und extrazellulären Expression des TLR4-Rezeptors……S. 27
6.7.5 HLA-DR und TLR3 bei virusinfizierten (HBV, HCV) Dialysepatienten……..S. 27

6.7.6 HLA-DR- und TLR-Expression unter immunkompromittierten Bedingungen……..S. 28
6.7.7 HLA-DR- und TLR-Expression bei erhöhten humoralen Entzündungsparametern……S. 28
6.7.8 HLA-DR und TLR bei vermehrter Retention……S. 28
6.7.9. Expression proinflammatorischer Monozyten bei Nierentransplantierten mit Transplantatdysfunktion……...S. 28
6.7.10 Vergleich von HLA-DR sowie TLR vor und nach einer Dialysesitzung……..S. 28
6.7.11 Immunzytologische Verlaufsbeobachtung definierter Krankheitsbilder……...S. 29

7. Ergebnisse……S. 30
7.1 Verhalten inflammatorischer Monozyten und ihrer Oberflächenrezeptoren bei verschiedenen Krankheitsgruppen……...S. 30
7.1.1 Totale CD14 Expression auf Monozyten……...S. 30
7.1.2 HLA-DR CD14++CD16neg. ……S. 31
7.1.3 HLA-DR CD14+CD16+……S. 32
7.1.4 TLR4 intrazelluläre CD14+CD16+……..S. 33
7.1.5 TLR4 intrazellulär CD14+CD16++……..S. 34
7.1.6 Anteil der CD14+CD16+-Monozyten……S. 35
7.1.7 CRP……S. 36
7.1.8 Kreatinin……..S. 37

7.2 Vergleich humoraler und zellulärer Inflammationsmarker bei HD-Patienten mit unterschiedlichen Gefäßzugängen……S. 38
7.2.1 TLR2 CD14+CD16++……S. 38
7.2.2 TLR4 CD14+CD16+……..S. 38
7.2.3 TLR4 CD14+CD16++……S. 40
7.2.4 CRP……..S. 41
7.2.5 Hämoglobin……S. 42
7.2.6 Krankenhausaufenthalte……...S. 43

7.3 Vergleich inflammatorischer Marker bei Tages- und Nachtdialysepatienten……S. 44
7.3.1 TLR4 CD14++CD16neg. ……...S. 44
7.3.2 TLR4 CD14+CD16+……S. 45
7.3.3 TLR4 CD14+CD16++……..S. 46

7.4 Vergleich der intra- und extrazellulären Expression des TLR4-Rezeptors……..S. 47
7.4.1 Normalpersonen/Nierentransplantierte……...S. 47
7.4.2 Hämodialysepatienten……...S. 48
7.4.3 Chronisch Nierenkranke……S. 50

7.5 HLA-DR und TLR3 bei virusinfizierten (HBV, HCV) Dialysepatienten……....S. 52
7.5.1 Normalpersonen……....S. 52
7.5.2 Hämodialysepatienten……..S. 54
7.5.3 HD Patienten mit HBV……..S. 57

7.6 HLA-DR- und TLR-Expression unter immunkompromittierten Bedingungen…… S. 59
7.6.1 HLA-DR CD14++CD16neg. …… S. 59
7.6.2 TLR2 CD14+CD16++……...S. 60
7.6.3 TLR4 CD14+CD16+……..S. 61
7.6.4 TLR4 CD14+CD16++……S. 62
7.6.5 Anteil der CD14CD16-Monozyten…….. S. 63
7.6.6 CRP……..S. 64
7.6.7 Kreatinin……..S. 65

7.7 HLA-DR- und TLR-Expression bei erhöhten humoralen Entzündungsparametern……..S. 66
7.7.1 Nierentransplatierte……S. 66

7.8 HLA-DR und TLR bei vermehrter Retention…… S. 69

7.9 Expression proinflammatorische Monozyten bei Nierentransplantierten mit Transplantatdysfunktion……S. 70
7.9.1 Totale CD14 Expression…….. S. 70
7.9.2 TLR2 CD14+CD16+……..S. 71
7.9.3 TLR2 CD14+CD16++……S. 72
7.9.4 TLR4 CD14+CD16+……..S. 73
7.9.5 TLR4 CD14+CD16++……S. 74
7.9.9 CRP…… S. 75
7.9.10 Kreatinin……..S. 76

7.10 Expression verschiedener Monozytenepitope nach In-vitro-Inkubation mit mikrobiellen Antigenen……S. 77
7.10.1 100 Kolonien E. Coli…… S. 77
7.10.2 10.000 Kolonien E. Coli……S. 78
7.10.3 100 Kolonien Staphylokokken……S. 80
7.10.4 10.000 Kolonien Staphylokokken……...S. 81
7.10.5 Veränderungen gegenüber der Negativkontrolle……S. 83
7.10.5.1 TLR2 CD16++…… S. 83
7.10.5.2 TLR3 extrazellulär CD14+CD16+……S. 83
7.10.5.3 TLR3 intrazellulär CD14+CD16+……S. 84
7.10.5.4 TLR4 CD14+CD16+…….. S. 84
7.10.5.5 TLR4 CD16++…… S. 85
7.10.5.6 Totale CD14 Expression…….. S. 85

7.11 Immunzytologische Verlaufsbeobachtungen definierter Krankheitsbilder……S. 86
7.11.1 Patient 1…….. S. 86
7.11.2 Patientin 2……...S. 89

7.12 Vergleich von HLA-DR sowie TLR vor und nach einer Dialysesitzung…….. S. 91
7.12.1 Anteil der CD14+CD16+-Monozyten…… S. 91
7.12.2 TLR4 extrazellulär CD14+CD16+…….. S. 92
7.12.3 TLR2 extrazellulär CD14+CD16+…….. S. 93

8. Besprechung der Ergebnisse…… S. 94
8.1 Verhalten inflammatorischer Monozyten und ihrer Oberflächenrezeptoren bei verschiedenen Krankheitsgruppen…… S. 94
8.2 Vergleich humoraler und zellulärer Inflammationsmarker bei HD-Patienten mit unterschiedlichen Gefäßzugängen…… S. 97
8.3 Vergleich inflammatorischer Marker bei Tages- und Nachtdialysepatienten…… S. 99
8.4 Vergleich der intra- und extrazellulären Expression des TLR4-Rezeptors…… S. 99
8.5 HLA-DR und TLR3 bei virusinfizierten (HBV, HCV) Dialysepatienten…… S. 101
8.6 HLA-DR- und TLR-Expression unter immunkompromittierten Bedingungen…… S. 102
8.7 HLA-DR- und TLR-Expression bei erhöhten humoralen Entzündungsparametern…… S. 103
8.8 HLA-DR und TLR bei vermehrter Retention…… S. 103
8.9. Expression proinflammatorischer Monozyten bei Nierentransplantierten mit Transplantatdysfunktion……..S. 103
8.10 Expression verschiedener Monozytenepitope nach In-vitro-Inkubation mit mikrobiellen Antigenen……S. 105
8.11 Immunzytologische Verlaufsbeobachtung definierter Krankheitsbilder…… S. 108
8.12 Vergleich von HLA-DR sowie TLR vor und nach einer Dialysesitzung…… S. 109

9. Zusammenfassung……..S. 111

10. Literatur……...S. 115

11. Anhang……S. 125

1 Einleitung

Im peripheren Blut zirkulierende Blutmonozyten sind entscheidende immunkompetente Ziel- und Effektorzellen. Sie sind als antigenpräsentierende Zellen u.a. an der Erregererkennung, der Infektionsabwehr, der Kommunikationskompetenz innerhalb des immunologischen Netzwerks (z.B. der Signalkooperation mit Lymphozyten), an der Tumorabwehr, an der Genese der Arteriosklerose etc. beteiligt (vgl. Abb. 1).

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die mögliche Bedeutung funktioneller monozytärer Antigene, insbesondere verschiedener membrangebundener Oberflächenantigene. Hierzu zählten: CD14, ein pleiotropher Endotoxinrezeptor, CD16 als niedrigaffiner Fc-Gamma Typ III-Rezeptor, **HLA-DR sowie bestimmte sog. Toll-Like-Rezeptoren (TLR), hier TLR2, TLR3 und TLR4, als Komponenten des angeborenen Immunsystems.** Sie fungieren als so genannte **„Mustererkennungsrezeptoren“**, z.B. gegenüber Erregern (s.u.).

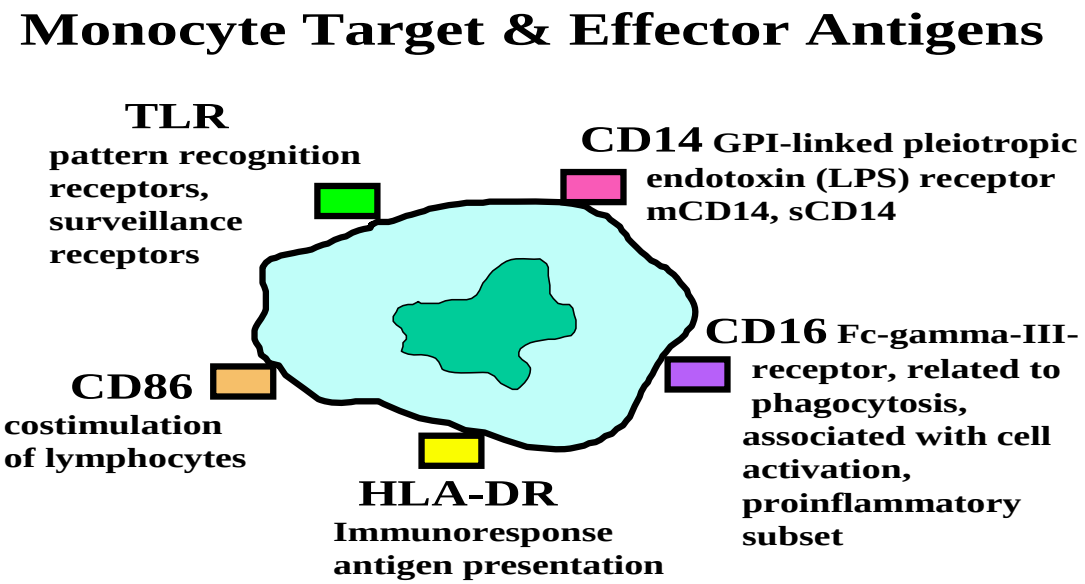


Abb. 1: Die verschiedenen Oberflächenantigene auf Monozyten [Beeck 2008].

Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion zeigen verschiedene Störungen der humoralen und zellulären Immunität [Descamps-Latscha 1993 und 1995]. Die Rate kardiovaskulärer Ereignisse ist bei dieser Patientengruppe gegenüber Gesunden signifikant erhöht, ebenso wie das Risiko für Infektionen und Neubildungen.
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, definierte monozytäre Antigene (und Monozytenphänotypen) bei Gesunden, Patienten mit chronischem Nierenversagen, Dialysepatienten und Nierentransplantierten vergleichend zu untersuchen und mit klinischen wie mit bekannten Laborparametern zu korrelieren.

Schwerpunkt war die Evaluierung phänotypisch definierter Subpopulationen zirkulierender Blutmonozyten und ihre mögliche Beziehung zu bestimmten Krankheitsgruppen. Subpopulationen von Blutmonozyten wurden von uns schon vor Jahren im Zusammenhang mit Immundefekten bei Nierenkranken, Transplantierten und Patienten mit Infektionserkrankungen beschrieben [Nockher und Scherberich 1997 und 1998]. Im Vordergrund der hier durchgeführten Analysen stand die Beschreibung monozytärer TLR bei diesen Krankheitsgruppen.

1.1 Spezifische Fragestellung

Wir versuchten in dieser Arbeit folgende Fragestellungen zu beantworten:

1. **Wie werden monozytäre Antigene wie CD14 (Endotoxinrezeptor), CD16 (Phagozytoserezeptor), HLA-DR, Toll-Like-Rezeptoren (Mustererkennungsrezeptoren, TLR2, TLR4) auf definierten Monozytensubpopulationen (CD14++CD16neg., CD14++CD16+, CD14+CD16++) bei Gesunden, Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, Hämodialysepatienten und Nierentransplantierten exprimiert?**

2. **Welche Auswirkungen hat die Auswahl des Gefäßzugangs (Nativgefäß, Kunstgefäß) auf die Expression der funktionellen Antigene auf den verschiedenen Monozytensubsets und welche Rolle spielen die TLR hierbei?**

3. **Wie und wo werden monozytäre TLR exprimiert, d.h. in welchen Zellkompartimenten lassen sich diese nachweisen (extra-/intrazellulär)?**

4. **Falls ja, lassen sich Unterschiede in der intra- und extrazellulären TLR-Expression bei unterschiedlichen Monozytenphänotypen und Krankheitsgruppen nachweisen?**

5. **In welchem Zusammenhang stehen die erhaltenen zellimmunologischen Analysen mit der bei Nierenkranken nachweisbaren „Mikroinflammation“?**

6. **Sind in-vitro gemessene TLR-Expressionen auf Monozyten mit klinischen Parametern und definierten Krankheitsentitäten in Beziehung zu bringen?**

1.2 Monozyten

Monozyten sind mononukleäre Zellen, welche sich von den myeloischen Stammzellen ableiten. Sie gehören zu der Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen. Ihre Aufgabe ist die zellvermittelte Immunabwehr des Körpers.

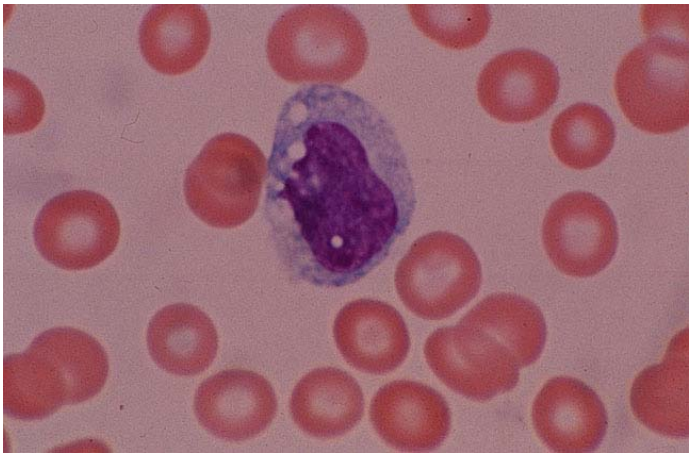


Abb. 2: Ein Monozyt unter dem Lichtmikroskop (∅ 12-20 µm). Typisch ist der eingedellte Kern, welcher nicht so rund ist wie bei Lymphozyten. Feine azurophile Granula sind erkennbar. Aus: Sobotta, Atlas der Histologie, 6. Auflage, Urban und Fischer 2002.

Man unterscheidet verschiedene Phänotypen zirkulierender Blutmonozyten, abhängig von ihren Zelloberflächenproteinen (Differenzierungsantigene nach CD-Nomenklatur) und der damit verbundenen Phagozytoseaktivität. Periphere Blutmonozyten exprimieren alle das CD14-Molekül auf ihrer Oberfläche. Dieses ist ein multifunktioneller Rezeptor und Teil des membranständigen Toll-Like-Rezeptor(TLR)-Komplexes. Als weiteres Oberflächenantigen kommt auf Monozyten das so genannte CD16-Molekül vor, ein niedrigaffiner Fc-gamma-III-Rezeptor, der mit der Phagozytose assoziiert ist. CD14+CD16+-Monozyten besitzen demnach eine höhere Phagozytoseaktivität als die CD14++CD16neg.-Monozyten und eine geringere als die CD14+CD16++-Monozyten.
Das „+“ in den Bezeichnungen der Monozyten bedeutet, dass diese Zellen zehnmal so stark im Vergleich zu Isotypen exprimiert werden. Ein „++“ zeigt eine ungefähr hundertmal so starke Expression an. Des Weiteren scheinen sich diese Zellen im Verlauf einer Infektion von CD14+CD16neg.- zu CD14+CD16++-Zellen zu entwickeln. Eine differenzierte Betrachtung dieser Monozytensubsets ist aus den vorgebrachten Gründen sinnvoll [Weiner 1994; Ziegler-Heitbrock 2009].

1.2.1 CD14++CD16neg.-Monozyten

CD14 ist ein 48-51kDa großes Glykoprotein, das über eine Glycophosphatidylinositolgruppe in der Monozytenmembran verankert ist. Als Teil des TLR-Komplexes ist es für die Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS), Lipoteichonsäure, Peptidoglykanen und Phospholipiden grampositiver Bakterien verantwortlich [Scherberich 2003]. Die Mehrheit der peripheren Blutmonozyten ist stark positiv für den Lipopolysaccharid(LPS)-Rezeptor CD14 und negativ für den Fc-γ–III-Rezeptor (CD16).

1.2.2 CD14+CD16+-Monozyten

CD14+CD16+-Monozyten ähneln den ausgereiften Gewebsmakrophagen und werden während akuter oder chronischer **Entzündungen** vermehrt gebildet (>20%) [Scherberich 1999]. Präinflammatorische CD14+CD16+-Monozyten stellen gerade einmal 8% der Gesamtmonozytenfraktion [Scherberich 1999]. Ungeachtet dieser

scheinbar geringen Anzahl sind diese Zellen der größte Produzent von Tumornekrosefaktor (TNF) im menschlichen Blut [Belge 2002].
Die Zellen der CD14+CD16+-Population sind bereits während ihrer Zirkulation den ausgereiften **Gewebsmakrophagen ähnlich** und besitzen **Phagozytose**aktivität [Ziegler-Heitbrock 1993]. Ein möglicher Zusammenhang mit der Genese dendritischer Zellen ist noch unklar. CD14+16+- bzw. CD14+CD16++-Zellen sind im Vergleich zu CD14++CD16neg.-Zellen bei Infektionen vermehrt im peripheren Blut nachweisbar [Nockher 1998]. Die PCR-Analyse der mRNA von CD14+CD16+-Monozyten zeigte im Vergleich zu den CD14++CD16neg.-Monozyten niedrigere Level der CD14-Transkription bei gleichzeitig hohen Spiegeln der CD16-Transkription. Eine zusätzliche Analyse der Zelloberflächenmoleküle zeigte, dass Fc-γ–III (CD16) in allen, Fc-γ–I sowie ICAM-1 aber nur in einigen Proben zu finden war.
In Vollblutproben wiesen CD14+CD16+-Monozyten eine höhere Phagozytoserate für Escherichia coli auf als CD14++CD16neg.-Monozyten. Zusätzlich exprimierten diese Zellen eine viermal so hohe Rate an Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse II-Antigenen (**HLA-DR**, -DP und -DQ) sowie eine äquivalente Anzahl von MHC Klasse I-Antigenen (HLA-ABC). Analoge Ergebnisse konnten für die Alveolarmakrophagen gefunden werden, womit molekulargenetisch eine Homologie zwischen den Gewebsmakrophagen der Lunge und den CD14+CD16+-Monozyten nachgewiesen werden konnte [Ziegler-Heitbrock 1993].
CD14+CD16+-Monozyten sind eine potente phagozytosefähige und antigenpräsentierende **Monozytensubpopulation**. Dieser Zelltyp findet sich häufig bei akuten und chronischen Infektionen, die u.a. bei klinisch stabilen, asymptomatischen **Hämodialysepatienten** in Form einer „Mikroinflammation“ vorkommen [Nockher 1998; Ziegler-Heitbrock 2007]. Während einer **Hämodialysebehandlung** niereninsuffizienter Patienten verringern sich die Leukozytenzahlen, wobei die stärkste Verminderung in der Gruppe der CD14+CD16+-Monozyten zu finden ist. Nach einer halben Stunde Dialysedauer bestehen nur noch ca. 17 % dieser Monozytenpopulation. Die Wahl des Membranmaterials hat hierbei keinen Einfluss auf das Ergebnis. Nach 120 Minuten Therapiedauer haben sich jedoch wieder alle CD14+CD16+-Monozyten entweder nachgebildet oder von der Kapillarmembran gelöst. Ab diesem Zeitpunkt kommt es zu einer langsamen zellulären Aktivierung, wohl verursacht durch die Dialysemembran [Sester 2001].

Nicht nur bei Dialysepatienten und bestimmten entzündlichen Prozessen sind diese Zellen vermehrt nachweisbar, auch bei den folgenden Krankheitsentitäten spielen sie eine Rolle:

- Bei der **Arteriosklerose** (als Spezialform einer entzündlichen Erkrankung) ist der Anteil dieser Zellreihe gegenüber Gesunden erhöht. CD14+CD16+-Zellen exprimieren darüber hinaus den Scavenger Rezeptor (ScR). Dieser Rezeptor regelt die Lipidakkumulation in Schaumzellen bei der Atherogenese und ist an der Beseitigung von Pathogenen beteiligt. Die ScR-Expression von Monozyten ist möglicherweise die Folge einer vorhergehenden Aktivierung durch u.a. proinflammatorische Zytokine, die spezifische inflammatorische oder vaskuläre Vorgänge wie z.B. die **Atherogenese** einleiten und erhalten [Draude 1999]. Schlitt *et al.* wiesen in ihren Studien den CD14+CD16+-Monozyten bei der Arteriosklerose der Koronarien eine Rolle zu. Hierbei zeigte sich, dass erhöhte CD14+CD16+-Monozytenexpression das Risiko zur Arteriosklerose steigert [Schlitt 2004].
  Huang *et al*. konnten 2002 in einer Studie nachweisen, dass ein gegensätzlich signifikanter Zusammenhang zwischen HDL-Cholesterin und der Anzahl der Monozyten im peripheren Blut besteht. Das HDL-Cholesterin hat zudem im Vergleich mit dem LDL-Cholesterin einen größeren Einfluss auf die Umwandlung von Monozyten in Makrophagen [Huang 2002].

- Neben der Arteriosklerose scheinen CD14+CD16+-Monozyten auch als Marker bei der **Sarkoidose** (M. Boeck) eine wichtige Rolle zu spielen. Okamoto *et al*. konnten eine signifikant höhere Expression dieser Monozytenpopulation bei Sarkoidosepatienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe nachweisen. Der ACE(Angiotensin Converting Enzyme)-Titer korrelierte hierbei signifikant mit der CD14+CD16+-Monozytenexpression [Okamoto 2003].

- Bei Patienten mit **Myelom oder Lymphom** kommt es nach autologen Stammzelltransplantationen zu einer Verschiebung im Verhältnis zwischen CD14++CD16neg.- und CD14+16+-Monozyten. Vor der Therapie sind die CD14++CD16neg.-Zellen in der Überzahl, während der Therapie (high-dose Chemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation) verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der CD14+CD16+-Monozyten, um dann ca. elf Tage nach der erfolgreichen Transplantation wieder in das ursprüngliche Verhältnis zurückzufallen. Die CD14+CD16+-Monozyten zeigen nach der Transplantation eine um mehr als die Hälfte gesteigerte Phagozytosekapazität [Dayyani 2004].

1.2.3 CD14+CD16++-Monozyten

CD16 wird auch als Fc-γ–III-Rezeptor bezeichnet. Ein Polymorphismus in der Extrazellulardomäne (EC 2) des CD16-Rezeptors (Fc-γ–RIIIa) hat einen unmittelbaren Effekt auf die Bindungsfähigkeit von Liganden an natürliche Killerzellen und Monozyten, welche unabhängig von der Rezeptorexpression ist. Infolgedessen kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, einer vermehrten Aktivierung der NK-Zellen und einer beschleunigten Induktion der **Apoptose** [Wu 1997].
Im Unterschied zu CD14+CD16+-Zellen fehlt den CD14+CD16++-Monozyten ein CD64 Fc-γ-Rezeptor. Die CD14+CD16++-Monozyten besitzen im Vergleich zu den CD14+CD16+-Monozyten eine höhere immunglobulin- bzw. komplementvermittelte Phagozytoseaktivität. Dabei exprimieren sie weniger Zytokine pro Zelle als die CD14++CD16neg.-Monozyten [Almeida 2001]. CD14+CD16++-Monozyten, welche mit GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen koloniestimulierender Faktor), IL-4 und TNF-α in vitro vorbehandelt wurden, sezernieren vermehrt IL-4 durch aktivierte CD4(+)-T-Zellen als ebenso vorbehandelte CD14++CD16neg.-Monozyten [Sanchez 2001]. **Dendritische Zellen (DC),** die von CD14+CD16++-Monozyten abstammen (sollen), werden zunehmend in der Krebstherapie genutzt. Diese Zellen **stimulieren allogene native T-Lymphozyten.** Bei diesen führen sie zu einer erhöhten Produktion von IL-4 im Vergleich zu dendritischen Zellen, die von CD14+CD16+-Monozyten abstammen [Arroyo 2004].
CD14+CD16++-Monozyten exprimieren mehr **TLR2** als CD14+CD16+-Zellen und können so effizient Zytokine produzieren (z.B. TNF-α). Zum Beispiel war bei **rheumatoider Arthritis** die Expression von TLR2-Rezeptoren auf CD14+CD16++-Monozyten erhöht. Im Gegensatz hierzu zeigt **TLR4** auf beiden Populationen eine gleich starke Expression. Die TLR2-Expression kann durch „Makrophagen koloniestimulierenden Faktor“ (M-CSF) und Interleukin-10 erhöht werden. „Transforming Growth Factor β1“ (TGFß) verminderte die monozytäre TLR2-Expression, wohingegen die CD16-Expression durch TGF-ß induziert wurde. Nach Stimulation mit Lipoteichonsäure zeigten CD14+CD16++-Monozyten eine erhöhte Produktion von TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12 p40-, IL-1-Rezeptorantagonisten und IL-10 durch Aktivierung von NF-κB. Die NF-κB-Aktivität wird nicht durch CD16-Antikörper beeinflusst. Eine solche Antwort ließ sich nur durch anti-TLR2-Antikörper hemmen. Durch anti-TLR4-Antikörper kommt es nur zu einer teilweisen Hemmung. Weiterhin kann das so genannte Heat Shock Protein 60 (Hsp60) als endogener TLR-Ligand die Synthese von TNF-α durch CD14+CD16++-Monozyten induzieren [Iwahashi 2004].
Ein genetisch bedingter Mangel an CD14+CD16++-Monozyten scheint die Abwehrfunktion des Betroffenen allerdings nicht zu beeinträchtigen. An einer

Familienstudie zeigten Wagner *et al.* dass trotz des Mangels an CD14+CD16++-Monozyten, die genau wie CD32 und CD64 ein Rezeptor für IgG sind, keine erhöhte Infektanfälligkeit der Familienmitglieder bestand. Offenbar gleichen die anderen Rezeptoren diesen Mangel aus [Wagner 2004].

1.2.4 CD14-Rezeptor und Heat Shock Proteine

Der CD14-Rezeptoranteil am LPS-Rezeptor auf Monozyten spielt eine wichtige Rolle in der **Übermittlung** der Immunantwort. Laborversuche mit Treponemen zeigten eine dosisabhängige Synthese von TNF-α in humanen Monozyten, die mit der Zeit der Inkubation zunahm. Diese Aktivität konnte signifikant durch Blockade des CD14-Anteils des LPS-Rezeptors (LBP) reduziert werden [Schröder 2000]. CD14 scheint also eine Rolle in der Sensitivität von Monozyten/Makrophagen gegenüber LPS zu spielen.
Kol *et al.* konnten zeigen, dass auch das humane **Heat Shock Protein 60** (HSP60) PBMC (peripheral blood mononuclear cells) sowie monozytär abstammende Makrophagen durch die CD14-Signalkaskade und „p38 mitogenaktivierte Proteinkinase“ aktiviert werden können. Diesen Weg der Signalvermittlung teilen sie sich mit dem bakteriellen Lipopolysaccharid (LPS). Dadurch wird eine Beteiligung des HSP60 an mehreren endogen pathologischen Prozessen wie z.B. der Arteriosklerose und anderen inflammatorischen Störungen durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems wahrscheinlicher [Kol 2000]. HSP60 verursacht eine potente präinflammatorische Antwort. Diese wird durch TLR4 vermittelt. Die Detektion endogener Moleküle wie HSP durch TLR könnten Auslöser einer **akuten Tubulusnekrose** sein. Der Nachweis endogener HSP scheint auch einen negativen Einfluss auf Entzündungen der Nieren zu haben [Anders 2007]. Das HSP60 war der erste entdeckte endogene Ligand, der TLR4 aktivieren kann [Ohashi 2000]. HSP60 kann allerdings auch über TLR2 zu einer Zellaktivierung führen. TLR2 ist ein möglicher Marker und Induktor spezifischer Verteidigungsmechanismen, wie z.B. oxidativer Stress und konsekutive zelluläre Nekro(bio)se durch mikrobiologische Pathogene [Kirschning 2002].
Das **Heat Shock Protein** (HSP) **70** aktiviert in ähnlicher Weise das Immunsystem. Unter Kontrolle von MyD88 und TRAF6 induziert es die Bildung von IL-12 und „Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1“ (ELAM-1). Damit verhält sich HSP70 sehr ähnlich zu HSP60 [Vabulas 2002]. Nach Asea *et al*. vermittelte exogenes HSP70 eine potente Zytokinausschüttung. Hierbei bindet HSP70 an die Zellmembran und löst einen schnellen intrazellulären Calciumanstieg aus, aktiviert NF-κB und steigert so die Expression von Zytokinen in menschlichen Monozyten. Die HSP70-induzierte Zytokinbildung wird über die MyD88/IRAK/NF-κB Signalkaskade erreicht. Damit benutzt HSP70 sowohl den durch TLR2- (grampositive Bakterien) als auch den durch TLR4 (gramnegative Bakterien) vermittelten Weg, das präinflammatorische Signal CD14-abhängig umzuwandeln [Asea 2002].
Ein noch größeres Aktivierungsspektrum besitzt das **Heat Shock Protein Gp96**. Es kann sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem aktivieren. Einerseits funktioniert diese Aktivierung durch spezielle Interaktion mit CD91, andererseits durch die Induktion antigenpräsentierender Zellen, was zu einer Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und zusätzlich stimulierenden Proteinen führt. Die Interaktion von Gp96 mit TLR2 und TLR4 aktiviert den wichtigen nukleären Transkriptionsfaktor NF-κB [Vabulas 2002].

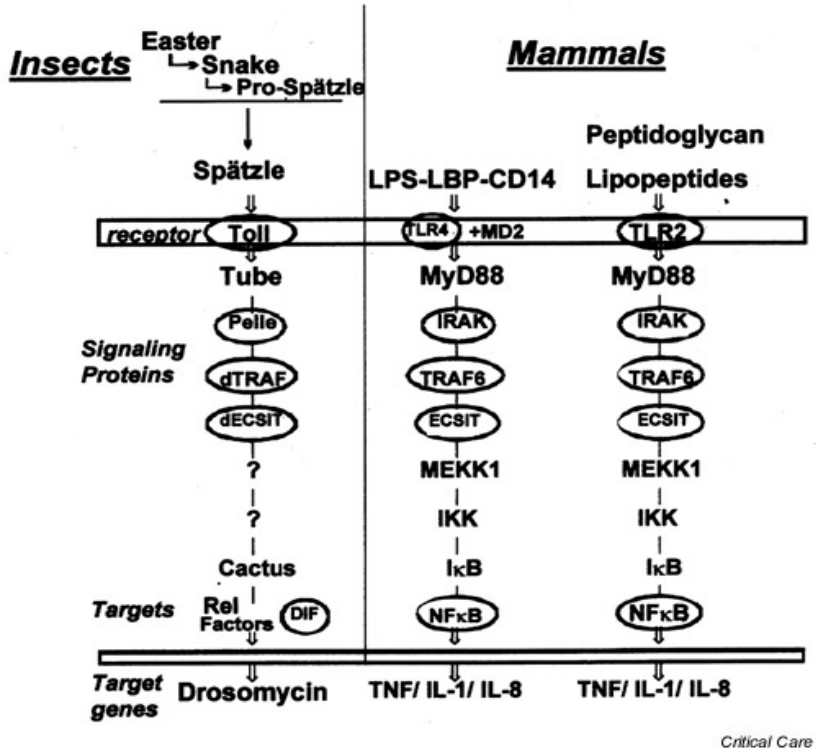


Abb. 3: Vergleich der Toll- bzw. Toll-Like-Rezeptoren. Signalkaskade bei Säugetieren (Mammals) und Insekten (Insects). Crit Care. 2002; 6 (2): 125-136. doi: 10.1186/cc1471. Published online 2002 February 15. Copyright © 2002 BioMed Central Ltd.

Das zelluläre Immunsystem von **Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion** weist verschiedene Besonderheiten gegenüber Gesunden auf: Dialysepatienten, aber auch Patienten mit nur eingeschränkter Nierenfunktion haben ein erhöhtes Risiko für **Infektionen** und Tumore (**Karzinome**) sowie der Entwicklung einer **progredienten Arteriosklerose.** Diese führt wiederum zu vermehrt **kardiovaskulären und zerebrovaskulären Ereignissen**. Pathogenetisch sind die hier beschriebenen Zellen (Monozyten) an diesen Prozessen beteiligt.

In dieser Arbeit untersuchten wir erstmals die Expressionsprofile von TLR auf Blutmonozytensubpopulationen von Risikopatienten.

2. Toll-Like-Rezeptoren

2.1 Allgemeines

Bei der Fruchtfliege spielt das Toll-Protein eine Rolle bei der dorsoventralen Entwicklung des Embryos. Dieses Protein besitzt in der intrazellulären Domäne einen zum „Interleukin-1R“ (IL-1R) homologen Abschnitt. Der Rezeptor wird deshalb TIR genannt, eine Abkürzung für Toll/IL-1R Rezeptor. Im Jahr 1997 wurde beim Menschen ein zum Drosophila „Toll-Protein“ homologes Molekül gefunden. Bei Drosophila und anderen Insekten, wie auch beim Menschen und anderen Säugetieren, ist dieses Protein mit einer Signalkaskade gekoppelt, die nach Antigenkontakt zu einer Zytokinausschüttung führt. Dieses komplexe System dient als primärer Abwehrmechanismus vieler Lebewesen. Der als erster beim Menschen entdeckte, mit analogen Funktionen des TIR vorkommende Rezeptor wurde später als Toll-Like-Rezeptor4 (TLR4) eingeordnet. TLR4 gehört zu der großen und in den letzten Jahren in ihrer Anzahl stark angewachsenen Familie der Toll-Like-Rezeptoren.
TLR sind zellmembranständige Rezeptoren, die auch intrazellulär vorkommen können. Sie gehören zur Gruppe der PRR (Pattern Recognition Receptors). Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen benutzen solche PRRs. Diese sind in ihrer Molekülstruktur genetisch festgelegt, wodurch eine genaue Trennung zwischen Eigen- und Fremdmaterial erreicht wird [Stoy 2001]. In der Fruchtfliege vermittelt Toll die antifungale und antigrampositive Bakterienabwehr, ist aber selbst nicht der primäre Rezeptor. Diese primären Rezeptoren befinden sich gelöst in Drosophila und werden als Peptidoglykan Recognition Proteins bezeichnet (PGRP) [Kirschning 2004].
Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass jedes Mitglied dieser TLR-Familie auf verschiedene Liganden spezialisiert ist. **TLR2 und TLR4** sind essenzielle Komponenten zur Erfassung von **bakteriellen Zellwandbestandteilen**. **Endogene Liganden**, wie zum Beispiel Gewebsfragmente, Heat Shock Proteine oder nekrotische Zellen, werden ebenfalls erfasst [Beg 2002]. Im Zusammenhang mit der Erkennung von Eigenmaterial wird auch die zentrale Bedeutung des apoptotischen Zelltodes zur Vermeidung einer endogen ausgelösten Zytokinsekretion deutlich. Stuart *et al*. beschrieben 2002, dass mit apoptotischen Zellen beladene dendritische Zellen (DC) TNF-α produzieren können. Hingegen können sie durch eine fehlerhafte Hochregulierung von CD86 nur wenig IL-12 bilden. Eine generalisierte inflammatorische Antwort wird somit unterdrückt. Dendritische Zellen, die kein apoptotisches Material abbauen, exprimieren unverändert IL-12 [Stuart 2002]. Dagegen kommt es bei nekrotischen Zelluntergängen zu einer Aktivierung von NF-κB auf einem TLR2-abhängigen Weg [Li 2001].
Früher ging man unabhängig vom TLR-Protein von einem einzigen Weg der Signaltransduktion aus. TLR2 und TLR4 würden demnach dieselbe Signalkaskade durchlaufen. Die Transkription und anschließende Stimulation des Immunsystems verfolgt einen ähnlichen Weg wie nach der Aktivierung des IL-1 (Interleukin-1) Rezeptors. „IL-1 Rezeptor Assoziierte Kinase“ (IRAK) wird durch „MyD88 Adapter Protein“ aktiviert und führt zu einer Signalweiterleitung durch TRAF-6 und einer anschließenden Proteinkinase-Kaskade. Diese hat eine Aktivierung von NF-κB und c-Jun Kinase zur Folge, welche ihrerseits zu einer Aktivierung der **Transkription von IL-1- und IL-12-Genen sowie TNF-α** führen.

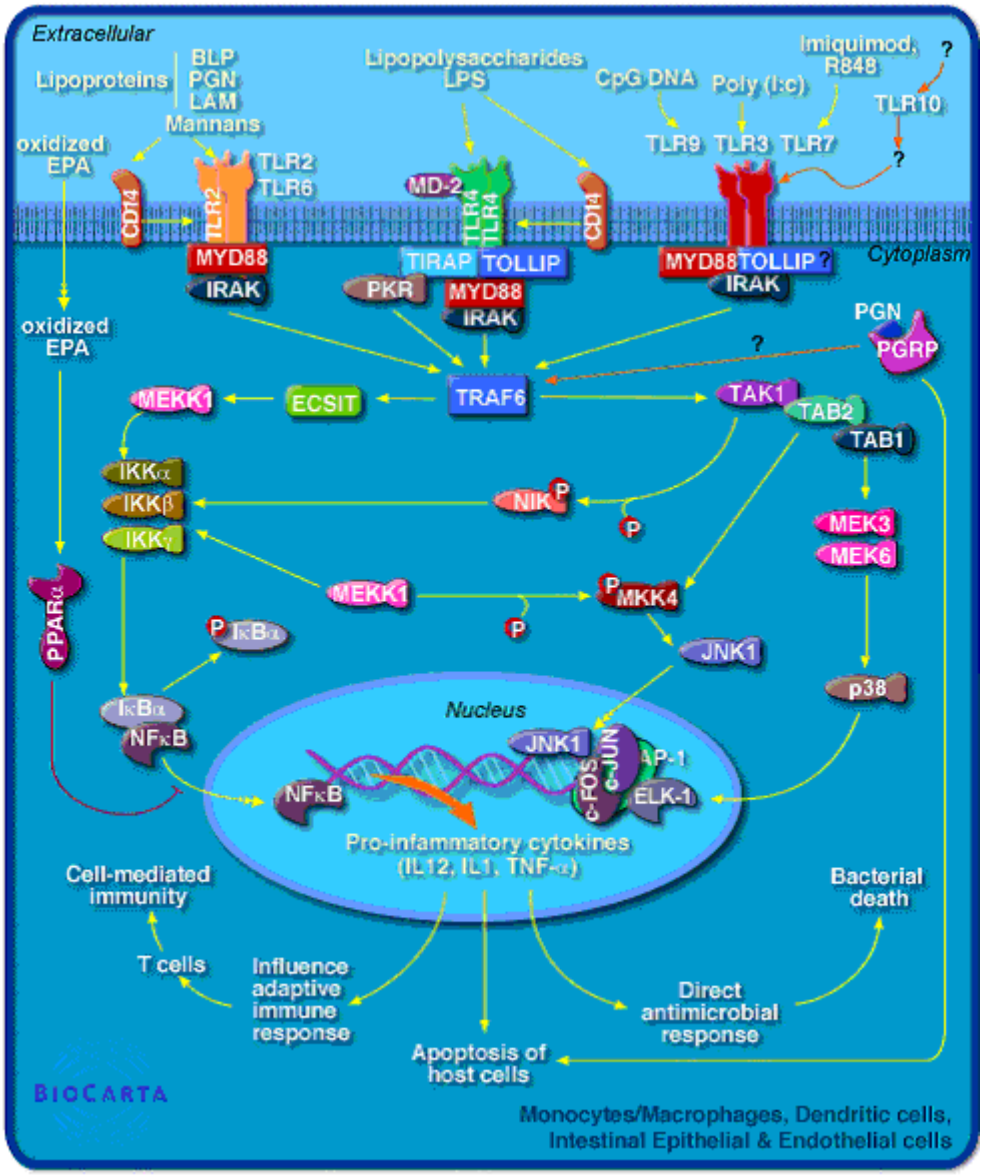


Abb. 4: Durch TLR ausgelöste intrazelluläre Signalkaskade beim Menschen.
Quelle: http://www.biocarta.com/pathfiles/h_tollPathway.asp
Datum: November 2001.

Je nach Rezeptortyp können auch unterschiedliche Interferone gebildet werden. TLR2 kann weder IFN-α noch IFN-β induzieren, wohingegen TLR4 zumindest die Bildung von IFN-β induzieren kann. Andere TLR, wie TLR3, TLR7 und TLR9, können zur Ausschüttung beider Interferongruppen führen [Kaisho 2003].
Zwei Mitglieder des IL-1R/TLR-Komplexes wurden in jüngster Zeit gefunden. Sie heißen „Tollip“ und „TIRAP“. Tollip existiert in einem Komplex mit IRAK. Die Rekrutierung von diesem „Tollip-IRAK-Komplex“ zu einem aktivierten TLR-Rezeptorkomplex findet durch die Assoziation von Tollip an IL-1RAcP statt. Die Bindung von My-D88 ist das Signal zur Autophosphorylierung von IRAK, die zu einer Dissoziation von IRAK und Tollip (mit IL-1RAcP) führt [Burns 2000]. Medzhitov *et al.* entdeckten 1998 das Toll-Adapterprotein MyD88 (Myeloid Differentiation Factor 88). Dieses ist essenziell für die Aktivierung von NF-κB über IRAK und TRAF6 [Medzhitov 1998]. Ein mutagenes und somit blockiertes MyD88 verursacht keine Immunantwort nach LPS-Stimulation [Hoebe 2003]. Allerdings

existiert mindestens ein alternativer Aktivierungsweg. Hinter TLR4 zweigt dieser über das „Toll-Interleukin1-Rezeptor-Domäne beinhaltende Adapterprotein“ (TIRAP) ab [Horng 2001]. Bei der durch TLR4 vermittelten Induktion von IFN-β–mRNA wird dieser MyD88- und PKR-unabhängige Weg genutzt [Toshchakov 2002]. TLR2 und TLR4 benötigen zur Signalübertragung diesen auch als „MyD88-adapter-like“ (Mal oder auch TIRAP) bezeichneten Adapter. MyD88 und Mal haben beide eine homologe TIR-Domäne (Toll/IL-1 Rezeptor) und unterscheiden sich nur in ihren N-Termini. In einigen Modellen wurden Hinweise gefunden, dass TLR4, aber nicht TLR2, Mal direkt rekrutiert [O'Neill 2003].
Es gibt zwei weitere Adapterproteine, die für die Aktivierung von Interferon-β (TRIF) bzw. „IFN-regulatorischer Faktor 3“ (TICAM-1) zuständig sind. Hauptaufgabe von TICAM-1 ist die Interferonregulation nach Aktivierung von TLR3 durch virale Nukleinsäure. Weiterhin sind noch zwei weitere Adapter beim Menschen bekannt: das „TRIF-Related Adaptor Molecule“ (TRAM) und das „Sterile Alpha and HEAT-Armadillo Motif“ (SARM) [O'Neill 2003].

Nachfolgend eine Auflistung pathologischer Entitäten, bei denen TLR offenbar eine wichtige Rolle spielen:

- Nach einer **Salmonelleninfektion** ist TLR4 entscheidend für die frühzeitige Produktion von Zytokinen und die nachfolgende Bereitstellung von Makrophagen. Zu einem späteren Infektionszeitpunkt übernimmt TLR2 diese Aufgabe. Beide Immunreaktionen sind MyD88-abhängig. Dies konnte sowohl im Mausexperiment als auch bei Versuchen in Zellkulturen gezeigt werden [Weiss 2004].

- Bei der Pathogenese der **Arteriosklerose** sind die TLR ebenfalls involviert. Minimal verändertes (oxidiertes) LDL löst in Makrophagen (also den gewebeständigen Monozyten) sowohl einen TLR4-abhängigen als auch einen TLR4-unabhängigen Signalweg aus. Dies führt zur Ausschüttung von Zytokinen. Das atherosklerotisch wirksame LDL löst so über die TLR eine mikroinflammatorische Reaktion aus [Miller 2005].

- Die TLR4-Expression von Patienten mit einer **chronischen Herzinsuffizienz** korreliert mit der Schwere der Erkrankung und mit den Lipidwerten im Patientenserum. Fluvastatin konnte die TLR4- und TLR2-Expression dosisabhängig verringern [Földes 2008].

- In einem Versuch, in dem verschiedene TLR auf ihre Fähigkeit auf virusähnliche Partikel zu reagieren untersucht wurden, zeigte sich, dass TLR3 zu einer moderaten Erhöhung der Anzahl an zytotoxischen T-Zellen führt, TLR2 und TLR4 jedoch nicht [Schwarz 2003].

- TLR4 bewirkt an dendritischen Zellen unter anderem die Produktion von Th1-induzierendem IL12p70. TLR2 induziert dagegen die Produktion des IL-12 hemmendem p40 Homodimer. Hierdurch kommt es zu einer Th2-Antwort. Patienten, die an einem **systemischen Lupus erythematodes (SLE)** leiden, zeigen bei noch erhaltener Nierenfunktion eine dominante Th2-Antwort. Patienten mit SLE und terminaler Niereninsuffizienz weisen hingegen mehr Th1-Zellen im Blut auf [Heine 2002]. Anders *et al.* konnten eine Beteiligung von TLR7 und TLR9 an der Pathogenese des SLE nachweisen [Anders 2007].

- Nicht pathogene Moleküle, freigesetzt bei einem **Trauma,** führen bei der Maus zu einer TLR2 und TLR4 vermittelten inflammatorischen Reaktion [Kigerl 2007].

- Beim **IDDM** (Insulin Dependent Diabetes mellitus) sind die TLR2- und TLR4-Expressionen erhöht [Devaraj 2008].

TLR können die sie erreichenden Informationen über die Herkunft der Pathogene verarbeiten und so zu einer unterschiedlichen Induktion von Zytokinen in dendritischen Zellen führen. Hieraus wird ersichtlich, dass der Ablauf der Immunantwort wohl schon auf der Ebene der TLR determiniert wird [Re 2001].

2.2 TLR2

Beim TLR2 handelt es sich um ein 90kD großes Transmembranprotein vom Typ I. Der TLR2-Rezeptorkomplex besteht aus einer extrazellulären und einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne besteht aus 18 bis 20 Leucin-Rich-Repeats (LRR) und LRR-ähnlichen Sequenzen. Die intrazelluläre Domäne enthält eine „Toll/IL-1 Rezeptor/Resistance Protein"-typische TIR-Domäne, wie sie auch bei Drosophila zu finden ist. TLR2 spielt eine wichtige Rolle in der Erkennung von **grampositiven Bakterien** [Takeuchi 1999]. Zu den TLR2-spezifischen Liganden gehören aber auch **gramnegative Bakterien, Spirochäten und Mykoplasmen**. TLR2 bildet einen Komplex mit anderen Molekülen wie CD14, MD2, TLR1 und TLR6. Diese Interaktion führt zur Induktion von Zytokinen [Kirschning 2002].
Die Stimulation von TLR2, beispielsweise durch **Staphylokokkus aureus**, induziert eine schnelle Aktivierung von Monozyten im Blut. Um einen Multiproteinkomplex zu bilden und die Signalkaskade um NF-κB zu aktivieren, muss der TLR2-Komplex zuerst phosphoryliert werden. Es gibt jedoch auch einen alternativen Weg, der eine Phosphorylierung von TLR2 umgeht. Dieser verläuft über eine von Rac1, PI3K und Akt vermittelte Signalkaskade und aktiviert NF-κB direkt [Arbibe 2000].
Im menschlichen Blut exprimieren die **CD14-Monozyten** die höchste Rate an TLR2, gefolgt von den CD15+-Granulozyten. Auf CD14-Monozyten kommt es nach LPS-, GM-CSF-, IL-1- oder IL-10-Stimulation zu einer vermehrten TLR2-Expression. IL-4, IFN-γ und TNF führten dagegen zu einer Verminderung der TLR2-Expression. In Granulozyten führte LPS-, GM-CSF- und TNF-Stimulation zu einer verminderten TLR2-Expression. Stimulation mit IL-10 führte hingegen zu einer moderaten Expressionssteigerung. Diese Daten suggerieren, dass die TLR2-Expression von inflammatorischen Mediatoren unterschiedlich reguliert wird [Flo 2001]. Eine hohe TLR2- und niedrige TLR7-Expression ist typisch für periphere Blutmonozyten [Hornung 2002]. Lymphozyten besitzen hingegen weder TLR2- noch TLR1-Rezeptoren [Ochoa 2003].

Im Folgenden sind Befunde zu diversen Erregern/Erkrankungen aufgelistet, bei deren Erkennung/Ausbildung TLR2 eine wesentliche Rolle zu spielen scheint:

- TLR2 besitzt Rezeptorfunktion gegenüber durch Hitze inaktivierte **Listeria monocytogenes** (HKLM) Stämme. Ein Ansprechen von TLR2 auf inaktivierte **B-Streptokokken** Typ III (GBS) blieb im untersuchten Hamstermodell aus. TLR2 scheint nicht der Rezeptor zu sein, der menschliche Monozyten nach LPS-Kontakt aktiviert [Flo 2000]. Lipopeptide aktivieren das Immunsystem über TLR2. Dabei binden sie zuerst an CD14 und bilden so den TLR2-Signalkomplex [Manukyan 2005].

- Aus einem Versuch mit dem Hefepilz **Cryptokokkus neoformans** und TLR2- bzw. MyD88-defizienten Mäusen wurde ersichtlich, dass nur das Zusammenspiel zwischen TLR2 und MyD88 in der Abwehr gegen Cryptokokkus neoformans zu einer Immunreaktion führt. TLR4 spielt hierbei keine Rolle. Durch eine erhöhte Expression von TNF-α, IL-12 und IFN-γ wird der Keim bekämpft. Fehlt den Mäusen TLR2 oder MyD88, so findet keine Abwehr statt und die Mäuse sterben [Biondo 2005].

- Einen modulierenden Einfluss auf die TLR2-Expression scheint auch das **1-alpha Calcidol** zu haben. Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die TLR2-Expression durch 1-alpha Calcidol gehemmt werden kann [Kellermeyer 2004; Scherberich 2005].

- TLR 2 und TLR4 sind in **Herzmuskelzellen** vorhanden. TLR2 ist dabei an der Regulation des oxidativen Stresses beteiligt. Blockiert man TLR2, so kommt es an den Myozyten zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber oxidativem Stress mit resultierender zytotoxischer Wirkung und letzten Endes myokardialer Dysfunktion [Frantz 2001].

- TLR1 und TLR2 scheinen sich gegenseitig zu ergänzen und somit die Immunantwort nach Ligandenbindung zu verstärken. Dies konnte anhand von **Neisseria meningitidis** herausgefunden werden [Wyllie 2000]. Ähnliche Untersuchungen bezüglich der Immunreaktion bei **Lepra** zeigten, dass Interferon(IFN)-γ und „Granulozyten Makrophagen Colony Stimulating Factor“ (GM-CSF) die TLR1-Expression in Monozyten erhöhen. Bei Ausschüttung von IL-4 kommt es zu einer geringeren TLR2-Expression. TLR1 und TLR2 werden bei der lokalen tuberkuloiden Lepra stärker exprimiert als bei der lepromatösen. Dadurch kommt es anscheinend zu einer genau geregelten Expression und Aktivierung der TLR unmittelbar am Ort der Infektion [Krutzik 2003].

- **Schwerverletzte** exprimieren weniger TLR2 auf Monozyten als Gesunde. Die LPS-induzierte Ausschüttung von TNF-α war bei diesen Akutpatienten signifikant reduziert [Lendemann 2007].

- TLR könnten einen direkten Einfluss auf das **endokrine System** haben. Zumindest bei der Maus führt TLR zur direkten Ausschüttung von endogenen Kortikosteroiden aus der Nebennierenrinde. TLR2-defekte Mäuse hatten eine eingeschränkte endogene Glukokortikoidausschüttung [Bornstein 2006]. Analoge Beschreibungen beim Menschen existieren noch nicht.

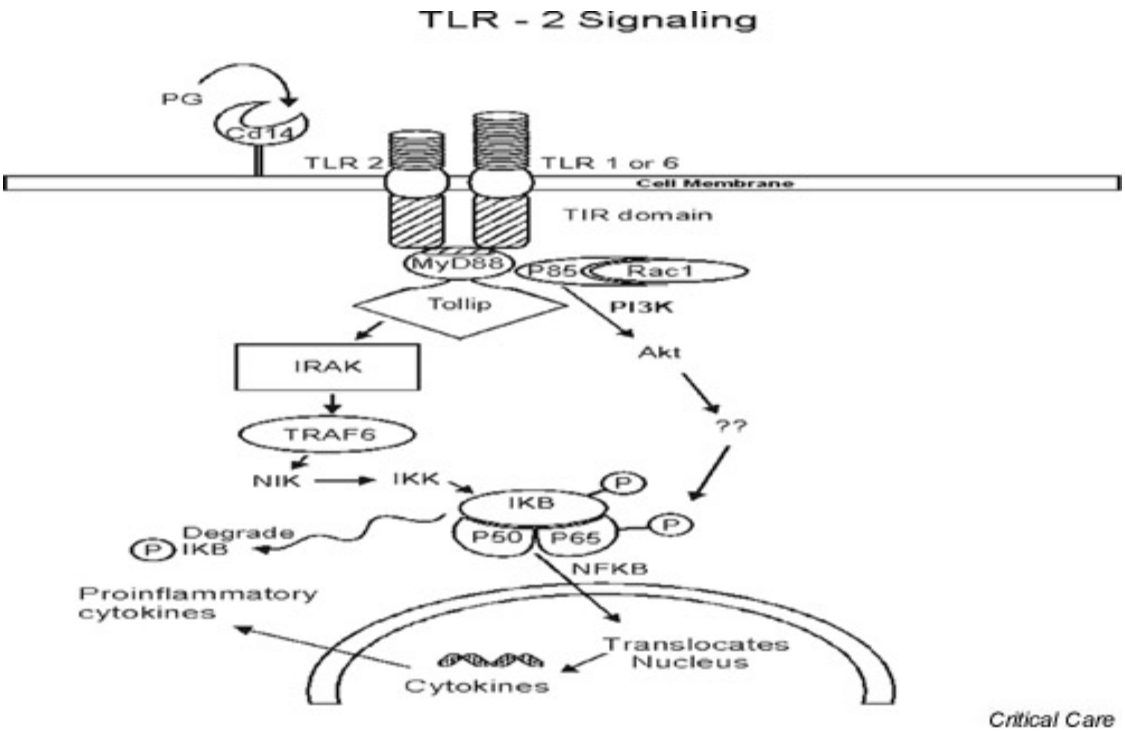


Abb. 5: Die intrazelluläre TLR2-Signalkaskade beim Menschen. Crit Care. 2002; 6 (2): 125-136. doi: 10.1186/cc1471. Published online 2002 February 15. Copyright © 2002 BioMed Central Ltd.

2.3 TLR3

TLR3 kann **doppel- und einzelsträngige RNS-Viren** wie z.B. das HC-Virus erkennen [Alexopoulou 2001; Akira 2003]. DNS-Viren wie HBV sind demnach kein Ligand von TLR3. Diese These konnten wir mit der vorliegenden Arbeit **nicht bestätigen**.
Die Aktivierung von TLR3 führt über NF-κB zur Produktion von **Interferonen** [Alexopoulou 2001]. Wie viele Viren hat auch das Hepatitis-C-Virus einen eigenen Mechanismus entwickelt, um sich vor einer Immunantwort des Wirtsorganismus zu schützen: HCV protolysiert TRIF. TRIF ist ein Protein, das mit TLR3 zur Ausschüttung von Interferonen führt. Nach Protolyse von TRIF bleiben wesentliche antivirale Effekte aus und das Virus kann im Körper persistieren [Li 2005].
Die TLR3-Expression auf Mesangiumzellen ist wohl auch verantwortlich für die Entstehung von **Immunkomplex-Glomerulonephritiden** sowie für die Progression chronischer Glomerulonephritiden [Wörnle 2005].

2.4 TLR4

Die TLR4-Aminosäuresequenzen des Menschen und der Fruchtfliege stimmen zu ca. 70 % überein. Allerdings ist es nur dem menschlichen TLR4 möglich, eine Differenzierung bezogen auf Lipid A und verändertes Tetra-Acyl Lipid A durchzuführen. Lipid A kann, ähnlich wie LPS, die TLR4-Rezeptoren aktivieren und zur Synthese von TNF anregen [Poltorak 1999].
LPS provoziert im infizierten Organismus eine generalisierte proinflammatorische Immunantwort. Diese Antwort ist genetisch reguliert und konnte bei Mäusen auf Chromosom 4 nachgewiesen werden. Wenn Mäuse homozygot für ein mutiertes LPS-Allel sind, können sie eine natürliche Toleranz gegen LPS und dessen schwerwiegende Effekte entwickeln. Drei Transkriptionseinheiten, die alle TLR4 enthielten, konnten hierbei identifiziert werden [Qureshi 1999]. Bei TLR4-defizienten Mäusen reagieren

Makrophagen und B-Zellen nicht auf einen LPS-Stimulus [Hoshino 1999]. Die Fähigkeit von TLR4, LPS zu erkennen und zu binden, wird wohl wesentlich durch MD-2 gewährleistet. Dieses ist eng mit TLR4 assoziiert und nur in Verbindung mit MD-2 kann TLR4 adäquat auf LPS reagieren [Miyake 2003: Shimazu 1999]. MD-2 scheint allerdings auch eine alleinige Bindungsstelle für LPS zu besitzen, welche unabhängig von LPS-Bindungsprotein oder CD14 ist. Anscheinend konkurriert das LPS-Bindungsprotein mit MD-2 um die LPS-Bindung [Viriyakosol 2001].
Beta-Defensin ist ein kleines antimikrobielles Peptid des angeborenen Immunsystems, welches als Reaktion auf mikrobielle Infektionen vom Mukosagewebe gebildet wird. Auf unausgereiften dendritischen Zellen fungiert „Murin-Beta-Defensin 2“ (mDF2beta) als endogener Ligand für den Toll-Like-Rezeptor4 und ist somit ebenfalls an der Auslösung der Signalkaskade beteiligt [Biragyn 2002].

Nachfolgend eine Auflistung von Erkrankungen, bei denen TLR4 eine wichtige Rolle spielt:

- Die Immunantwort auf ein Fusionsprotein des **RS-Virus** wird durch TLR4 und CD14 vermittelt. Das Virus persistierte länger in Lungen von infizierten, TLR4-defizienten Mäusen als in denen von normalen Mäusen. Somit kann die TLR4-vermittelte Signalkaskade sowohl durch bakterielle als auch durch virale Pathogene initiiert werden [Kurt-Jones 2000].

- TLR4 regelt bei **Pneumocystis-Pneumonien** die Schwere der Erkrankung. Im Mausversuch kommt es zu einer Verstärkung der Symptomatik und einer Exazerbation der pulmonalen Läsion bei TLR4-mutanten Mäusen. Sie zeigen in der bronchoalveolären Lavage erniedrigte Werte von Interleukinen bei gleichzeitig erhöhten Werten von TNF-α und IL-6 [Ding 2005].

- Patienten mit **Angina pectoris** exprimieren vermehrt TLR4 auf Monozyten. Vermehrte TLR2-Expression konnte nur bei der instabilen Angina pectoris beobachtet werden. Stimulation der Monozyten durch TLR4 führte nicht zu einer erhöhten TLR2-Expression [Ashida 2005].

- Das durch **LPS induzierte akute Nierenversagen (ANV)** scheint seine Auslöser außerhalb der Niere zu haben. Cunningham *et al*. konnten die Hypothese, dass LPS an extrarenale TLR4 bindet und so zu einer systemischen TNF-Freisetzung führt, im Mausexperiment stützen. Das ANV scheint die Konsequenz der extremen systemischen TNF-Freisetzung zu sein. Infiltration von Neutrophilen in die Niere sowie die Nierenzellapoptose sind die potenziellen Mechanismen, durch die eine Endotoxämie ein funktionelles ANV zur Folge haben kann [Cunningham 2004].

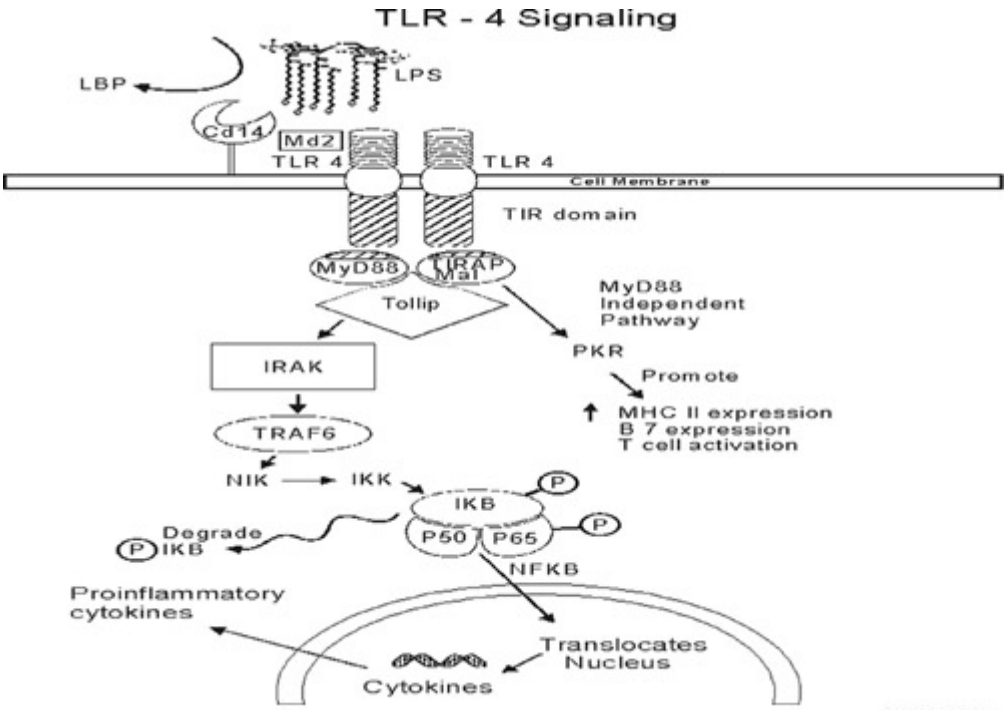


Abb. 6: TLR4-Signalkaskade beim Menschen. Crit Care. 2002; 6 (2): 125-136. doi: 10.1186/cc1471. Published online 2002 February 15. Copyright © 2002 BioMed Central Ltd.

2.5 TLR und Entzündungsreaktionen/Sepsis

Gramnegative Bakterien sind ein häufiger Auslöser septischer Krankheitsbilder. Kommt es zu einer **Meningokokkensepsis** werden drei wesentliche Kaskaden initiiert: Das Komplementsystem, die inflammatorische Antwort sowie die Koagulation/Fibrinolyse. Ob genetische Polymorphismen innerhalb dieser Kaskaden für die Ausprägung einer Sepsis oder eines septischen Schocks verantwortlich sind, wird noch diskutiert. Hierbei spielt der seltene einfache Nukleotidpolymorphismus des Toll-Like-Rezeptors 4 offenbar die größte Rolle [Emonts 2003]. Ein solcher Polymorphismus scheint zudem positive Auswirkungen auf die Atherogenese zu haben [Kiechl 2003]. Die Mutation D299G humaner TLR4 behindert dagegen die Signalübertragung nach Aktivierung mit LPS. Diese wird jedoch von anderen Immunrezeptoren kompensiert, wodurch der Defekt von TLR4 keine signifikante Bedeutung für die Entwicklung und die Folgen einer Sepsis zu haben scheint [Feterowski 2003].
Die Hyperreaktivität der Immunzellen ist eine Ursache für die Entstehung einer schweren Sepsis beim Menschen. Zu dieser kommt es durch Anhäufung von TLR2-Agonisten, die von den Bakterien gebildet werden. Die systemische Gabe monoklonaler Antikörper gegen TLR2 kann im Mausmodell die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren, wie z.B. TNF-α, einschränken und Mäuse somit vor einem schockähnlichen Syndrom bewahren [Guangxun 2004]. Interessant wäre hierbei jedoch eine langfristige Beobachtung der Mäuse, da die Erreger ja nach wie vor im Blut zirkulieren.
Die Bindung eines Pathogen-Assoziierten Molekularen Musters (Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP) an TLR führt neben der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen auch zur Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen und Stickstoff [Werling 2003]. **Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)** und endothelial vorliegende **Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)** besitzen gegenläufige Effekte auf die Regelung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) bei Sepsispatienten. Dies konnte bisher nur in

einem Mausexperiment nachgewiesen werden. Durch Supprimierung der endothelialen Nitroxid-Synthase (NOS) durch die induzierbare Nitroxid-Synthase (iNOS) kommt es nach LPS-Kontakt zu einer verminderten glomerulären Filtration [Schwartz 1997].
Bei der Ausbildung einer Sepsis unterscheidet man zwischen **frühen und späten proinflammatorischen Antworten**; beide werden durch Zytokine vermittelt. Die frühe Antwort (nach ca. 16 Stunden) wird durch TNF-α, die späte durch Moleküle wie z.B. „High Mobility Group B1“ (HMGB1) ausgelöst. Im Mausmodell zeigte sich, dass es bei der frühen Antwort zu einer durch Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) verursachten und von iNOS unabhängigen Dysfunktion der Nieren kommt. Diese Minderperfusion resultiert aus einer Dysbalance zwischen vasokonstriktorischen und vasodilatatorischen Effekten [Knotek 2001].
HMGB1 triggert die (hohe) Letalität der Sepsis. Ethylpyruvat besitzt im Laborexperiment die Möglichkeit, die Expression von HMGB1 zu vermindern. In Makrophagenkulturen konnte Ethylpyruvat die Aktivierung von „p38 Mitogen-Aktivierter Proteinkinase“ und NF-κB unterdrücken [Ulloa 2002]. Dies ist zumindest ein Ansatz für eine mögliche kausale Therapie der Sepsis.
TLR scheinen auch einen Effekt auf die Therapie der Sepsis mit Glukokortikoiden zu haben. Bei Labormäusen, welche keinen TLR4-Rezeptor hatten, konnte auch die Glukokortikoidtherapie nicht anschlagen [Silverstein 2003].

3. Methoden

3.1 Proben

Nach erfolgter Aufklärung wurden den Patienten einige Milliliter Blut entnommen und in eine EDTA-Monovette gefüllt. Innerhalb der darauffolgenden halben Stunde wurden die Proben dann in einem Durchflusszytometer gemessen.
Bestimmt wurde jeweils die Anzahl der Monozyten in der Blutprobe. Eine Aufteilung erfolgte nach ihren Oberflächenproteinen (CD-Moleküle 14 und 16 und deren Ausprägung). Die Abkürzung CD bezieht sich auf den englischen Begriff *cluster determinants* oder *cluster of differentiation;* beides sind Bezeichnungen für die Differenzierungsantigene (Oberflächenproteine) auf der Zelloberfläche von Leukozyten. Es wurden CD14++CD16neg-, CD14+CD16+- sowie CD14+CD16++-Monozyten auf die Expression von HLA-DR, TLR2, TLR4 und TLR3 verglichen. Die TLR4- und TLR3-Expression wurde von uns sowohl extra- als auch intrazellulär gemessen. Des Weiteren wurde der Anteil an CD14+CD16+-Monozyten und die Gesamtzahl der CD14-positiven Zellen in der Blutprobe bestimmt.
Zur in-vitro-Untersuchung der Mikroorganismen wurden die Bakterienstämme aufgetaut, in einer Flüssigkultur angezogen und auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Anschließend wurden Verdünnungsreihen durchgeführt, um jeweils 100 bzw. 10.000 Kolonien der Bakterienstämme zu erhalten. Je 1 ml Vollblut eines gesunden Spenders wurde auf die gekühlte Stammplatte aufgebracht und bei Raumtemperatur drei Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Monozyten separiert, mit Antikörpern markiert und im Durchflusszytometer gemessen. Die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt.

3.2 Extrazelluläres Messverfahren

Der Verarbeitungsvorgang für den Nachweis von extrazellulären Monozytenrezeptoren lief wie folgt ab: Aus dem Blutabnahmeröhrchen wurden 100 µl Vollblut mit jeweils 20 µl CD14-FITC-Lösung und 10 µl CD16-PE-Lösung in verschiedene Reagenzgläschen gefüllt und gut durchmischt. Anschließend wurde Anti-HLA-DR-PE-, TLR2-PE- oder TLR4-PE-Lösung hinzugegeben und vermischt; die Proben wurden dann 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (21°C) inkubiert. Es folgte die Zugabe von 2 ml Lysepuffer und weitere 10 Minuten Inkubation. Danach schloss sich eine 5-minütige Zentrifugationsphase an. Das sich nun absetzende, überschüssige Blutplasma über der rötlichen Phase am Reagenzglasboden wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen. Anschließend wurden zwei Mal je 1 ml Cellwash-Lösung nach einem zwischenzeitlichen Mischvorgang zugegeben. Die Proben wurden nochmals 5 Minuten bei 230 Umdrehungen/Minute (rpm) zentrifugiert. Der Überstand aus lysierten Erythrozyten wurde verworfen. Zu diesem Zeitpunkt enthielten die Proben nur noch die separierten Leukozyten. Diese wurden mit 250 µl Fixierlösung versetzt und kurz aufgeschüttelt. Alle so bearbeiteten Proben wurden mithilfe des „fluoreszenzaktivierten Zellsortierers“ (Fluorescene Activated Cell Sorter, kurz FACS) ausgewertet.

3.3 Intrazelluläres Messverfahren

Jeweils 100 µl Vollblut der Patienten wurden mit jeweils 20 µl CD14-FITC-Lösung und 10 µl CD16-PE-Cy5-Lösung vermischt. Diese Proben wurden dann 15-30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen. Anschließend wurden überschüssige, ungebundene Antikörper mit 4 ml Cellwash-Lösung ausgewaschen und die Proben 5 Minuten bei 1100 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Die überschüssige obere Phase wurde bis auf 50 µl abpipettiert und verworfen. Dem Residuum wurden 100 µl des Reagenz A hinzugefügt. So bearbeitet wurden die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit ruhengelassen und danach nochmals mit 4 ml Cellwash-Lösung versetzt und 5 Minuten zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde wieder bis auf 50 µl abpipettiert, um dann 100 µl des Reagenz B und 20 µl des TLR4-PE oder TLR3-PE hinzuzugeben. Nach wiederholter 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurden 4 ml Cellwash-Lösung hinzugegeben und die Proben 5 Minuten bei 1.100 rpm zentrifugiert. Am Schluss wurde der Überstand abpipettiert und 250 µl Cell-Fix-Lösung dazugegeben.

Aus jeder ausgewerteten Probe wurden 100.000 Zellen (Leukozyten) erfasst, was durchschnittlich 2.000-6.000 Monozyten pro Ansatz bedeutet.

Als Kontrolle wurden Isotypenkontrollen der verwendeten Antikörper durchgeführt. Sämtliche der hier erhobenen Messungen bezogen sich auf diesen Leerwert. Dadurch können negative Einflüsse gewisser Parameter, welche die Fluoreszenzaktivität im FACS beeinflussen (z.B. Verstärkungseinstellungen am FACS-Gerät), minimiert werden.

4. Durchflusszytometrie

Dieses Kapitel gibt einen Einblick in die FACS-Zytometrie.

4.1 Das FACS-Gerät

Im so genannten FACS-Gerät (Fluorescence Activated Cell Sorter), dem fluoreszenzaktivierten Zellsortierer, lassen sich Zellen nach verschiedenen Oberflächenproteinen sortieren und einordnen. Das auch als Durchflusszytometer bezeichnete Gerät misst die relative Partikelgröße, die relative Granularität sowie die relative Fluoreszenz der durchgeschleusten Zellen. Es werden keine Absolutwerte bestimmt, da keine Maßeinheiten vorhanden sind. Die Messungen beziehen sich auf den vorher festgelegten Schwellenwert des Parameters „Partikelgröße“. Dieser Parameter wird benutzt, da hier die Signalstärke am größten ist. Der Schwellenwert dient in erster Linie dazu, störendes Hintergrundrauschen und zu kleine Partikel von der Messung auszuschließen. Ein monoklonaler Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wird, kann in einer gemischten Population die gesuchten Zellen markieren. Das FACS-Gerät kann diese Fluoreszenz darstellen. Die Zellsortierung am Durchflusszytometer führt zu einer Darstellung der Messergebnisse in einem Punkthistogramm, dem so genannten „Dotplot“. Hierbei werden die Größe und die Granularität der Zellen, gemessen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, gegenübergestellt.

4.2 Lichtstreuung

Am größten ist die Lichtstreuung im Winkelbereich von 0° bis 10°. Sie wird Vorwärtsstreulicht (Forward Angle Light Scatter, FSC) genannt. Das FSC-Signal ergibt sich daraus, wie das Vorwärtsstreulicht die Querschnittsfläche der Zellen passiert und gibt somit Auskunft über die relative Zellgröße. Der geringere Anteil des Lichts wird in einem Bereich von 90° seitwärts gestreut (Side Scatter, SSC). Das so gestreute Licht ist ein Maß für die interne Komplexität (Granularität) der Zellen. Es ergibt sich aus der Berechnung des Refraktionsindex (Brechungsindex). Mithilfe dieser Lichtstreuung lassen sich die wichtigsten Leukozytengruppen wie Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten gut voneinander abgrenzen. Im Punkthistogramm ist diese Differenzierung grafisch dargestellt.

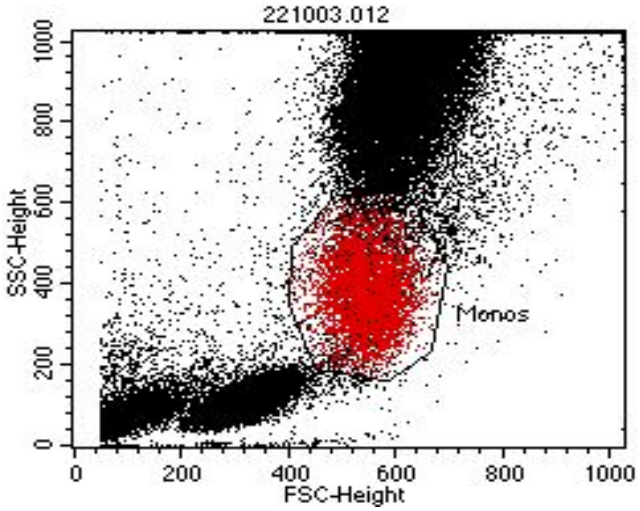


Abb. 7: Darstellung einer Leukozytenprobe im sog. „Dotplot“. Im Vorwärtsstreulicht (FSC-Height) wird die Zellgröße, im Seitwärtsstreulicht (SSC-Height) die Granularität der Zellen erfasst. Die rot markierte Zellansammlung (Monos) zeigt die Monozytengesamtpopulation.

4.3 Hydrodynamische Fokussierung

Die Darstellung der Monozytensubpopulation mit den gesuchten Oberflächenantigenen geschieht durch ein Anfärbeverfahren mit einem monoklonalen, fluoreszenzmarkierten Antikörper. Zellen, die mit diesen Antikörpern markiert sind, werden im FACS-Gerät mit Überdruck in eine Messkammer geleitet. In dieser verbindet sich die Suspension mit einer laminar, koaxial strömenden Trägerflüssigkeit. Dabei wird die Strömung zum Zentrum der Messküvette hin verengt, was den Partikeltransport beschleunigt. Dadurch werden die Zellen in der Mitte des Probenstromes fokussiert und können von einem Laser einzeln gemessen werden.

4.4 Fluoreszenzmessung

Zur Erfassung der Fluoreszenz wurde bei uns der luftgekühlte Argonlaser mit einer Emissionslinie von $\lambda = 488$ nm verwendet. Das heißt, dass die zu verwendenden Fluorochrome alle bei $\lambda = 488$ nm Licht absorbieren müssen, um vom FACScan®-Gerät erfasst zu werden. Fluoreszein (FITC) und R-Phytoerythrin (PE) besitzen ihre maximale Absorption in diesem Bereich. Wichtig zur Unterscheidung der einzelnen Farbstoffe ist der so genannte „Stokes Shift“. Dieser lässt sich aus der Differenz des Absorptionsspektrums und des Emissionsspektrums der Farbstoffe errechnen. Zur Unterscheidung der markierten Zellen ist ein unterschiedlich hohes Energieniveau des Emissionsspektrums nötig. Die von uns verwendeten Farbstoffe emittieren wie folgt: FITC bei 525 nm und PE bei 578 nm. Die Wellenlängen der Emission sind hierbei länger als die der Absorption, da beim Durchtritt durch die Zellen Energie verbraucht wird.
Das FACS-Gerät kann die Fluoreszenz- und Streuungssignale mit „Photomultiplier Tubes“ (Photoverstärkern für SSC) registrieren und mit einer Photodiode (registriert FSC) aufnehmen. Diese Signale werden elektronisch verstärkt und in einem Analog-Digital-Wandler (ADC) in von einem PC lesbare Kanäle umgewandelt.

4.5 Darstellung der Messungen

Eine exemplarische Darstellung der FACS-Messungen ist in Abbildung 8 zu sehen. Zu erkennen sind die drei unterschiedlichen Populationen der Monozyten: CD14++CD16neg.-, CD14+CD16+- sowie CD14+CD16++- Monozyten. Hierbei steht jeder einzelne Punkt für einen gemessenen Monozyten aus der Probenküvette. Der Computer errechnet die Expressionshöhe (die Mediane) für die jeweiligen Monozyten. Darauf beruhen die von uns verwerteten Daten in dieser Arbeit.

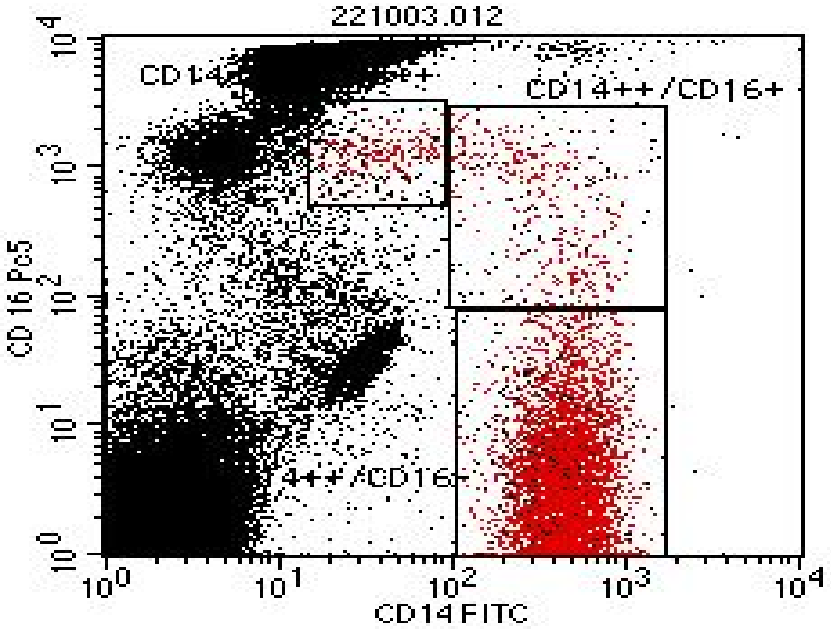


Abb.8: In diesem Dotplot sind alle vom Durchflusszytometer erfassten Zellen aufgetragen. Die Monozyten können aus der Grafik herausgefiltert werden und sind so getrennt von den restlichen gemessenen Zellen darstellbar.

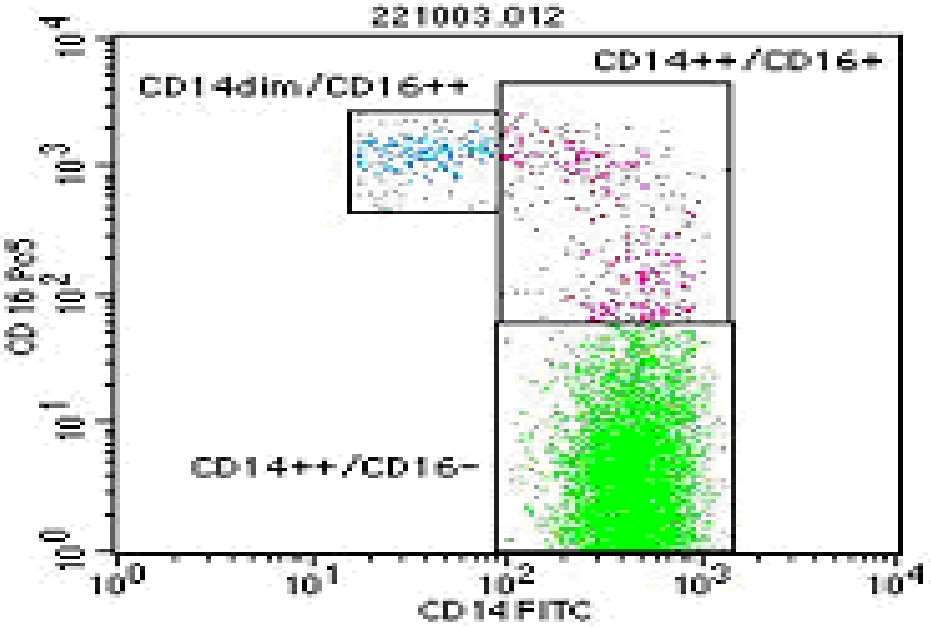


Abb. 9: Darstellung einer Monozytenwolke aus Abb.7. Man erkennt ein deutliches Verteilungsmuster der farbig markierten Monozytensubpopulationen.

4.6 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der im FACS-Gerät gemessenen Daten wurde das Statistikprogramm SPSS benutzt. Die Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte der unterschiedlichen Patientengruppen wurden ermittelt. Die Ergebnisse der Mediane wurden untereinander mit einem Mann-Whitney-Test (U-Test) auf die statistisch signifikante Irrtumswahrscheinlichkeit hin überprüft. Dieser Test wurde angewandt, da es sich um nicht-normalverteilte Messwerte handelt (d.h. Median und Mittelwert sind nicht identisch). Der Mann-Whitney-Test ist ein nicht-parametrischer Test zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben.
Beim Vergleich mehrerer Gruppen (z.B. Kapitel 7.1) wurde vorher der Kruskal-Wallis Test angewandt. Dieser ermittelt, ob zwischen den untersuchten Gruppen überhaupt ein signifikanter Unterschied besteht. Anschließend wurden die einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Dazu wurde der Mann-Whitney-Test (U-Test) angewandt. Im Anschluss wurde ein Bonferroni-Holm-Test durchgeführt. Beim Vergleich mehrerer Gruppen besteht das Problem des „Multiplen Testens“, d.h. allein durch die erhöhte Anzahl der gestellten Vergleiche kommt es mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vor, dass man ein signifikantes Ergebnis erhält und fälschlicherweise eine gültige Nullhypothese ablehnt. Der Bonferroni-Holm-Test reduziert die Wahrscheinlichkeit, eine der Nullhypothesen fälschlicherweise abzulehnen, auf das vorgegebene Niveau der Irrtumswahrscheinlichkeit.
In der Verlaufsbeurteilung von HD-Patienten vor und nach Dialyse wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt, da es sich hierbei um nicht-normalverteilte, verbundene Stichproben handelt.

Als Signifikanzgrenze wurde eine zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgelegt.

5. Materialien

- FACScan® Gerät der Firma Becton Dickinson, Gerät IC-Nr. 2620,
  Geräte Serien Nummer: 82766
- FACStation®, Software, Version 3.4 von BD Biosciences
- BD Cell Quest Pro®, Software, Version 4.0.2
- Zentrifuge Universal 16 von Hettich
- Vibrofix VF1 von Janke und Kunkel
- EDTA-Monovetten, S-Monovette von Sarstedt
- SPSS®, Versionen 12.0.1, 13.0.1 und 14.0.1
- MS Office® und Open Office

Antikörper:

- CD14 FITC von Becton Dickinson
(#345784, Klon MϕP9, Chargen: 29326, 65702, 71150, 72644, 81155, 85655)
- Anti-HLA-DR PE von Becton Dickinson
(#347367, Klon L243, Chargen: 62200, 71117, 76690, 84749)
- CD16 PE von Becton Dickinson
(#347617, Klon B73.1 Chargen: 50230, 59306)
- CD16 PE-Cy 5 von Becton Dickinson
(#555408, Klon 3G8, Charge: 64565)
- CD16 PC 5 von Coulter
(#PNIM2642, Klon 3G8, Chargen: 9, 10, 12)
- TLR2 PE von ebioscience
(#12-9922, Klon TL2.1, Chargen: E005659, E006528, E009905)
- TLR3 PE von Biocarta
(Klon 40C1285 und TLR3.7, Chargen: 021903-40C1285-D, E011956, AB032404A)
- TLR4 PE von ebioscience
(#12-9917, Klon HTA 125, Chargen: E007134, E007135, E008741, E 0110031)
- Isotyp Kontrollen mit Mouse IGG1, K CY-CHROME (633818X, Charge: 30586) und Mouse IGG2B, K FITC (G33804X, Charge: 0000074973) von Becton Dickinson

Mikroorganismen:
- Escherichia Coli (Migula 1895), Castellani and Chalmers 1919, DSM No. 1103,
  ATCC 25922 von DSMZ
- Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach 1884, DSM No. 1104,
  ATCC 25923 von DSMZ

Fixationslösung:
- Fixperm von Caltag Laboratories, Product Code: GAS-003
- Fixperm von An der Grub Bio Research GmbH, Cat.-Nr.: GAS-002

sonstige Reagenzien:
- Reagenz A von An der Grub Bio Research GmbH, Österreich
- Reagenz B von An der Grub Bio Research GmbH, Österreich

6. Patienten

6.1 Daten

Die ausgewerteten Daten stammen alle von Patienten und Patientinnen aus dem Kuratorium für Hämodialyse in München Harlaching, Seybothstraße 75, 81545 München. Außerdem wurden Daten von der Station 1N des Klinikums München Harlaching, Sanatoriumsplatz 2, 81545 München, eruiert. Sämtliche Patienten nahmen freiwillig an unseren Studien teil. Die Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer in München stimmte der Durchführung unserer Studien zu.
Die Patienten wurden abhängig von ihrer Krankheit in Gruppen unterteilt. Gruppe 1 steht dabei für Normalpersonen, also die Vergleichsgruppe. Gruppe 2 bezeichnet die Patienten, die chronisch an den Nieren erkrankt sind, d.h. einen Kreatininwert von über 1,2 mg/dl besitzen, jedoch noch keine Dialysebehandlung oder ein Transplantat benötigen. Gruppe 3 bezeichnet Patienten, welche eine erfolgreiche Nierentransplantation erhalten haben und innerhalb eines Jahres keine Transplantatabstoßung zeigten. Gruppe 4 besteht aus Patienten, die seit mindestens einem Jahr hämodialysiert wurden.

6.2 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv bei der extrazellulären TLR4-Messung bestand aus 19 gesunden Personen im Alter zwischen 19 und 71 Jahren. Der Altersmedian betrug 30 Jahre, der Mittelwert 34,6 Jahre. Beteiligt waren zwölf Männer und sieben Frauen. Der Altersmedian beider Gruppen betrug jeweils 30 Jahre (Mittelwert Männer: 33,63 Jahre, Mittelwert Frauen: 35,71 Jahre). Der prozentuale Anteil der CD14/16-Membranproteine lag mit 8,76 % innerhalb der von anderen Forschergruppen ermittelten 7,3 +/- 3,1 % [Tanaka 1999]. Der Kreatinin- und CRP-Wert wurde auf die oberen laborchemischen Grenzwerte (Kreatinin 1,2 mg/dl bzw. CRP 0,3 mg/dl) festgesetzt.
Das Kontrollkollektiv der intrazellulären TLR4-Messung setzte sich aus sechs Männern und sieben Frauen zusammen. Der Altersmedian in dieser Kohorte betrug 29 Jahre, der Mittelwert 32,61 Jahre. Der Altersmedian bei den Frauen betrug 30 Jahre (Mittelwert: 35,85 Jahre), bei den Männern 25,5 Jahre (Mittelwert: 28,83 Jahre). Es nahmen Probanden zwischen dem 19. und 52. Lebensjahr teil. Der prozentuale Anteil von CD14+CD16+-Zellen wurde hier mit dem Median 6,55 % für die gesamte Gruppe ermittelt und lag somit auch noch innerhalb der Ergebnisse der Forschergruppe um Okamoto. Diese beziffern diesen Bereich mit 5,8 +/- 2,8 % [Okamoto 2003].

6.3 Ausschlusskriterien

Für die gesunde Vergleichsgruppe galten folgende Vorgaben: Kein aktueller Infekt, keine infektiöse Grunderkrankung und keine chronischen Leiden/Malignome.
Nierenkranke unter Glukokortikoidtherapie wurden, mit einer Ausnahme (siehe 6.7.6), von der Studie ausgeschlossen. Proben mit zu hohem Zellverlust bei Messungen im FACS wurden ebenfalls verworfen.

6.4 Patienten mit Nierenerkrankungen

Hierunter fallen Patienten mit **chronischer Niereninsuffizienz** bei denen eine Transplantation oder Dialysetherapie noch nicht angezeigt ist. Diese Patienten weisen einen Kreatininwert von mindestens 1,2 mg/dl auf. Die Daten von 19 Patienten wurden ausgewertet, davon neun Frauen und zehn Männer. Der Altersmedian betrug 57 Jahre. Bei den Männern betrug er 59 Jahre (Mittelwert: 62,5 Jahre), bei den Frauen 54 Jahre (Mittelwert: 49 Jahre). Der Mittelwert dieser Patientengruppe betrug 56,1 Jahre. Die Probanden waren im Alter von 26 bis 91 Jahren.

Tab. : Diagnosen der Patienten mit Nierenerkrankungen.

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose
1	männlich	80	Chronische, dekompensierte Niereninsuffizienz bei art. Hypertonus. Z.n. Prostatektomie, latente Hypothyreose, Struma nodosa links
2	weiblich	60	Chronische Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention bei paraneoplastischer Nephropathie
3	männlich	85	Chronische, dekompensierte Niereninsuffizienz bei myeloproliferativem Syndrom
4	weiblich	48	Debre-Toni-Fanconi Syndrom
5	weiblich	64	Chronische Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention bei art. Hypertonus. Renale Anämie
6	weiblich	26	Tuberöse Sklerose (M. Bourneville-Pringle)
7	männlich	57	Nephrotisches Syndrom
8	männlich	38	Interstitielle Nephritis
9	männlich	56	Retroperitonealfibrose (M. Ormond)
10	männlich	55	Chronische Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention bei Einzelniere links
11	weiblich	29	Systemischer Lupus Erythematodes
12	männlich	61	Membranöse Glomerulonephritis
13	weiblich	77	Diabetische Nephropathie
14	männlich	62	Chronische Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention bei V.a. interstitielle Nephritis. Art. Hypertonus
15	männlich	40	Dekompensierte chronische Niereninsuffizienz bei Einzelniere links nach Tumornephrektomie
16	weiblich	58	Interstitielle Nephritis
17	weiblich	25	Rechtsseitiger Nierentumor
18	weiblich	54	Perimembranöse Glomerulonephritis
19	männlich	91	Chronische Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention bei Nephrosklerose. Absolute Arrhythmie

6.5 Patienten nach Nierentransplantation

Zu dieser Gruppe zählen Patienten, welche eine erfolgreiche Nierentransplantation erhielten. Als erfolgreich wurde die Transplantation angesehen, wenn die Patienten im Jahr eins nach Transplantation **keine Abstoßungsreaktion** zeigten. Bei dieser Patientengruppe untersuchten wir 28 Patienten, die sich in 17 Männer und elf Frauen aufteilen ließen. Der Altersmittelwert lag bei 53,5 Jahren, der Median bei 55,5 Jahren. Die Patienten waren im Alter von 25 bis 75 Jahren. Bei den Frauen betrug der Altersmedian 55 Jahre (Mittelwert: 54,6 Jahre) und bei den Männern 55,5 Jahre (Mittelwert: 52,89 Jahre).

6.6 Patienten unter Hämodialysebehandlung

Ausgewertet wurden Daten von 29 Patienten, darunter 11 Frauen. Alle Patienten waren **seit mindestens einem Jahr** an der Dialyse. Die Probanden befanden sich im Alter zwischen 29 und 81 Jahren, was zu einem Mittelwert von 57,96 Jahren führte (Median: 59 Jahre). Bei den Männern betrug der Median 56,5 Jahre (Mittelwert = 55,94 Jahre) und bei den Frauen 65 Jahre (Mittelwert: 60,27 Jahre). 13 dieser Patienten hatten einen Diabetes mellitus Typ II (NIDDM).

6.7 Patientenkohorten der einzelnen Messungen

6.7.1 Verhalten inflammatorischer Monozyten und ihrer Oberflächenrezeptoren bei verschiedenen Krankheitsgruppen

Verglichen wurden 13 gesunde Probanden, 19 chronisch Nierenkranke, 28 Nierentransplantierte und 29 Hämodialysepatienten (s. Kapitel 6.6) auf deren HLA-DR-, TLR2- und TLR4-Expressionen auf CD14++CD16neg.-, CD14+CD16+- und CD14+CD16++-Monozyten. Weiterhin wurden die Gesamtzahl der CD14-Monozyten, der Anteil an CD14+CD16+-Monozyten, das Serumkreatinin und das C-reaktive Protein der Patienten bestimmt. Ziel dieser Studie war es, zu evaluieren, wie die definierten Monozytensubpopulationen und membrangebundene Oberflächenantigene bei den einzelnen Patientengruppen exprimiert werden.

6.7.2 Vergleich humoraler und zellulärer Inflammationsmarker bei HD-Patienten mit unterschiedlichen Gefäßzugängen

Diese Studie enthält Routinelabordaten von 28 Patienten, die einen Kunstgefäßshunt (PTFE-Shunt) erhielten, in Gegenüberstellung zu 31 Patienten, die mit einer AV-Fistel (Ciminoshunt) versorgt wurden. Von 21 PTFE-Shunt-Patienten und 16 Patienten mit AV-Fistel haben wir die Blutmonozyten im FACS-Gerät bestimmt. Die Patienten mit PTFE-Shunt waren im Mittel 65,31 Jahre alt (Median: 69,5 Jahre). Der Altersmedian der Frauen lag bei 70 Jahren, der der Männer bei 71 Jahren. Patienten mit AV-Fistel hatten einen Altersdurchschnitt von 59,31 Jahren und einen Median von 61,5 Jahren (Frauen: 67 Jahre, Männer: 61 Jahre). Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob eine der beiden Shuntarten aus mikroinflammatorischer Sicht überlegen ist.

Tab. 2: Charakteristik der untersuchten Dialysepatienten. In Klammern jeweils die Anzahl der Patienten. Hkt = Hämatokrit; Hb = Hämoglobin; CRP = C-reaktives-Protein.

	Alter in Jahren	**CRP in mg/dl**	**Stationäre Behandlungen seit 2003**	**Anzahl Patienten mit NIDDM**	**Hkt in %**	**Hb in mg/dl**
Kunstgefäßpatienten (29)	69,5 +/-15,39	0,9 +/-0,55	3 +/- 2,78	8	35,25 +/- 6,42	11,5 +/- 2,09
weiblich (22 Pat.)	70 +/-12,67	0,9 +/-0,48	3 +/- 3,11	5	35,05 +/- 2,88	11,5 +/- 0,94
männlich (7 Pat.)	71 +/- 13,5	1,2 +/-0,63	3 +/- 1,91	3	36,7 +/- 3,09	12,15 +/- 0,95
Cimino Shunt Patienten (30)	61,5 +/- 14,7	0,52 +/-0,52	0 +/- 1,15	5	34,29 +/- 6,17	10,94 +/- 2,01
weiblich (10)	67 +/-12,51	0,4 +/-0,11	0 +/- 0,3	2	34,3 +/- 1,79	10,9 +/- 0,49
männlich (20)	61 +/-13,02	0,62 +/- 0,6	0,5 +/-1,36	3	34,3 +/- 3,11	11 +/- 0,99
Angegeben ist jeweils der Median						

6.7.3 Vergleich inflammatorischer Marker bei Tages- und Nachtdialysepatienten

Von 13 Personen mit Nachtdialyse und 13 Personen mit Dialyse am Tag wurden Monozytenmessungen durchgeführt. Ziel war es, herauszufinden, ob zwischen den beiden unterschiedlich langen Dialyseverfahren Unterschiede in der Monozytenexpression und/oder bei Routinelaborparametern (z.B. CRP) existieren.
Die durchschnittliche Dauer der Nachtdialyse beträgt acht Stunden, die der Tagesdialyse viereinhalb Stunden. Sämtliche Patienten befanden sich **seit mindestens einem Jahr** in der jeweiligen Dialyseschicht und waren zum Zeitpunkt der Untersuchung frei von Infekten.

6.7.4 Vergleich der intra- und extrazellulären Expression des TLR4-Rezeptors

Blutproben von 13 gesunden Probanden, 28 Dialysierten, 13 chronisch Nierenkranken und 28 Nierentransplantierten wurden verglichen. Bei den Ergebnissen handelt es sich um eine der ersten In-vivo-Beschreibungen einer intrazellulären TLR4-Expression. Das Ziel dieser Messungen war es, herauszufinden, ob durch eine Permeabilisierung der Monozytenmembran eine TLR4-Expression innerhalb der Monozyten messbar ist.

6.7.5 HLA-DR und TLR3 bei virusinfizierten (HBV, HCV) Dialysepatienten

Verglichen wurden die Daten von vier Dialysepatienten mit HBV-Infektion, vier mit HCV-Infektion und zwei Dialysepatienten mit kombinierter HBV-und HCV-Infektion. Weiterhin wurde die TLR3-Expression bei gesunden Probanden gemessen. Eventuell nachweisbare Expressionsunterschiede der TLR, ausgelöst durch DNA- bzw. RNA-Viren, sollten nachgewiesen werden.

6.7.6 HLA-DR- und TLR-Expression unter immunkompromittierten Bedingungen

Bei dieser Studie untersuchten wir 13 gesunde Probanden, 8 nephrologische Patienten unter Glukokortikoidtherapie, 13 nephrologische Patienten ohne Glukokortikoidtherapie sowie 29 Hämodialysepatienten. Ziel dieser Studie war es, die Auswirkung einer Glukokortikoidtherapie auf die Expression von Oberflächenantigenen der Monozyten zu beurteilen.

6.7.7 HLA-DR- und TLR-Expression bei erhöhten humoralen Entzündungsparametern

Mit dieser Studie wollten wir untersuchen, wie TLR bei pathologisch erhöhten sowie bei normalen CRP-Werten auf proinflammatorischen Monozyten innerhalb der verschiedenen Patientengruppen exprimiert werden. Dazu haben wir die Patientenkohorten in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe bestand aus Patienten mit einem CRP-Wert unter 0,5 mg/dl; Patienten der anderen Gruppe mussten einen CRP-Wert größer 1 mg/dl besitzen. Der Gruppe mit CRP < 0,5mg/dl waren 18 Dialysepatienten, acht Nierenkranke und 21 Nierentransplantierte zugeteilt. In der Gruppe mit CRP > 1 mg/dl befanden sich acht Dialysepatienten, fünf Nierenkranke und fünf Nierentransplantierte.

6.7.8 HLA-DR und TLR bei vermehrter Retention

Diese Studie sollte untersuchen, ob es bei unterschiedlichem Retentionsstatus zu abweichender TLR-Expression kommt. Die beiden Gruppen wurden aufgeteilt nach einem Kreatininwert von 1,3 bis 3 mg/dl (sechs Nierenkranke und 16 Nierentransplantierte) und zwischen 3,01 und 8 mg/dl (acht Nierenkranke und drei Nierentransplantierte).

6.7.9 Expression proinflammatorischer Monozyten bei Nierentransplantierten mit Transplantatdysfunktion

Mit dieser Studie wollten wir den Status der proinflammatorischen Parameter bei Patienten mit einer **Nierentransplantation und anschließendem Transplantatversagen** dokumentieren und mit dem der HD-Patienten und Nierentransplantationspatienten vergleichen. Hierzu wurden folgende Patientengruppen untersucht: Patienten mit erfolgreicher Nierentransplantation (28), Patienten mit Transplantatabstoßung und erneuter Dialyse (6) sowie Dialysepatienten ohne vorherige Transplantation (29)

6.7.10 Vergleich von HLA-DR sowie TLR vor und nach einer Dialysesitzung

Bei fünf Patienten wurden Blutproben jeweils unmittelbar vor und nach einer Dialysesitzung untersucht. Verglichen wurde die Expression von Oberflächenmolekülen auf definierten Monozytensubpopulationen zu beiden Zeitpunkten.

6.7.11 Immunzytologische Verlaufsbeobachtung definierter Krankheitsbilder

Bei zwei Patienten wurde über zwei Jahre die Expression der Oberflächenmoleküle peripherer Blutmonozyten wiederholt gemessen. Hierbei lassen sich die Reaktionen der TLR und HLA-DR (z.B. durch Medikamente) gut nachweisen und dokumentieren. Patient 1 ist ein 67-jähriger nierentransplantierter Patient, der gegen Ende der Untersuchungsperiode eine Abstoßungsreaktion gegen die Transplantatniere zeigte und wieder dialysepflichtig wurde. Patient 2 ist eine 56-jährige Patientin mit im beobachteten Verlauf aufgetretener interstitieller Nephritis.

7. Ergebnisse

7. 1 Verhalten inflammatorischer Monozyten und ihrer Oberflächenrezeptoren bei verschiedenen Krankheitsgruppen

7.1. 1 Totale CD14 Expression auf Monozyten

Tab. 3: Gruppenvergleich der gesamten Expression von CD14+-Monozyten. In Klammern die Anzahl der Patienten. MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung. Max/Min=gemessene Maximal- bzw. Mindestwerte.

	Median	MW	SD	Max	Min
Normalpersonen (13)	453,16	458,43	59,06	577,72	378,55
Nierenkranke (19)	365,17	424,34	184,65	1064,99	238,87
Nierentransplantierte (28)	371,81	391,78	93,52	685,39	254,83
Hämodialysierte (29)	433,23	450,29	92,21	798,63	352,27

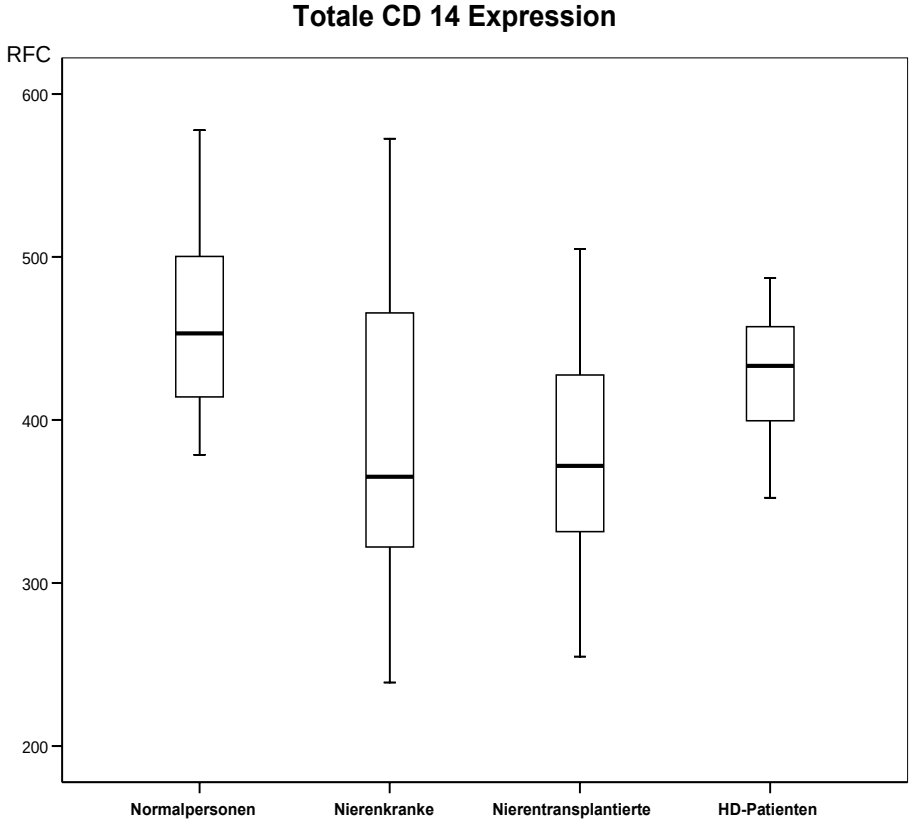


Abb. 10: Gruppenvergleich aus Tab. 3. Angaben in RFC (Relative Fluoresceine Counts; Parameter zur Erhebung der Anzahl von Monozytensubpopulationen einer Blutprobe). Nierentransplantierte exprimierten signifikant weniger CD14-Monozyten als Gesunde oder Dialysepatienten:

Totale CD14 Expression	Zweiseitige Signifikanz p=
Normalpersonen und Nierentransplantierte	**0,0028**
Nierentransplantierte und Hämodialysepatienten	**0,0021**

Bei Nierentransplantierten ließen sich weniger CD14-Zellen im Blut nachweisen als beispielsweise bei Gesunden oder auch HD-Patienten. Dies ist am ehesten auf die therapiebedingte Immunsuppression zurückzuführen. Die meisten CD14-Zellen waren im Blut von Gesunden nachzuweisen.

7.1.2 HLA- DR CD14++CD16neg.

Tab. 4: HLA-DR Expression auf CD14++CD16neg.-Zellen, gemessen im FACS-Gerät als RFC (Relative Fluorescence Counts). Die Zahl in Klammern zeigt die Patientenzahlen.

	Median	MW	SD	Max	Min
Normalpersonen (13)	820,47	843,8	317,33	1526,14	399,54
Nierenkranke (19)	478,29	526,47	298,67	1186,37	122,98
Nierentransplantierte (28)	577,72	607,33	246,61	1274,88	214,8
Hämodialysierte (29)	655,25	625,63	218,13	1009,04	210,02

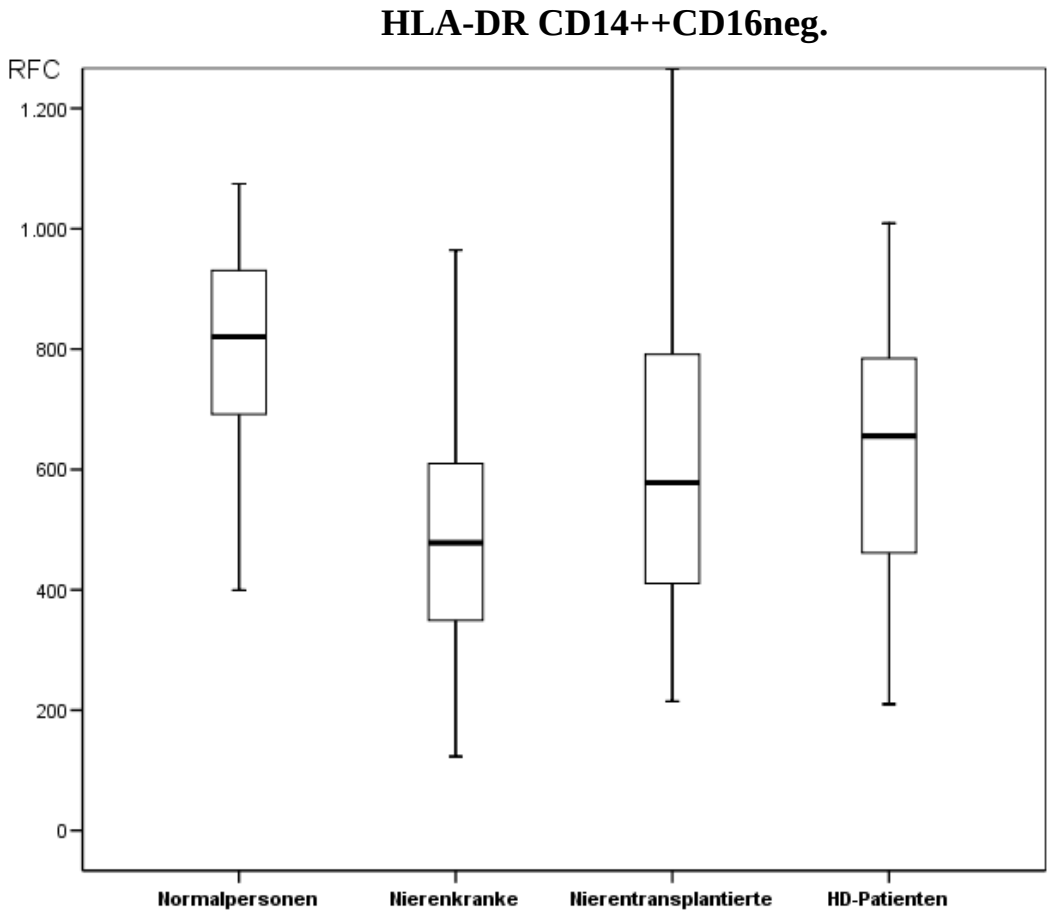


Abb.11: HLA-DR Expression auf CD14++CD16neg.-Monozyten bei verschiedenen Patientengruppen.
Die folgenden Gruppen unterschieden sich hierbei signifikant voneinander: Nierentransplantierte, Nierenkranke und HD-Patienten exprimierten signifikant weniger HLA-DR auf CD14++CD16neg.-Monozyten als Gesunde:

HLA-DR CD14++CD16neg.	Zweiseitige Signifikanz p=
Normalpersonen und Nierenkranke	**0,005**
Normalpersonen und Nierentransplantierte	**0,016 ***
Normalpersonen und Hämodialysierte	**0,046 ***

* = Ergebnis nach Anwendung des Bonferroni-Holm-Tests nicht mehr signifikant. Im direkten Mann-Whitney-Vergleich zeigte sich noch ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweils einzelnen Gruppen.

7.1.3 HLA-DR CD14+16+

Tab. 5: HLA-DR Expression der CD14+CD16+-Monozyten.

	Median	MW	SD	Max	Min
Normalpersonen (13)	5376,12	5689,43	1356,13	9181,01	3924,19
Nierenkranke (19)	4216,97	4255,49	2287,25	8353,63	784,39
Nierentransplantierte (28)	3928,16	4300,93	1641,68	7498,94	1280,62
Hämodialysierte (29)	5186,13	5063,91	1908,16	9646,62	1394,86

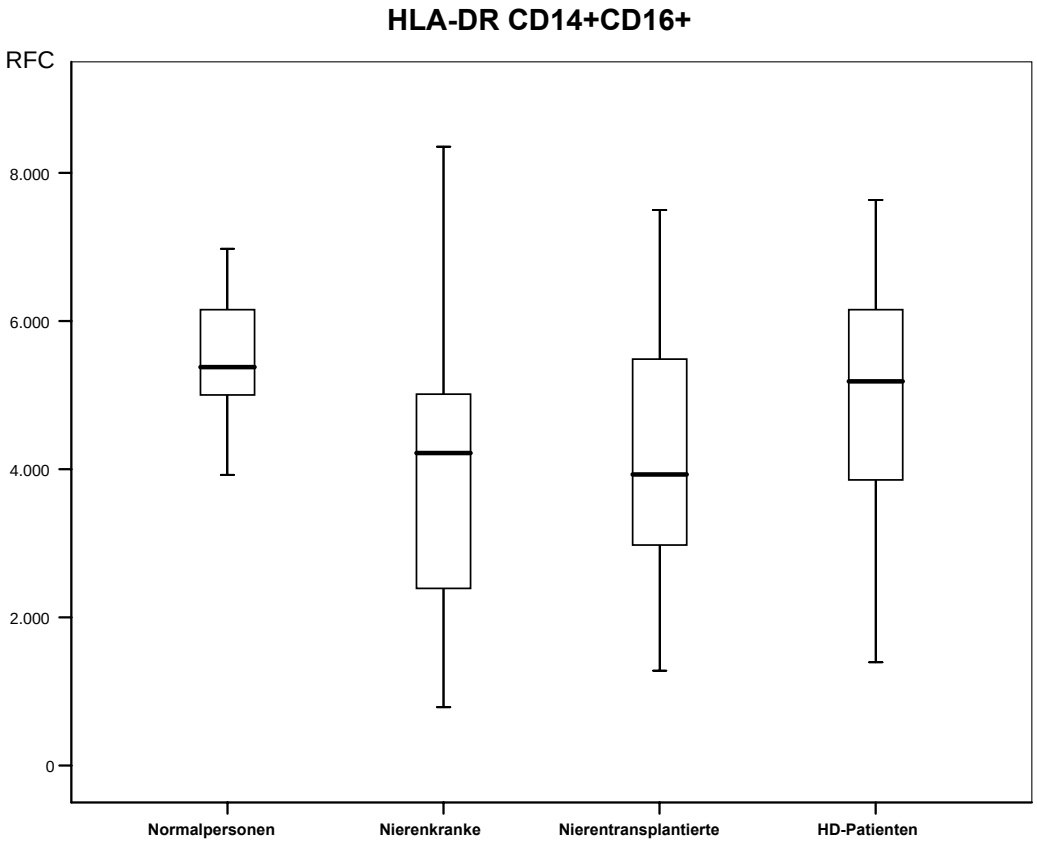


Abb.12: Gemessene HLA-DR auf CD14+CD16+-Monozyten der unterschiedlichen Patientengruppen. Nierentransplantierte und Nierenkranke exprimierten signifikant weniger HLA-DR auf diesen Zellen als Gesunde:

HLA-DR CD14+16+	Zweiseitige Signifikanz p=
Normalpersonen und Nierenkranke	**0,024***
Normalpersonen und Nierentransplantierte	**0,016***

* = Ergebnis nach Anwendung des Bonferroni-Holm-Tests nicht mehr signifikant. Im direkten Mann-Whitney-Vergleich zeigte sich noch ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweils einzelnen Gruppen.

7.1.4 TLR4 intrazellulär CD14+CD16+

Tab. 6: Expression intrazellulärer TLR4 der CD14+CD16+-Monozyten.

	Median	MW	SD	Max	Min
Normalpersonen (13)	15,26	18,78	11,90	53,76	6,74
Nierenkranke (19)	18,77	18,53	8,08	40,32	3,82
Nierentransplantierte (28)	23,90	27,40	18,32	73,65	1,60
Hämodialysierte (29)	23,71	34,35	25,56	112,4	10,65

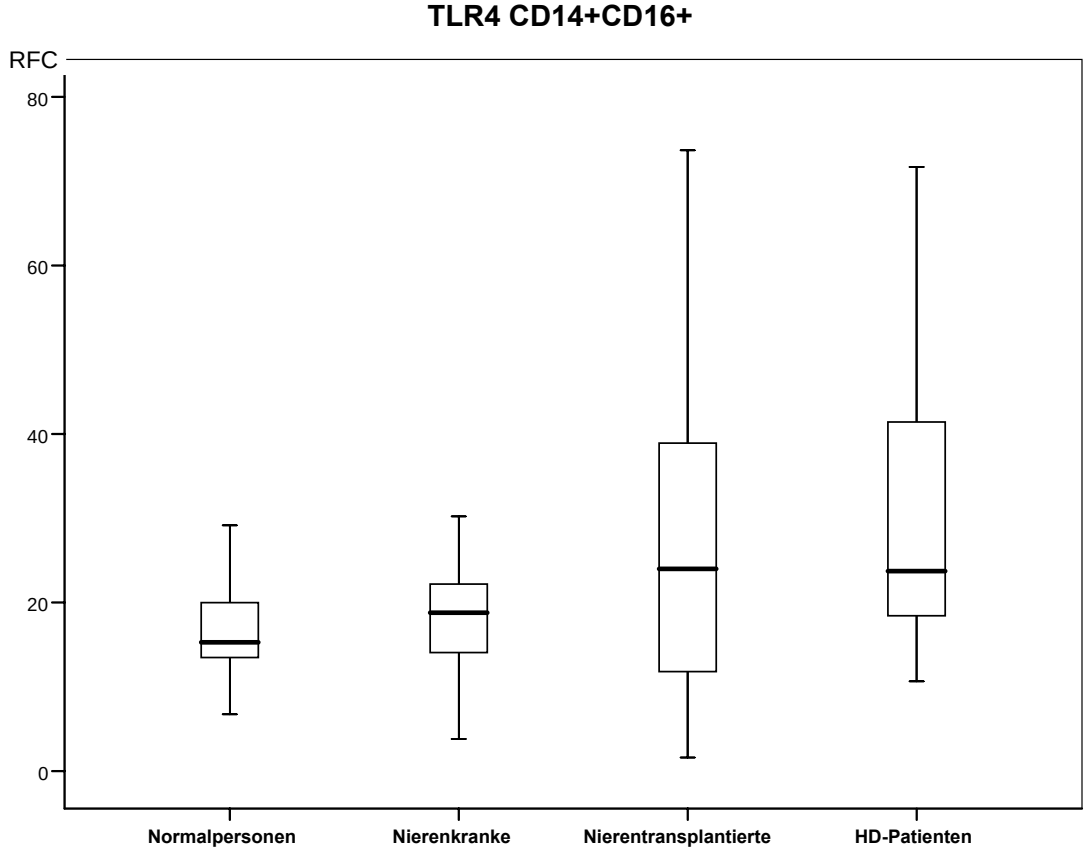


Abb. 13: Verteilung intrazellulärer TLR4-Rezeptoren auf CD14+CD16+-Monozyten der untersuchten Gruppen. CD14+CD16+-Zellen von HD-Patienten zeigten eine signifikant erhöhte TLR4-Expression als Gesunde. Nierentransplantierte exprimierten signifikant mehr TLR4 auf CD14+CD16+-Monozyten als Nierenkranke:

TLR4i CD14+CD16+	Zweiseitige Signifikanz p=
Normalpersonen und Hämodialysierte	**0,004**
Nierenkranke und HD-Patienten	**0,006**

Bei Gesunden wurde auf proinflammatorischen CD14+CD16+-Zellen die TLR4-Expression wieder herunterreguliert. Eine solche Anpassung fand sich bei regelmäßig antigenexponierten Dialysepatienten nicht.

7.1.5 TLR4 intrazellulär CD14+CD16++

Tab. 7: Intrazelluläre TLR4-Expression der CD14+CD16++-Monozyten.

	Median	MW	SD	Max	Min
Normalpersonen (13)	10,18	15,14	14,12	54,25	2,57
Nierenkranke (19)	14,66	12,99	5,99	22,88	1,00
Nierentransplantierte (28)	22,02	23,61	16,50	63,78	1,00
Hämodialysierte (29)	22,70	36,67	32,77	119,71	3,00

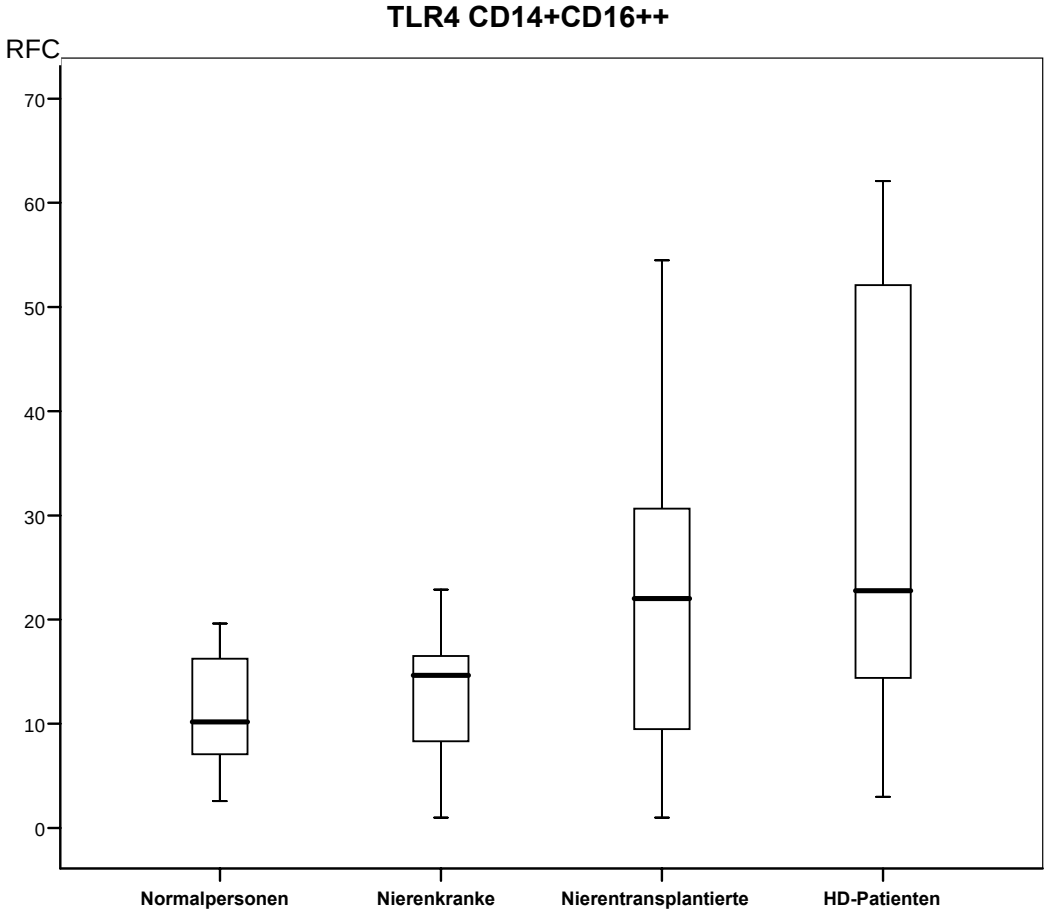


Abb. 14: CD14+CD16++-Monozyten und deren Toll-Like-Rezeptor4 Expression (intrazelluläre Komponente) bei unterschiedlichen Patientengruppen. HD-Patienten exprimierten signifikant mehr TLR4 in CD14+CD16++-Zellen als Gesunde oder Nierenkranke. NTX-Patienten exprimierten mehr TLR4 als Nierenkranken:

TLR4i CD14+CD16++	Zweiseitige Signifikanz p=
Normalpersonen und Hämodialysierte	**0,008**
Nierenkranke und Nierentransplantierte	**0,012**
Nierenkranke und Hämodialysierte	**0,002**

Analog zu den CD14+CD16+-Zellen exprimierten HD-Patienten auch auf den CD14+CD16++-Zellen am meisten TLR4. Im Vergleich zu anderen Krankheitsgruppen exprimierten die chronisch niereninsuffizienten Patienten am wenigsten TLR4 auf CD14+CD16+- und CD14+CD16++-Zellen. Durch eine fehlende Induktion dieser TLR kommt es zu einer ungenügenden Immunantwort und der Verlauf einer chronischen Erkrankung kann sich verschlechtern.

7.1.6 Anteil der CD14+CD16+-Monozyten

Tab.8 : Vergleich des Anteils von CD14+CD16+-Monozyten an der Monozytengesamtpopulation

	Median	MW	SD	Max	Min
Normalpersonen (13)	6,55	6,51	1,55	8,84	3,6
Nierenkranke (19)	7,79	8,73	4,75	18,81	2,50
Nierentransplantierte (28)	8,72	10,88	6,71	29,11	3,03
Hämodialysierte (29)	14,69	13,16	5,54	21,74	2,23

.

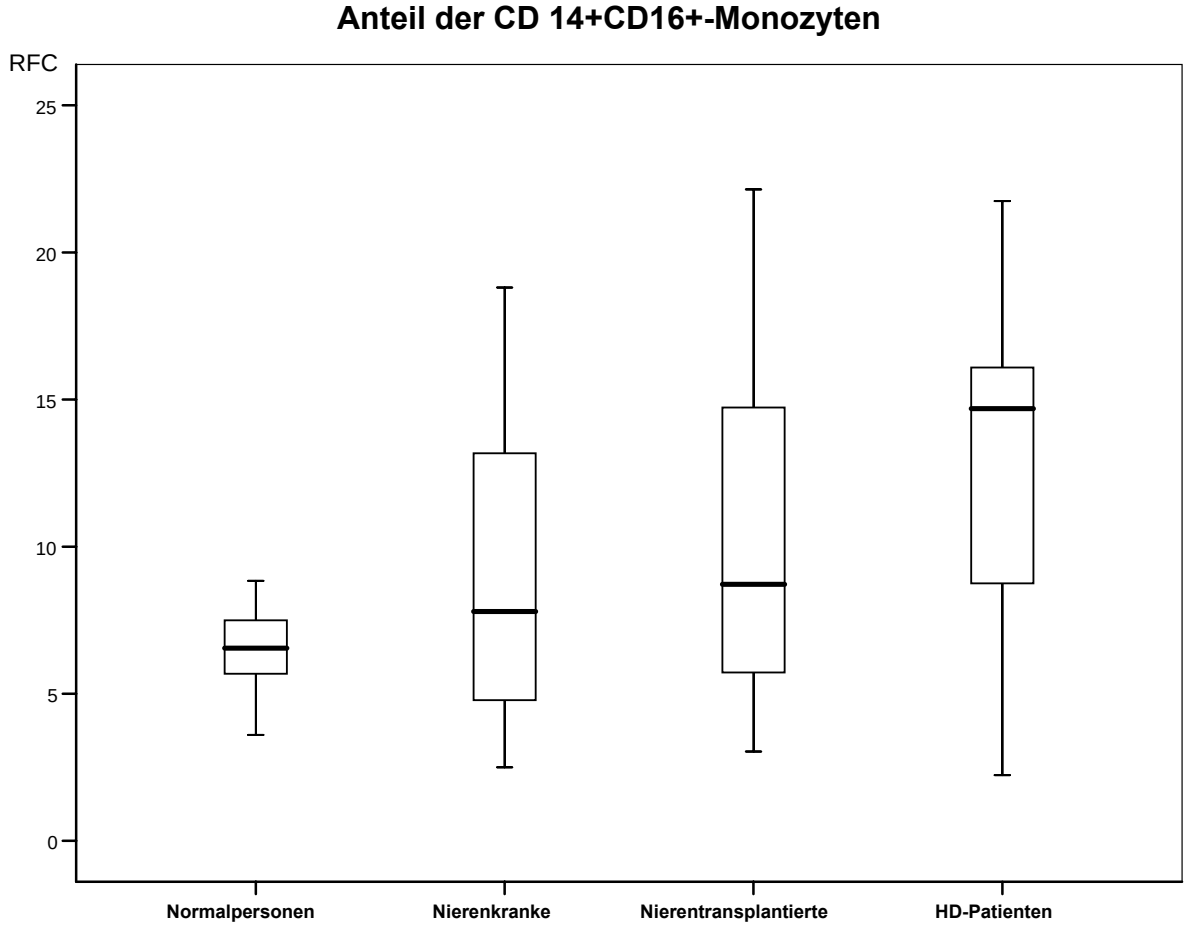


Abb.15 : Anteil der CD14+CD16+-Monozyten. Bei HD-Patienten lassen sich mehr CD14+CD16+-Monozyten im peripheren Blut nachweisen als bei Gesunden oder Nierenkranken:

Anteil der CD14+CD16+ Monozyten	Zweiseitige Signifikanz p=
Normalpersonen und Hämodialysierte	**0,0001**
Nierenkranke und Hämodialysierte	**0,0062**

Am meisten CD14+CD16+-Zellen konnten im Blut von Dialysepatienten nachgewiesen werden. Diese kompetenten, phagozytosefähigen Zellen bilden normalerweise nur einen geringen Anteil der Gesamtmonozytenfraktion. Bei (chronischen) Infektionen werden diese Zellen vermehrt exprimiert. Erwartungsgemäß waren bei Gesunden daher am wenigsten CD14+CD16+-Zellen nachweisbar.

7.1.7 CRP

Tab. 9: Messungen des humoralen Entzündungsmarkers CRP (in mg/dl) bei den untersuchten Gruppen.
* Vier Patienten aus der HD-Gruppe wurden aufgrund nicht ermittelter CRP-Werte von diesem Vergleich ausgeschlossen.

	Median	MW	SD	Max	Min
Normalpersonen (13)	0,3	0,3	0	0,3	0,3
Nierenkranke (19)	0,8	1,09	1,11	4,8	0,3
Nierentransplantierte (28)	0,3	0,47	0,31	1,4	0,3
Hämodialysierte (25)*	0,6	0,7	0,4	1,9	0,3

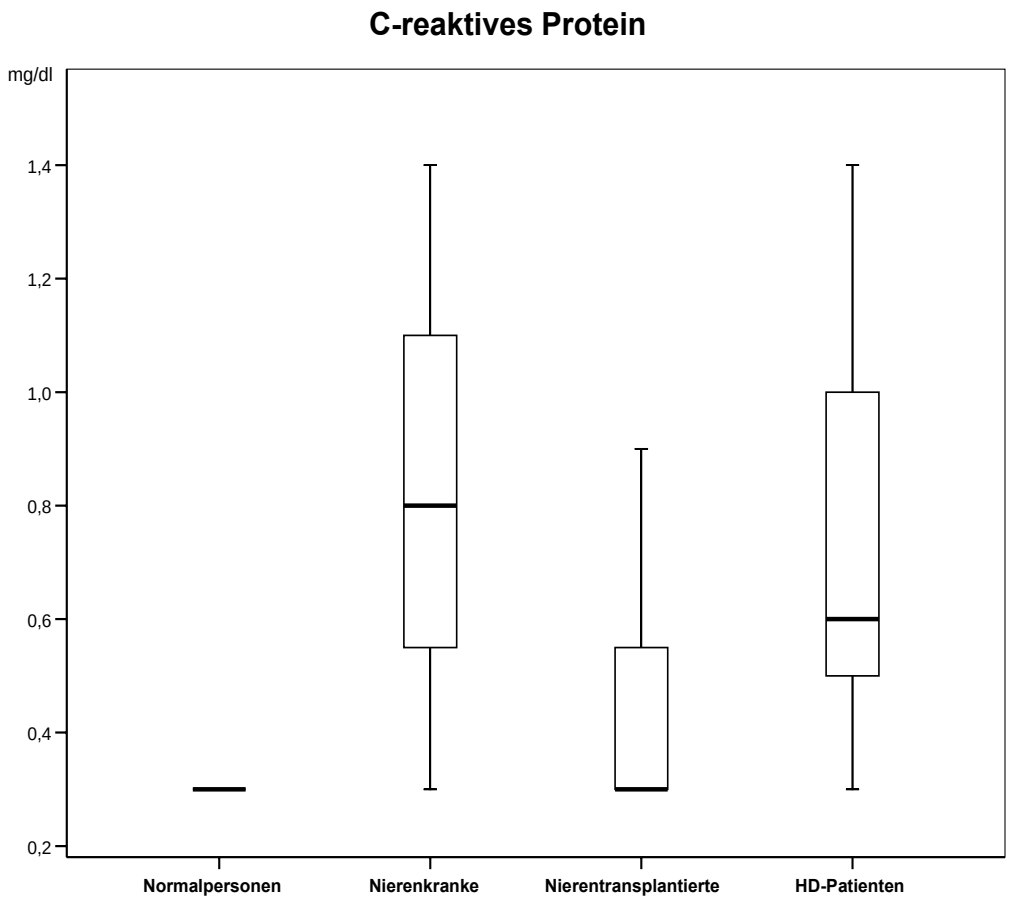


Abb. 16 : C-reaktives-Protein im Serum der Patienten (in mg/dl). Bei der Vergleichsgruppe wurde das CRP auf 0,3mg/dl festgelegt. HD-Patienten wiesen höhere Werte auf als Gesunde und NTX-Patienten. Nierenkranke wiesen signifikant höhere CRP-Werte auf als Gesunde oder Nierentransplantierte.

C-reaktives Protein	Zweiseitige Signifikanz p=
Normalpersonen und Nierenkranke	**<< 0,0001**
Normalpersonen und Hämodialysierte	**<< 0,0001**
Nierenkranke und Nierentransplantierte	**0,0003**
Nierentransplantierte und Hämodialysepatienten	**0,005**

Das CRP ist ein unspezifischer humoraler Infektionsmarker. Es folgt (nach einigen Zwischenschritten) der Expression von TLR in der Inflammationskaskade und ist deswegen nicht als Frühmarker einer Entzündungsreaktion geeignet. Chronisch Nierenkranke und HD-Patienten zeigten die höchsten CRP-Werte im Blut. Nierentransplantierte Patienten sind dagegen immunsupprimiert und wiesen weniger CRP im Blut auf.

7.1.8 Kreatinin

Tab.10: Statistische Auswertung des Kreatiningehalts im Patientenserum (in mg/dl).

	Median	MW	SD	Max	Min
Normalpersonen (13)	1,2	1,2	0	1,2	1,2
Nierenkranke (19)	2,47	3,34	2,16	7,63	1,21
Nierentransplantierte (28)	1,62	1,83	0,79	3,55	0,85
Hämodialysierte (25)	8,0	8,45	3,45	15,26	0,94

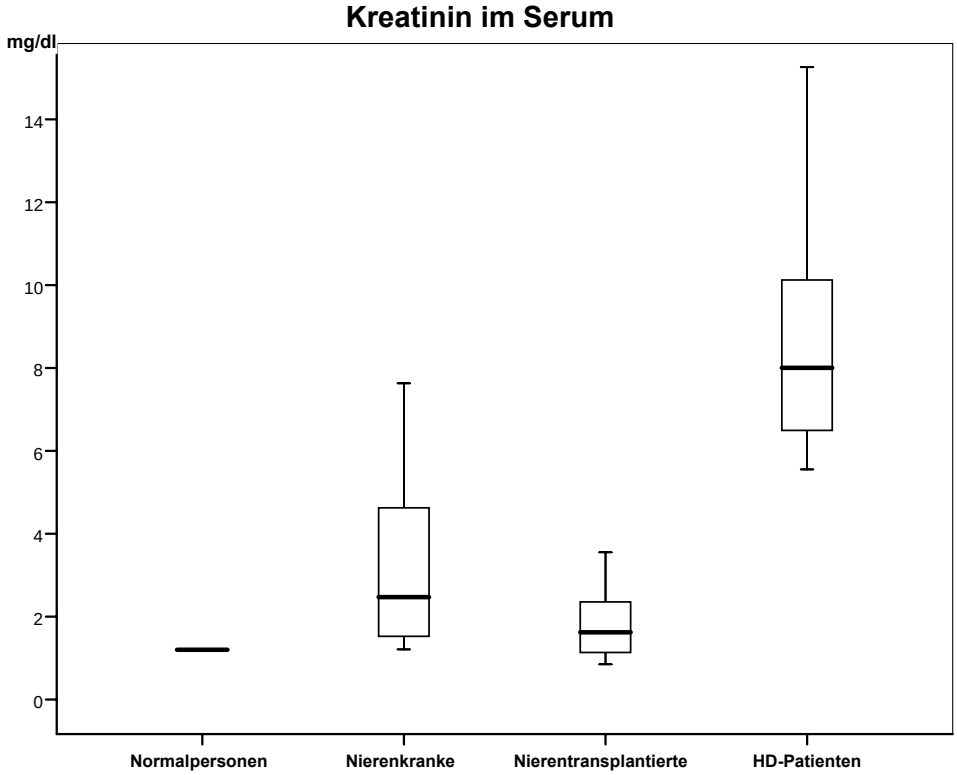


Abb.17 : Kreatinin im Serum (in mg/dl). Bei den Normalpersonen wurde der Kreatiningehalt auf 1,2 mg/dl festgelegt. HD-Patienten wiesen im Vergleich mit allen Vergleichsgruppen die höchsten Kreatininwerte auf. Nierenkranke hatten im Vergleich zu NTX- Patienten und Gesunden signifikant erhöhte Werte. Auch NTX-Patienten haben höhere Kreatininwerte im Serum als Gesunde:

Kreatinin im Serum	Zweiseitige Signifikanz p=
Normalpersonen und Nierenkranke	**<< 0,0001**
Normalpersonen und Nierentransplantierte	**0,028**
Normalpersonen und Hämodialysierte	**<< 0,0001**
Nierenkranke und Nierentransplantierte	**0,008**
Nierenkranke und Hämodialysierte	**<< 0,0001**
Nierentransplantierte und Hämodialysierte	**<< 0,0001**

Die Expression folgender untersuchter Parameter unterschied sich nicht signifikant zwischen den untersuchten Patientengruppen: HLA-DR auf CD14+CD16++ Monozyten, TLR2 auf allen untersuchten Subpopulationen und TLR4 auf CD14++CD16neg. Zellen. Die einzelnen Messergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen

7.2 Vergleich humoraler und zellulärer Inflammationsmarker bei HD-Patienten mit unterschiedlichen Gefäßzugängen

7.2.1 TLR2 CD14+CD16++

Tab. 11: TLR2-Expression auf CD14+CD16++-Zellen; Angaben in RFC. In Klammern steht die Anzahl der Probanden. Hierbei bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (p = 0,05). MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung. Max/Min=gemessene Maximal- bzw. Mindestwerte.

TLR2 CD14+CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kunstgefäßshunt (21)	68,24	68,85	22,62	27,88	114,96	**0,05**
Ciminoshunt (16)	86,50	79,40	25,11	49,58	129,8	

7.2.2 TLR4CD14+CD16+

Tab. 12: Ergebnisse der Messung von TLR4 auf CD14+CD16+-Monozyten. Hierbei zeigt sich ein signifikanter Unterschied, d.h. Patienten mit Kunstgefäßshunt exprimierten signifikant weniger TLR4 auf CD14+CD16+-Zellen als Patienten mit Ciminoshunt.

TLR4 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kunstgefäßshunt (21)	29,50	21,48	26,66	11,97	128,64	**0,012**
Ciminoshunt (16)	46,12	41,42	29,48	10,65	112,40	

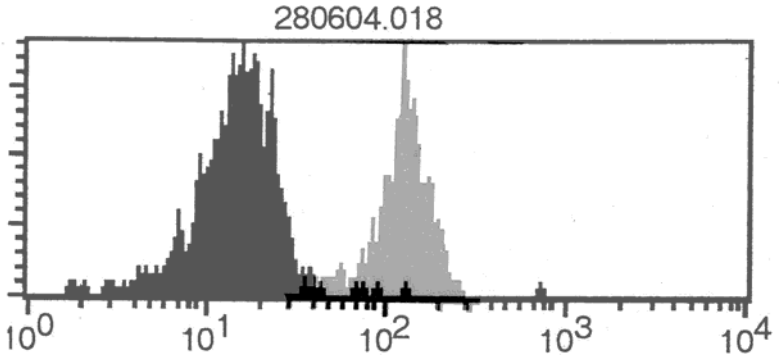


Abb. 18: Darstellung der im FACS gemessenen unterschiedlichen Expression von TLR4; hier am Beispiel der CD14+CD16++-Monozyten. Vergleich eines Patienten mit Ciminoshunt (hellgraue Kurve) und eines Patienten mit Kunstgefäßshunt (PTFE - dunklere Kurve). Der Patient mit Ciminoshunt exprimierte mehr TLR4 auf CD14+CD16++-Zellen.

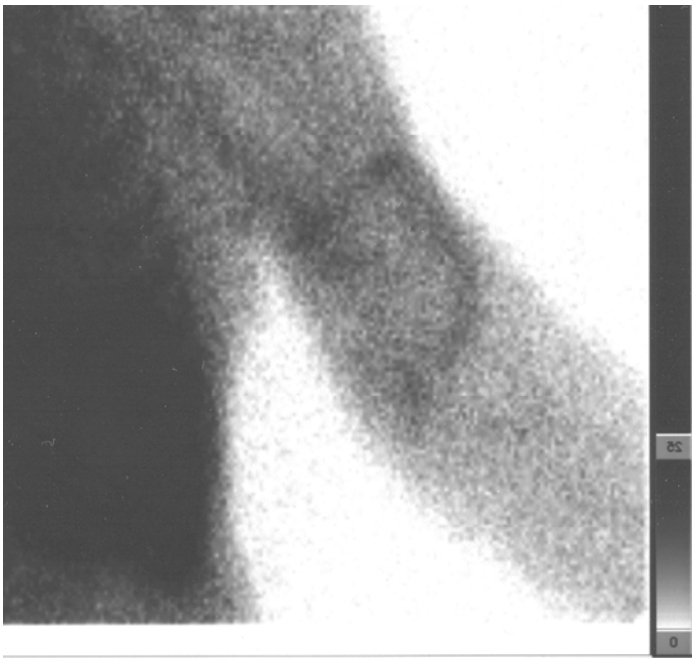


Abb. 19: Die Abbildung zeigt das positive Ergebnis eines Indium-Leukozytenscans. Inflammatorische Vorgänge im Shunt lassen sich so darstellen. Patienten mit Kunstgefäßshunt (PTFE-Shunt) haben einen schlechteren Gefäßstatus und meist auch höhere Komorbiditäten als Patienten mit Ciminoshunt. Shuntkomplikationen (z.B. Entzündungen) sind ein häufiger Grund für stationäre Krankenhausaufenthalte bei Patienten mit Kunstgefäßshunt.

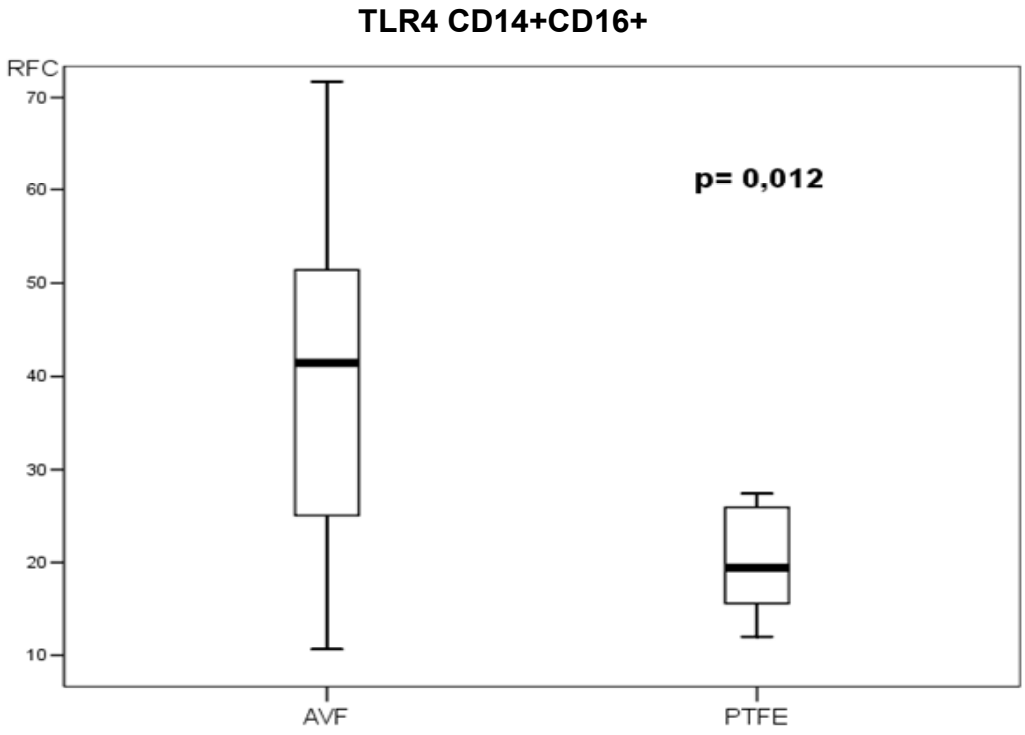


Abb.20: Vergleich zwischen der TLR4-Expression auf CD14+CD16+-Zellen bei Kunstgefäß(PTFE)- und Ciminoshuntpatienten (AV-Fistel). Patienten mit Kunstshunt exprimierten signifikant weniger TLR4 als Patienten mit AV-Fistel. Eine geringere TLR-Expression ist bei diesen Patienten Ausdruck eines erhöhten Infektionsrisikos, da es zu einer nur verminderten Ausschüttung von Zytokinen kommt und somit die initiale Infektionsbekämpfung supprimiert wird.

7.2.3 TLR4 CD14+CD16++

Tab. 13: TLR4-Expression auf CD14+CD16++-Monozyten. Kunstgefäßpatienten exprimierten signifikant weniger TLR4 auf diesen Monozyten (p=0,001).

TLR4 CD14+CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kunstgefäßshunt (21)	23,66	18,94	18,07	6,44	92,64	**0,001**
Ciminoshunt (16)	54,18	50,84	35,23	3,0	119,71	

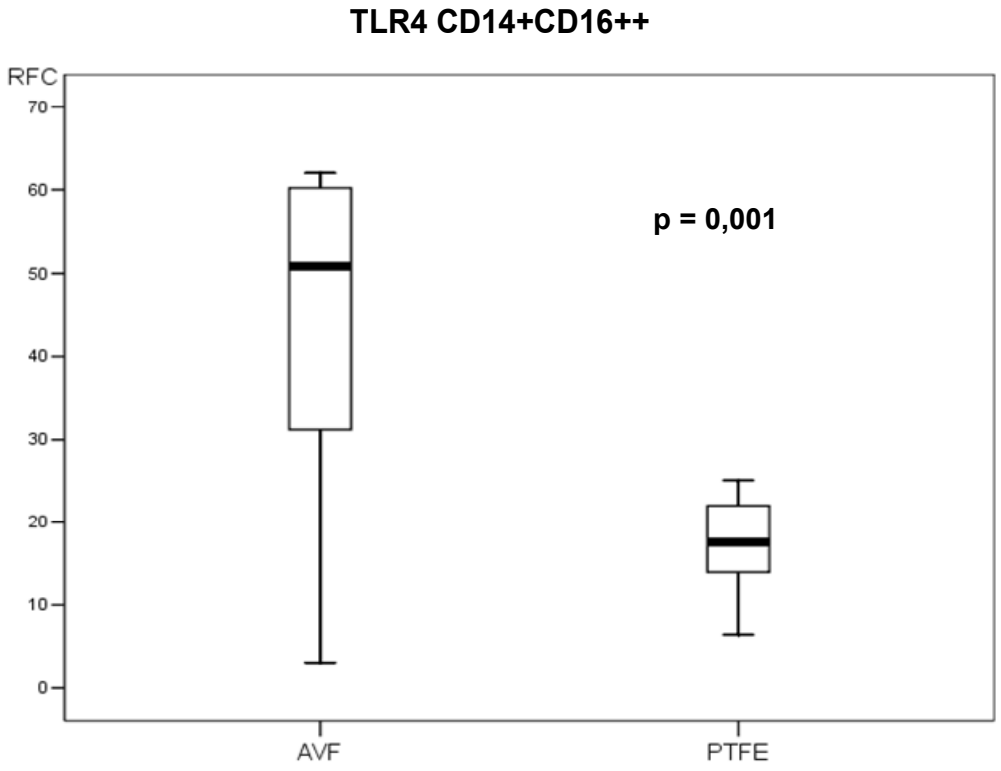


Abb.21: Kunstgefäßpatienten exprimierten signifikant weniger TLR4 auf CD14+CD16++-Monozyten (p=0,001).

7.2.4 CRP

Tab. 14: Serumspiegel des CRP (in mg/dl). Patienten mit Kunstgefäßshunt hatten signifikant höhere CRP-Werte.

C-reaktives Protein (CRP)	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kunstgefäßshunt (21)	0,95	0,9	0,53	0,3	2,2	**0,026**
Ciminoshunt (16)	0,86	0,6	1,01	0,3	5,5	

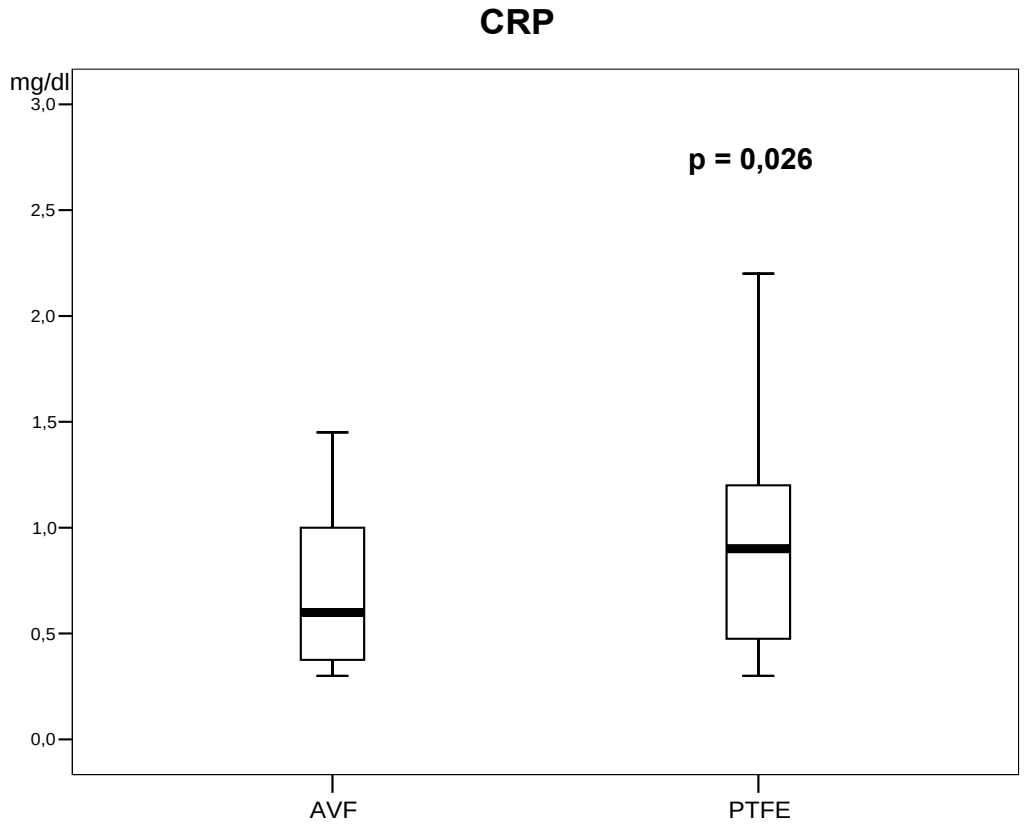


Abb. 22: C-reaktives Protein im Patientenserum (in mg/dl). Mit einer zweiseitigen Irrtumswahrscheinlichkeit von p=0,026 ließen sich im Blut von Kunstgefäßshuntpatienten (PTFE-Shunt) erhöhte humorale Entzündungsmarker nachweisen.

7.2.5 Hämoglobin

Tab. 15: Ergebnisse der Messung des Hämoglobinspiegels im Patientenblut (in g/dl). Das Ergebnis war zweiseitig signifikant, d.h. Patienten mit Kunstgefäßshunt hatten im Vergleich höhere Hb-Werte als Patienten mit Ciminoshunt.

Hämoglobin	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kunstgefäßshunt (21)	11,65	11,5	0,95	10,0	13,65	**0,028**
Ciminoshunt (16)	11,19	11,0	0,86	10,0	13,2	

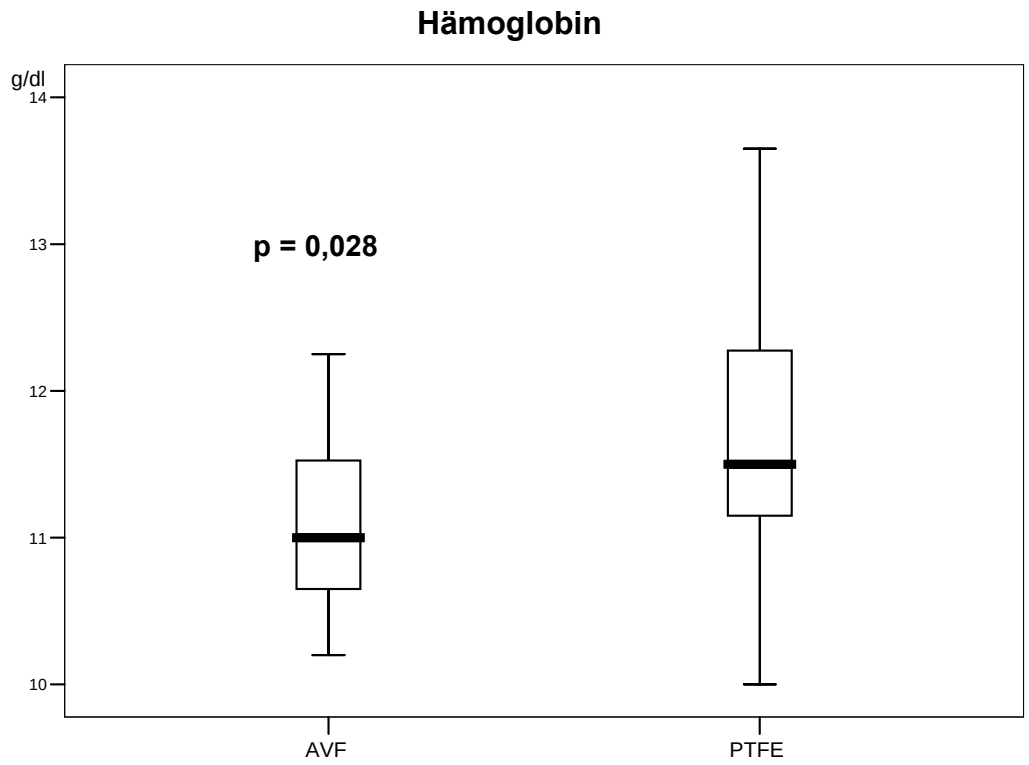


Abb. 23: Hämoglobingehalt im Blut bei Patienten mit Ciminoshunts (AV-Fistel) und mit Kunstgefäßshunts (PTFE-Shunt). Kunstgefäßpatienten hatten signifikant höhere Werte als Ciminoshuntpatienten.

7.2.6 Krankenhausaufenthalte

Tab. 16: Anzahl der stationären Krankenhausaufenthalte auf Grund von Shuntkomplikationen innerhalb eines Zeitraumes von 2 Jahren. Kunstshuntpatienten sind aufgrund von Shuntkomplikationen häufiger im Krankenhaus als Ciminoshuntpatienten.

Aufenthalte	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kunstgefäßshunt (21)	3,21	3	2,97	0,00	13	**<<0,0001**
Ciminoshunt (16)	0,7	0	1,19	0,00	5	

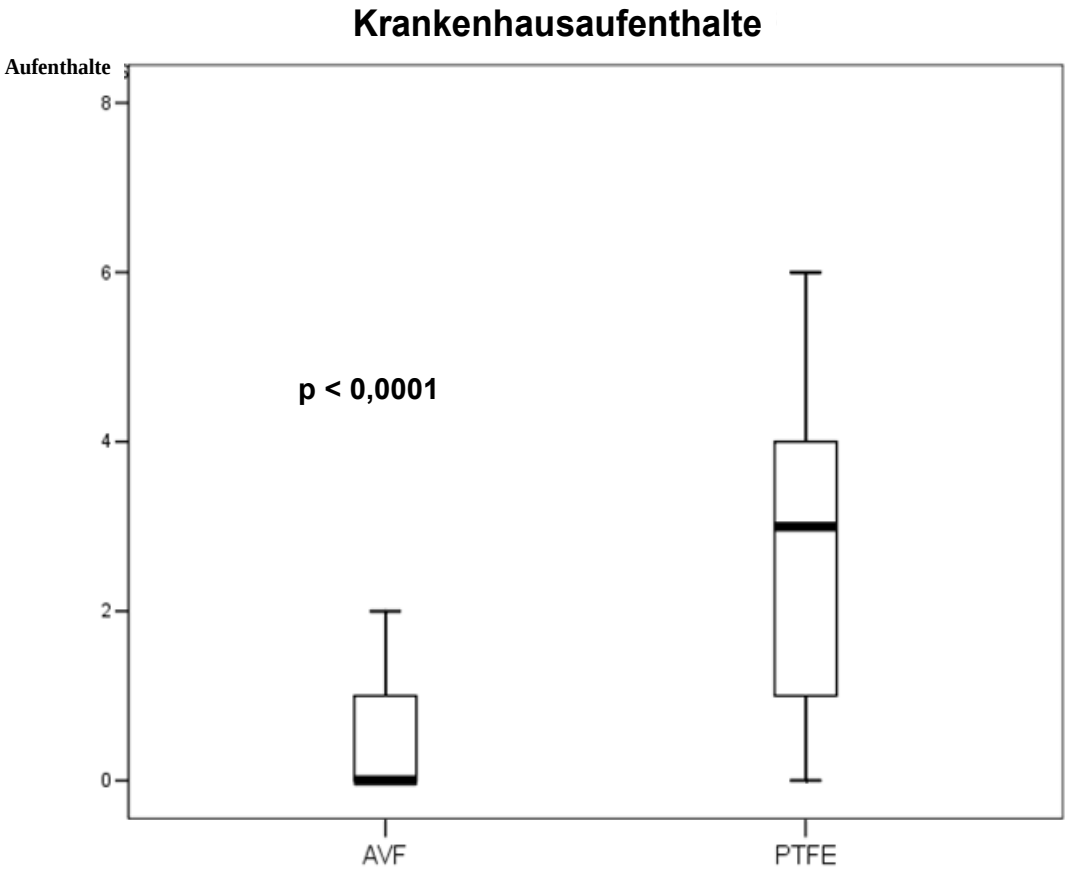


Abb.24: Anzahl der Krankenhausaufenthalte in den letzten 2 Jahren aufgrund von Shuntkomplikationen. Kunstgefäßshuntpatienten (PTFE-Shunt) wurden häufiger hospitalisiert als Patienten mit Ciminoshunt. Der Unterschied ist zweiseitig signifikant auf einem Niveau von **$p=2,23x10^{-5}$**.

Nach unseren Ergebnissen zeigten Kunstshuntpatienten niedrigere TLR2- und TLR4-Expressionen auf phagozytosestarken CD14+CD16+- und CD14+CD16++-Zellen. Dies hat zur Folge, dass diese Monozyten nicht adäquat auf initiale Entzündungsreize reagieren können. Aus mikroinflammatorischer Sicht haben Kunstshuntpatienten ein höheres Risiko Shuntkompliaktionen zu erleiden als Ciminoshuntpatienten.

Die Expression folgender untersuchter Parameter unterschied sich nicht signifikant zwischen den untersuchten Patientengruppen: Totale Expression von CD14 Monozyten, HLA-DR auf allen Monozytensubpopulationen, TLR2 auf CD14++CD16neg. und CD14+CD16+ Zellen, TLR4 auf CD14++CD16neg. Zellen sowie der Anteil der CD14+CD16+ Zellen, das Hämatokrit der Patienten und die Erythropoetin-Wochendosis. Die einzelnen Messergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

7.3 Vergleich inflammatorischer Marker bei Tages- und Nachtdialyse-Patienten

7.3.1 TLR4 CD14++CD16neg.

Tab. 17: Vergleich der TLR4-Expression auf CD14++CD16neg.-Zellen bei beiden Patientengruppen. Patienten, die in der Nacht dialysiert wurden, hatten niedrigere Werte als Tagesdialysepatienten. MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung. Max/Min=gemessene Maximal- bzw. Mindestwerte. In Klammern steht die Anzahl der Probanden

TLR4 CD14++CD16neg.	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Nachtdialyse (13)	23,35	23,29	7,15	14,07	33,38	**0,029**
Tagesdialyse (13)	35,15	35,87	14,23	12,41	59,89	

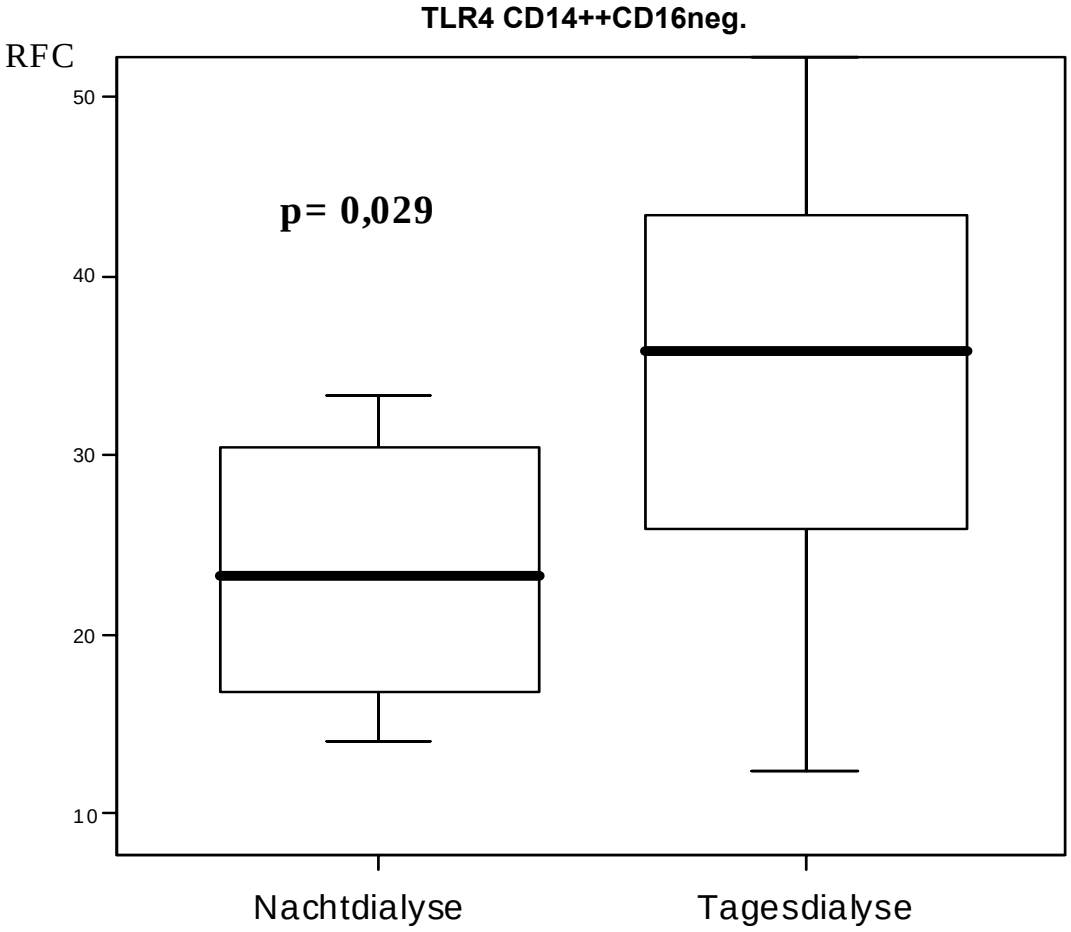


Abb. 25: RFC (Relative Fluoresceine Counts) von TLR4 auf CD14++CD16neg.-Zellen bei Patienten der Tages- und Nachtdialyse. Tagesdialysepatienten exprimierten signifikant mehr TLR4 auf diesen Zellen als Patienten, die in der Nacht dialysiert wurden.

7.3.2 TLR4 CD14+CD16+

Tab. 18: Vergleich der TLR4-Expression auf CD14+CD16+-Monozyten; gemessen in RFC. Hierbei ergibt sich ein zweiseitig signifikanter Unterschied von **p=0, 00003**. Nachdialysepatienten exprimierten signifikant weniger TLR4 auf diesen Monozyten.

TLR4 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Nachtdialyse (13)	19,87	20,17	5,16	12,19	31,34	**<< 0,0001**
Tagesdialyse (13)	53,09	46,56	28,33	23,71	112,4	

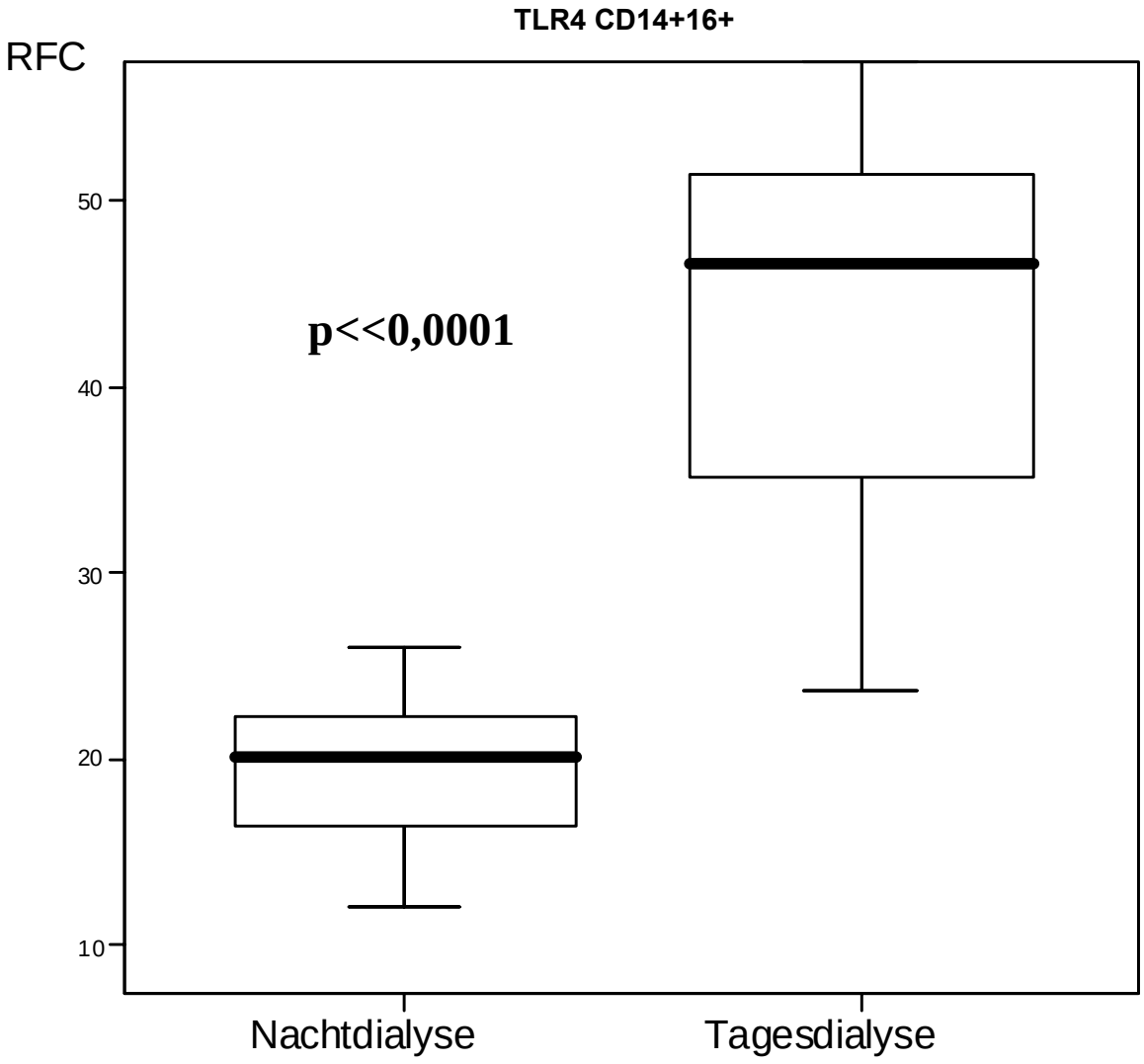


Abb. 26: TLR4 auf CD14+CD16+-Monozyten (in RFC). Tagesdialysepatienten exprimierten mehr TLR4 auf CD14+CD16+-Monozyten als Patienten, die in der Nacht dialysiert werden. Dieser Unterschied war zweiseitig signifikant auf dem Niveau **p=0, 00003**.

7.3.3 TLR4 CD14+CD16++

Tab. 19: Es ergibt sich ein zweiseitig signifikanter Unterschied in der TLR4-Expression auf CD14+CD16++-Monozyten **(p=0,00001)**. Nachtdialysepatienten exprimierten signifikant weniger TLR4 auf CD14+CD16++-Zellen.

TLR4 CD14+CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Nachtdialyse (13)	15,12	14,39	6,45	4,63	28,01	**<<0,0001**
Tagesdialyse (13)	63,56	53,28	32,09	31,06	119,71	

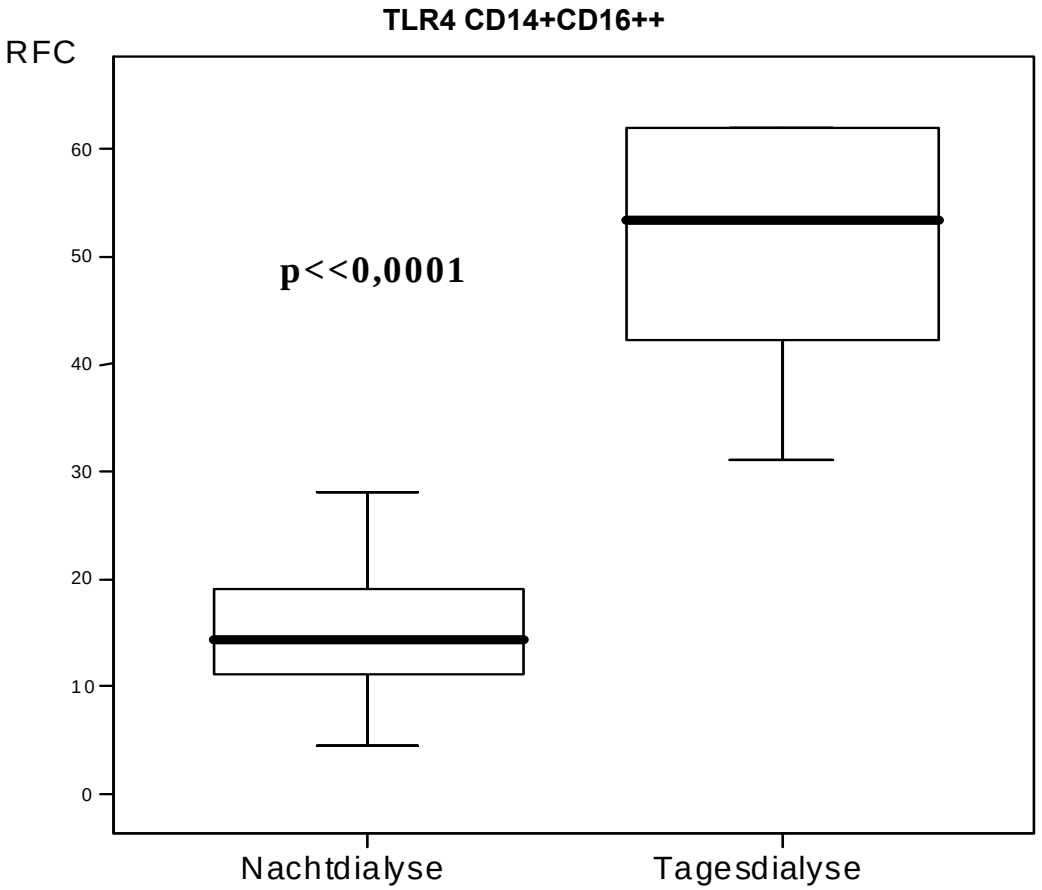


Abb. 27: Expression von TLR4 auf CD14+CD16++-Monozyten (in RFC). Patienten der Tagesdialyse exprimierten signifikant mehr TLR4 auf dieser Monozytensubpopulation **(p=0,00001)**.

Die deutlich längere Nachtdialysedauer führt zu verlängerter (potentieller) Exposition von Antigenen (Dialysatorkontakt). Aus mikroinflammatorischer Sicht könnte damit die kürzere Tagesdialyse der Nachtdialyse überlegen sein. Erhöhte TLR4-Expression auf den zirkulierenden CD14+CD16+- und CD14+CD16++-Zellen könnte mit einer besseren Abwehrlage bei Dialysepatienten assoziiert sein (siehe dazu auch Kapitel 7.2).

Die Expression folgender untersuchter Parameter unterschied sich nicht signifikant zwischen den untersuchten klinischen Gruppen: Totale Expression von CD14 Monozyten, HLA-DR und TLR2 auf allen Monozytensubpopulationen sowie der Anteil der CD14+CD16+ Zellen, das CRP, das Kreatinin, der Hämoglobingehalt, das Hämatokrits sowie die Erythropoetin-Wochendosen. Die einzelnen Messergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

7.4. Vergleich der intra- und extrazellulären Expression des TLR4-Rezeptors

7.4.1 Normalpersonen/Nierentransplantierte

Personen aus der gesunden Vergleichsgruppe und die unter immunsuppressiver Therapie stehenden nierentransplantierten Patienten wiesen zwischen der intra- und extrazellulären TLR4-Expression keinen signifikanten Unterschied auf. Die einzelnen Messergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen. Nachfolgend ist exemplarisch die Grafik zu TLR4 CD14+CD16++ bei der Vergleichsgruppe abgebildet:

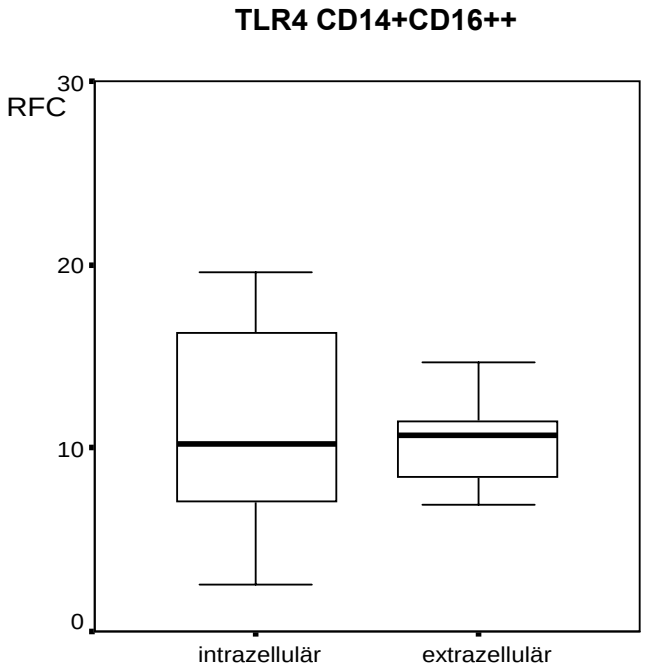


Abb. 28: Gesunde exprimierten die intra- und extrazellulären TLR4 auf CD14+CD16++-Monozyten gleich stark.

7.4.2 Hämodialysepatienten

Tab. 20: Messergebnisse von Hämodialysepatienten. Angaben in RFC. Vergleich zwischen intra- und extrazellulärer TLR4-Expression auf CD14++CD16neg.-, CD14+CD16+- und CD14+CD16++-Zellen. TLR4 wurde bei HD-Patienten in CD14++CD16neg.- und CD14+CD16++-Zellen vermehrt gebildet.

	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
TLR4 CD14++ CD16neg. intrazellulär (28)	29,35	28,13	11,88	14,07	59,89	**<< 0,0001**
TLR4 CD14++ CD16neg. extrazellulär (39)	13,89	10,94	9,70	6,21	66,12	
TLR4 CD14+CD16+ intrazellulär (28)	34,62	22,88	25,99	10,65	112,4	0,679
TLR4 CD14+CD16+ extrazellulär (39)	28,87	28,13	11,43	9,47	80,58	
TLR4 CD14+CD16++ intrazellulär (28)	36,51	20,68	33,47	3,0	119,71	**0,002**
TLR4 CD14+CD16++ extrazellulär (39)	14,47	14,99	8,23	1,0	36,19	

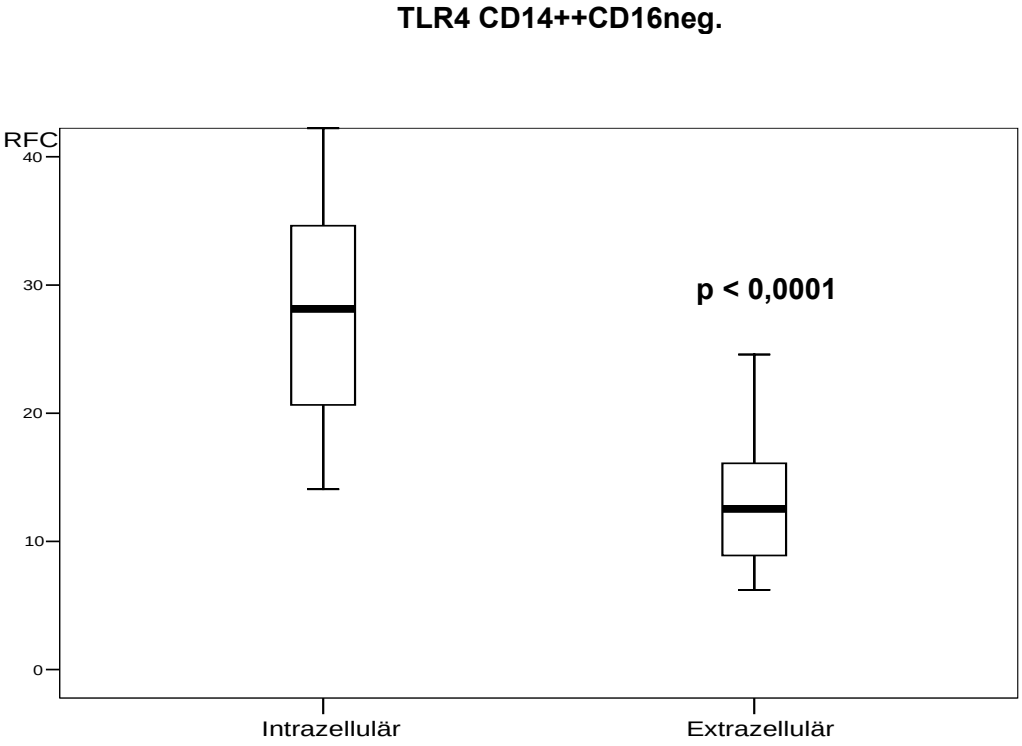


Abb.29: CD14++CD16neg.-Zellen: Hämodialysepatienten exprimierten intrazellulär mehr TLR4 als extrazellulär **(p=5,6 x 10^{-9})**.

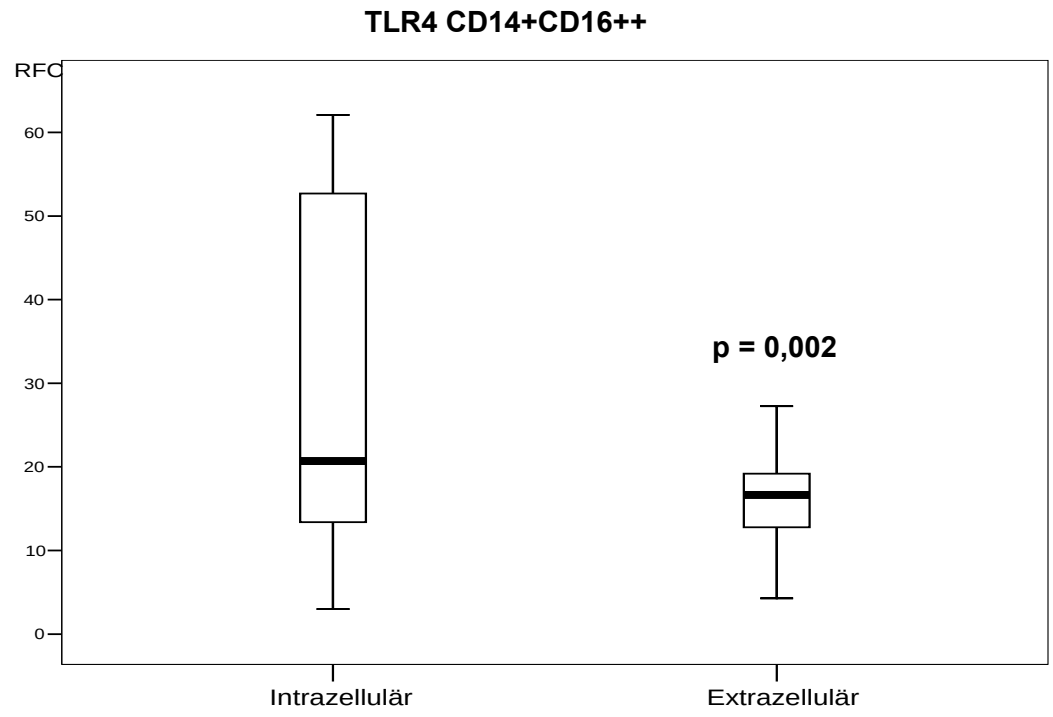


Abb. 30: Intrazellulär wurde bei Hämodilaysepatienten in den CD14+CD16++-Monozyten mehr TLR4 exprimiert als extrazellulär. Dieser Unterschied war zweiseitig signifikant **(p=0,0017)**.

TLR4 wurde bei HD-Patienten intrazellulär stärker exprimiert als extrazellulär. Im Verlauf einer Entzündungsreaktion bzw. bei chronischer Exposition gegenüber Antigenen (z.B. durch Dialysatorkontakt) kommt es anscheinend zu einer Umverteilung/Internalisierung von extrazellulären Rezeptoren.

7.4.3 Chronisch Nierenkranke

Tab.21: Ergebnisse der TLR4-Messung bei chronisch nierenkranken Patienten. Vergleich zwischen intra- und extrazellulärer Rezeptorkomponente. Alle Angaben in RFC. CD14++CD16neg.-Monozyten dieser Patientengruppe exprimierten signifikant mehr intrazelluläres TLR4.

	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
TLR4 CD14++ CD16neg. intrazellulär (13)	24,33	20,91	8,93	12,52	42,17	**0,0002**
TLR4 CD14++ CD16neg. extrazellulär (25)	13,50	12,24	6,56	4,57	32,78	
TLR4 CD14+CD16+ intrazellulär (13)	20,82	19,99	7,99	9,82	40,32	0,074
TLR4 CD14+CD16+ extrazellulär (25)	28,20	28,39	12,56	10,27	62,64	
TLR4 CD14+CD16++ intrazellulär (13)	14,32	14,86	4,94	7,30	22,27	0,85
TLR4 CD14+CD16++ extrazellulär (25)	14,36	12,86	8,73	1,12	37,35	

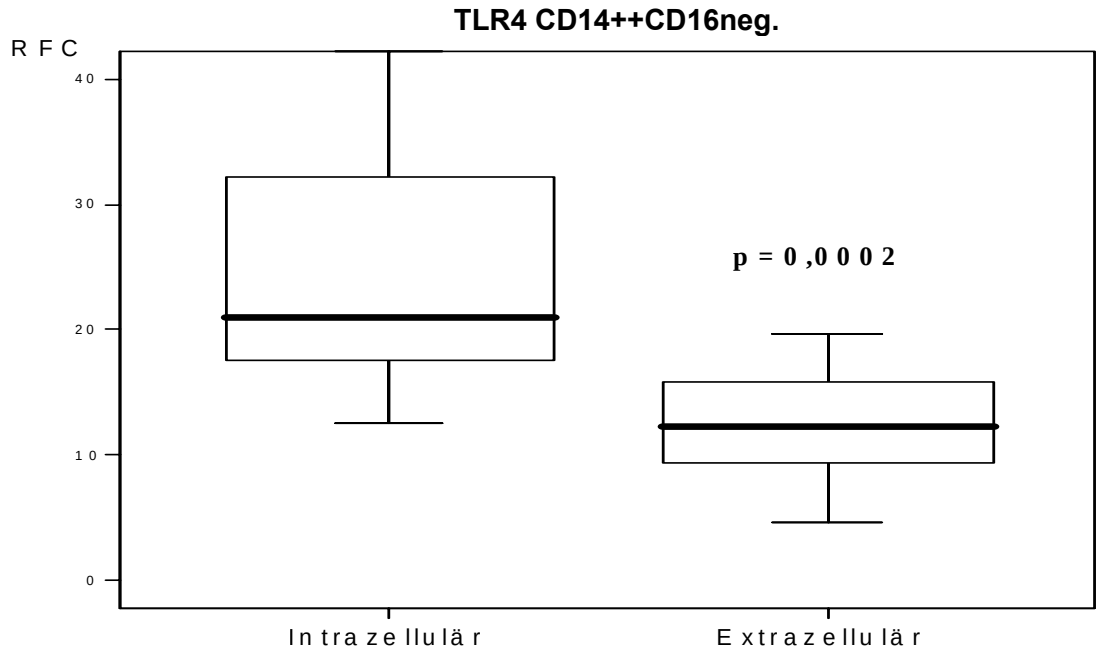


Abb. 31: Aus diesem Boxplot wird deutlich, dass chronisch Nierenkranke in CD14++CD16neg.-Monozyten mehr TLR4 exprimierten als auf deren Oberfläche. Die zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei **p=0, 0002**.

Die Ergebnisse zeigen eine erhöhte intrazelluläre TLR4-Expression bei chronisch an der Niere erkrankten Patienten sowie Dialysepatienten. Gesunde oder NTX-Patienten zeigten dagegen eine gleichmäßige TLR4-Verteilung. Diese Balance verschiebt sich möglicherweise erst nach Antigenkontakt und zwar in Richtung vermehrter intrazellulärer Expression. Nach Antigenexposition kultivierter Monozyten konnte ein analoges Rezeptorverhalten beobachtet werden (siehe Kapitel 7.10).

7.5 HLA-DR und TLR3 bei virusinfizierten (HBV, HCV) Dialysepatienten

7.5.1 Normalpersonen

Tab.22: TLR3-Rezeptorexpression der CD14++CD16neg.-Monozyten bei Gesunden. Die intrazelluläre TLR3-Expression war signifikant höher als die extrazelluläre (p=0,028). MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung. Max/Min=gemessene Maximal- bzw. Mindestwerte. In Klammern steht die Anzahl der Patienten.

TLR3 CD14++CD16neg.	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Extrazellulär (5)	6,15	4,55	3,65	3,92	12,63	**0,028**
Intrazellulär (5)	13,39	13,95	3,94	9,31	18,11	

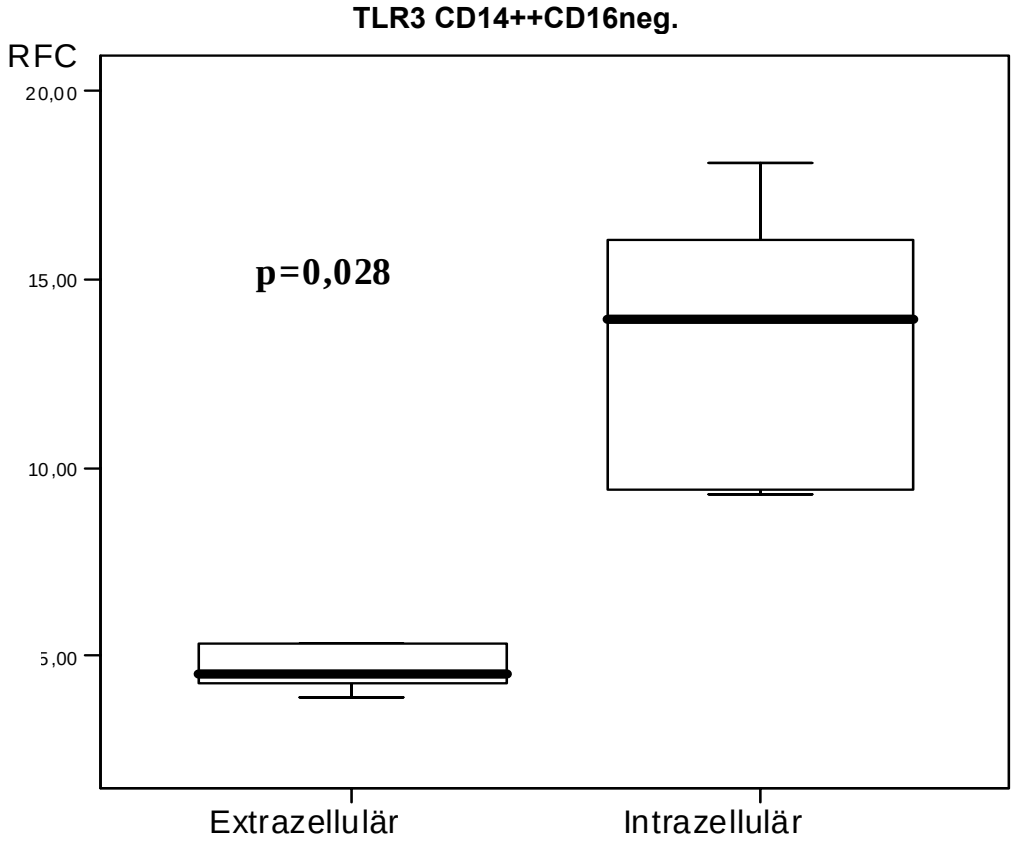


Abb. 32: CD14++CD16neg.-Monozyten: Gesunde Probanden exprimierten vermehrt intrazelluläre TLR3 (**p=0,028**).

CD14+CD16+ Monozyten zeigen keine unterschiedliche Expression zwischen intra- und extrazellulärer TLR3-Expression. Die Messergebnisse sind im Anhang zu finden.

Tab. 23: Ergebnisse der TLR3 Expression von CD14+CD16++-Monozyten. Hierbei ergab sich ein zweiseitig signifikanter Unterschied (p=0,032). Wie bei den CD14++CD16neg.-Monozyten, so fiel auch hier die intrazelluläre TLR 3 Expression höher aus.

TLR3 CD14+CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Extrazellulär (5)	6,78	4,91	6,07	1,21	15,26	**0,032**
Intrazellulär (5)	18,14	20,54	6,68	7,99	25,03	

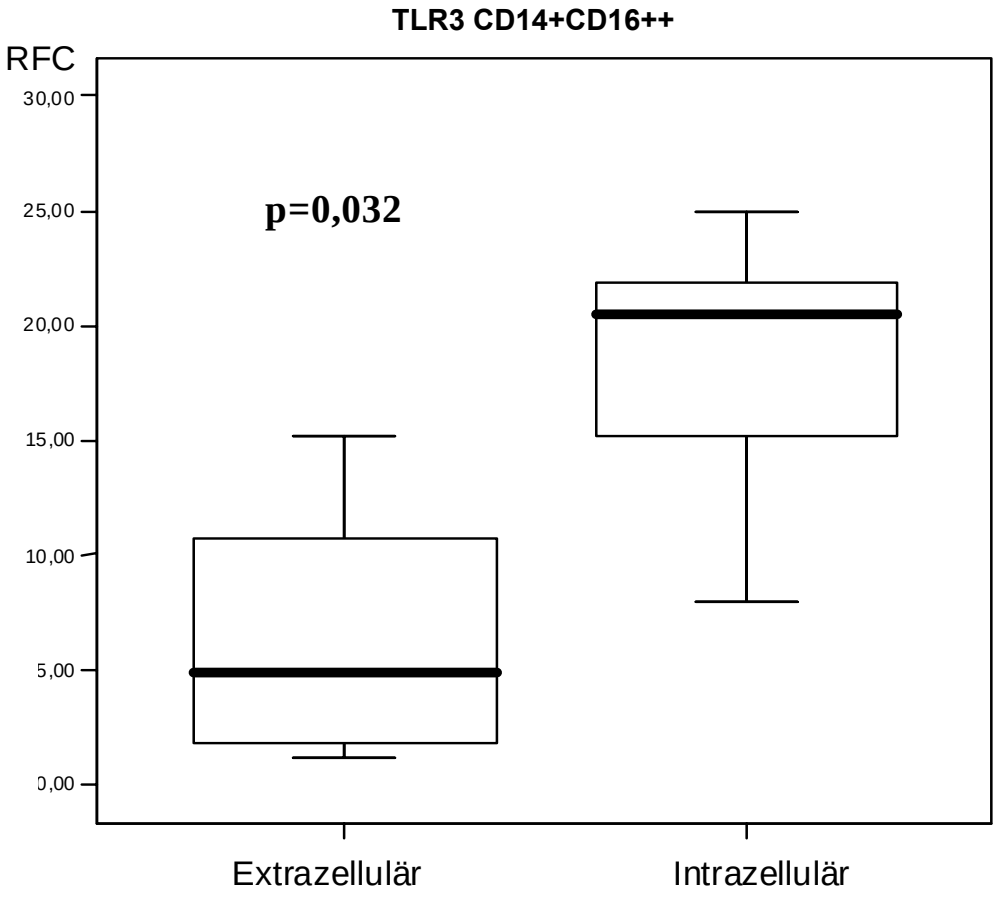


Abb. 33: Die intrazelluläre TLR3-Expression der CD14+CD16++-Monozyten war höher als die extrazelluläre (**p=0,032)**.

7.5.2 Hämodialysepatienten

Tab. 24: Mit Hilfe des FACS-Gerät ermittelte Werte, angegeben in RFC (Relative Fluoresceine Counts). In Klammern steht die Anzahl der Messungen. TLR3 wurde auf CD14++CD16neg.-Monozyten vermehrt intrazellulär gebildet (p=0,004).

TLR3 CD14++CD16neg.	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Irrtumswahr-scheinlichkeit (Signifikanz) p=
Extrazellulär (7)	8,98	7,50	3,44	6,10	15,54	**0,004**
Intrazellulär (7)	16,17	17,15	2,44	12,86	19,28	

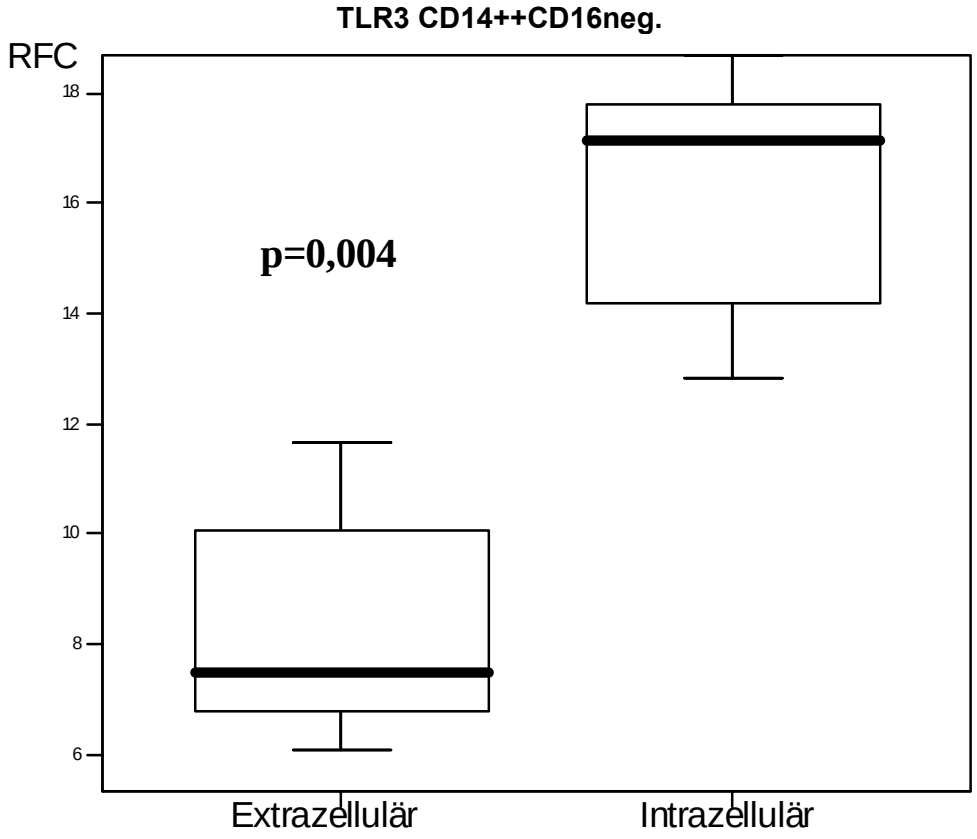


Abb. 34: Dialysepatieten exprimierten in CD14++CD16neg.-Monozyten mehr TLR3 als extrazellulär. Der Expressionsunterschied ist auf einem Niveau von **p=0,004** zweiseitig signifikant.

Tab.25: Messergebnisse des TLR3 auf CD14+CD16+-Monozyten. Auch hier unterschieden sich die Ergebnisse zweiseitig signifikant voneinander. Auf dieser Monozytensubpopulation wurde die intrazelluläre Komponente vermindert exprimiert (p=0,017).

TLR3 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Extrazellulär (7)	23,65	23,71	5,25	13,10	29,43	**0,017**
Intrazellulär (7)	18,03	18,77	3,13	11,76	20,91	

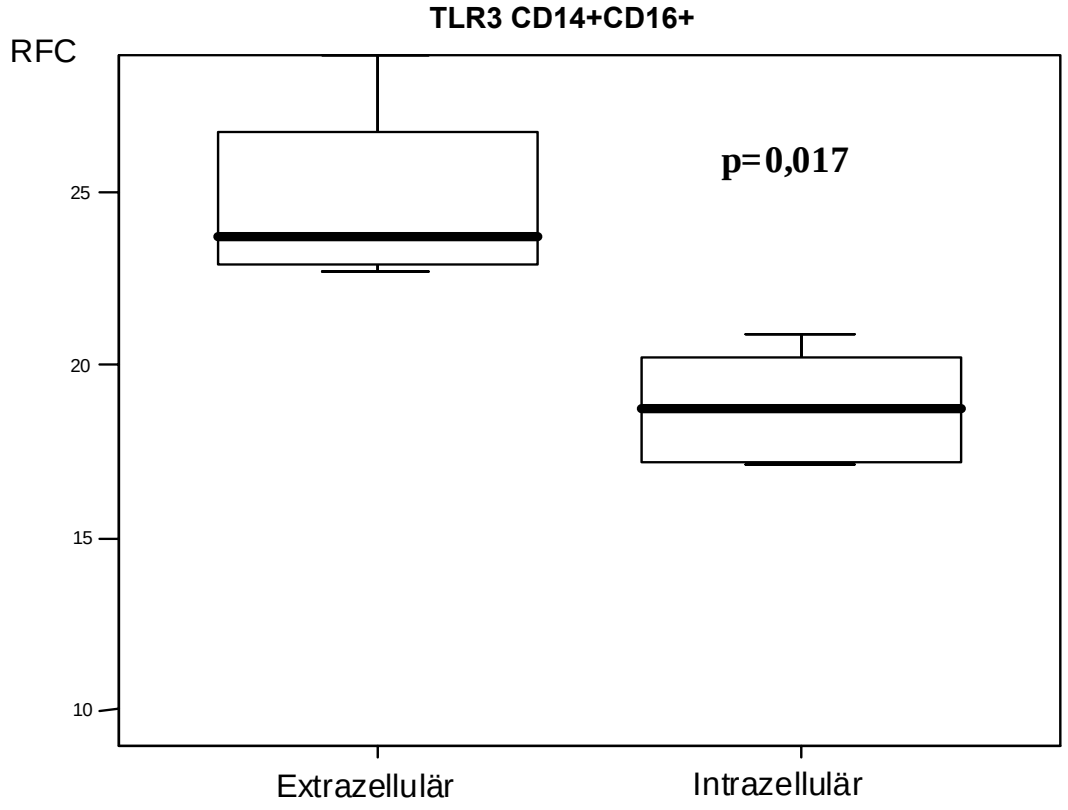


Abb. 35:. Auf CD14+CD16+-Zellen von Dialysepatienten wird die extrazelluläre Rezeptorkomponente vermehrt exprimiert. Dieser Unterschied ist zweiseitig signifikant (**p=0,017**).

In unseren durchgeführten Analysen zeigte sich bei allen Patientengruppen eine erhöhte intrazelluläre TLR3-Expression. Einzige Ausnahme ist die oben gezeigte Verteilung auf/in CD14+CD16+-Zellen. TLR3 wurde bislang nur als ein Rezeptor für RNS-Viren bezeichnet. In unseren Untersuchungen konnten wir jedoch zeigen, dass dieser Rezeptor auch eine Rolle in der Erkennung von DNS-Viren spielt (Hepatitis B Virus).

Tab. 26: Intra- und extrazelluläre TLR3-Expression der CD14+CD16++-Monozyten. Es konnten vermehrt intrazelluläre Rezeptoren nachgewiesen werden (p=0,002).

TLR3 CD14+CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Extrazellulär (7)	9,04	8,24	3,30	5,09	13,95	**0,002**
Intrazellulär (7)	18,65	20,54	4,61	10,94	23,50	

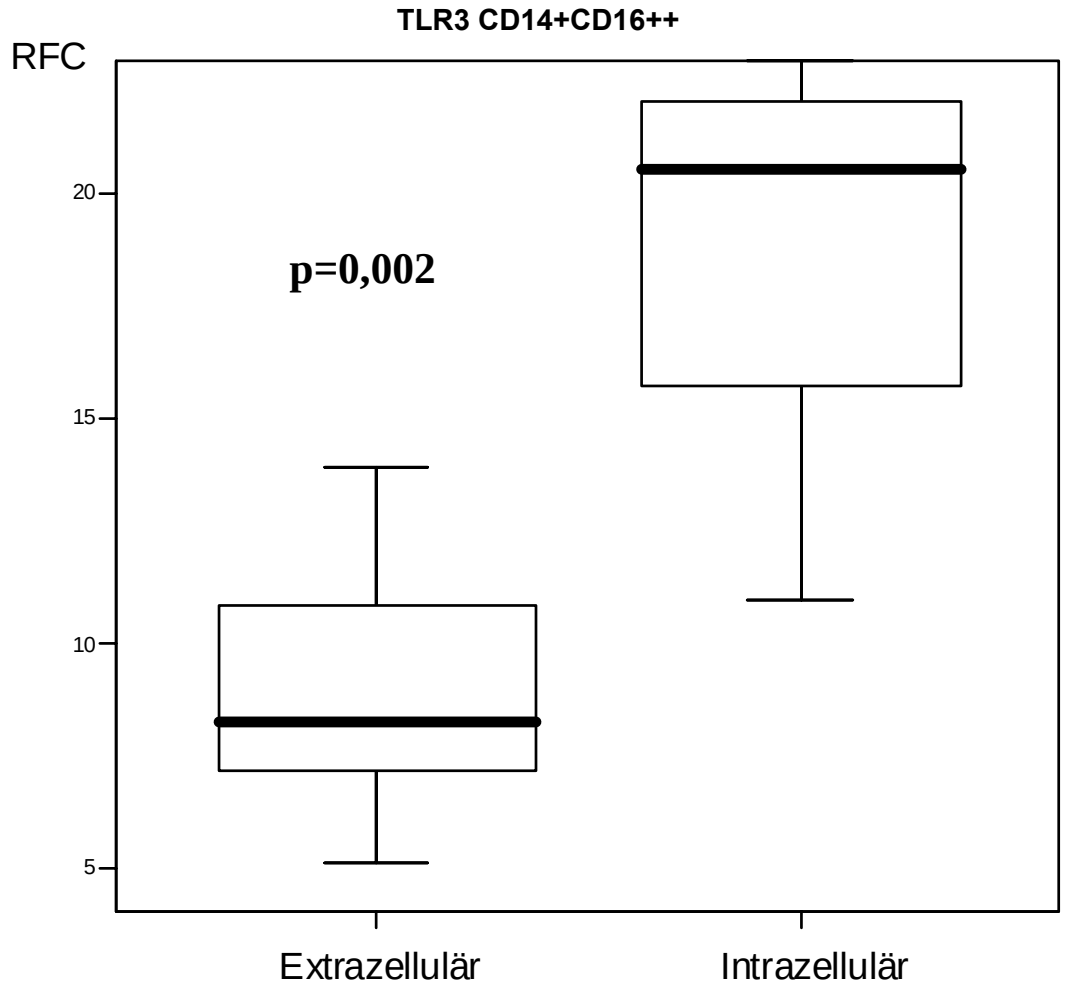


Abb.36: Hämodialysepatienten exprimierten vergleichsweise mehr intrazelluläres- als extrazelluläres TLR3 (**p=0,002**) auf CD14+CD16++-Monozyten.

7.5.3 Hämodialysepatienten mit Hepatitis B

Tab.27: Intra- und extrazelluläre TLR3-Expression auf CD14++CD16neg.-Monozyten bei HBV-Patienten. In Klammern steht die Anzahl der Probanden. Intrazelluläres TLR3 wurde vermehrt exprimiert (**p=0,029**). MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung. Max/Min=gemessene Maximal- bzw. Mindestwerte.

TLR3 CD14++CD16neg.	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Extrazellulär (4)	8,58	8,66	0,59	7,84	9,14	**0,029**
Intrazellulär (4)	29,52	26,73	9,63	21,67	42,94	

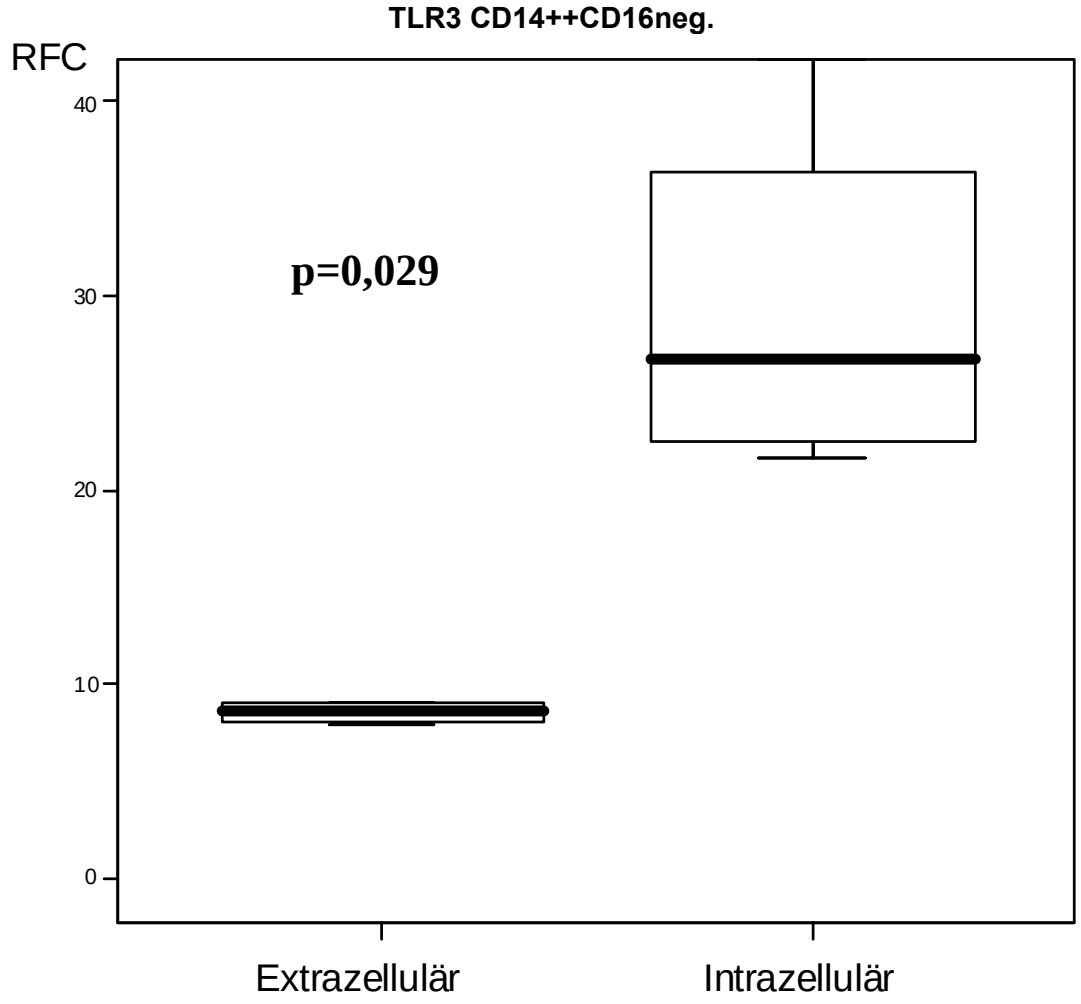


Abb. 37: Expression intrazellulärer- und extrazellulärer TLR3 der CD14++CD16neg.-Monozyten bei Dialysepatienten mit HBV. Diese Patienten exprimierten signifikant mehr intrazelluläre TLR3 **(p=0,029)**.

Auf CD14+CD16+ Monozyten konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen extra- und intrazellulärer TLR3-Rezeptorkomponente gefunden werden. Messergebnisse sind im Anhang zu finden.

Tab. 28: TLR3-Expression der CD14+CD16++-Monozyten HBV-infizierter Dialysepatienten. Die Expression unterschied sich zweiseitig signifikant (p=0,029), d.h. intrazelluläres TLR3 wurde im Vergleich vermehrt exprimiert.

TLR3 CD14+CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Extrazellulär (4)	8,96	8,94	7,29	2,29	15,68	**0,029**
Intrazellulär (4)	30,67	27,03	13,52	18,6	50,03	

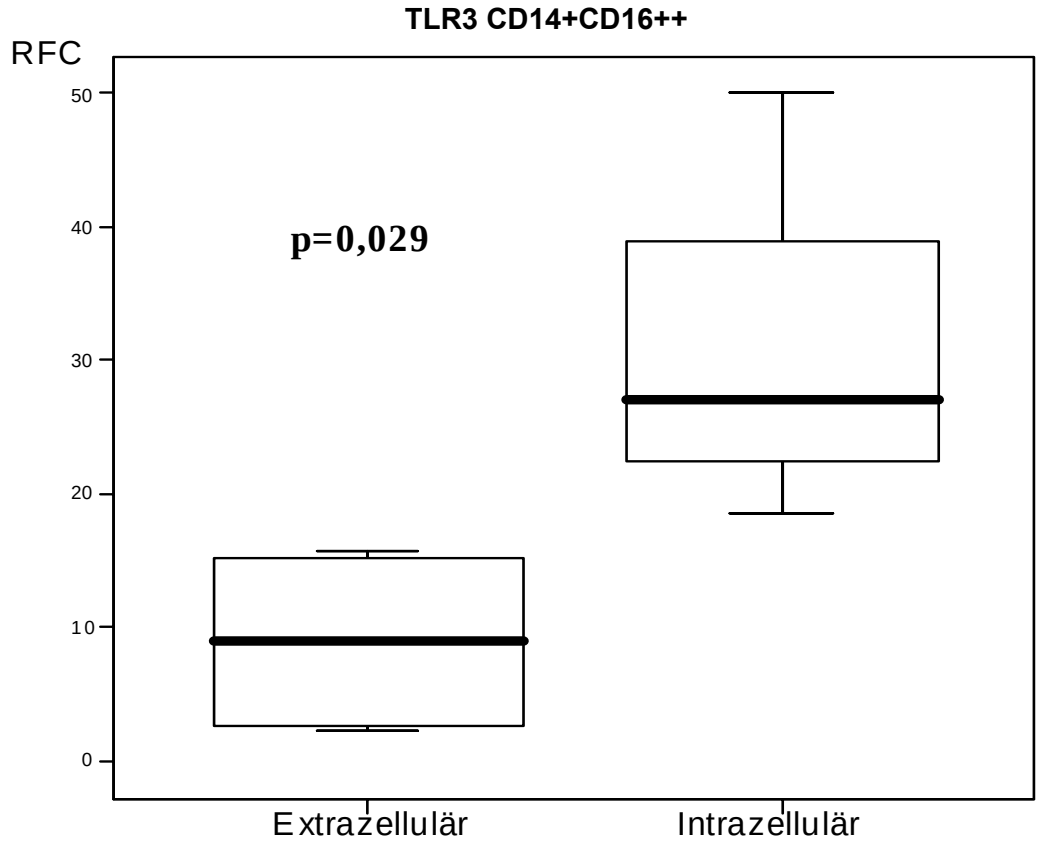


Abb. 38: Unterschiedliche Expression extrazellulärer- und intrazellulärer TLR3 der CD14+CD16++-Monozyten. Dialysepatienten mit HBV exprimierten vermehrt intrazelluläres TLR3. Dieser Unterschied war zweiseitig signifikant (**p=0,029**).

Dialysepatienten mit HBV-Infektion zeigten ein ähnliches TLR3-Rezeportverhalten wie Dialysepatienten ohne Hepatitisinfektion. TLR3 war bisher nur als Rezeptor von RNS-Viren bekannt. Unsere Ergebnisse zeigten eine mögliche Beteiligung an der Detektion von DNS-Viren. Bei HBV-Dialysepatienten war die intrazelluläre TLR3-Expression in CD14+CD16+-Zellen sogar noch höher als bei HCV-Patienten.

Bei HD-Patienten mit Hepatitis C und HD-Patienten mit Hepatitis B- und C- Infektion zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen intra- und extrazellulärer TLR3-Expression. Die einzelnen Messergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

7.6 HLA-DR- und TLR-Expression unter immunkompromittierten Bedingungen

7.6.1 HLA-DR CD14++CD16neg.

Tab. 29: Messergebnisse zu HLA-DR auf CD14++CD16neg.-Monozyten.

HLA-DR CD14++CD16neg.	MW	Median	SD	Min	Max
Gesunde (13)	843,8	820,47	317,33	399,54	1526,14
Patienten mit Glukokortikoidtherapie (8)	494,45	433,39	310,81	139,49	1186,37
Patienten ohne Glukokortikoidtherapie (13)	583,40	500,29	327,07	130,97	1186,37
Hämodialysepatienten (29)	625,63	655,25	218,13	210,02	1009,04

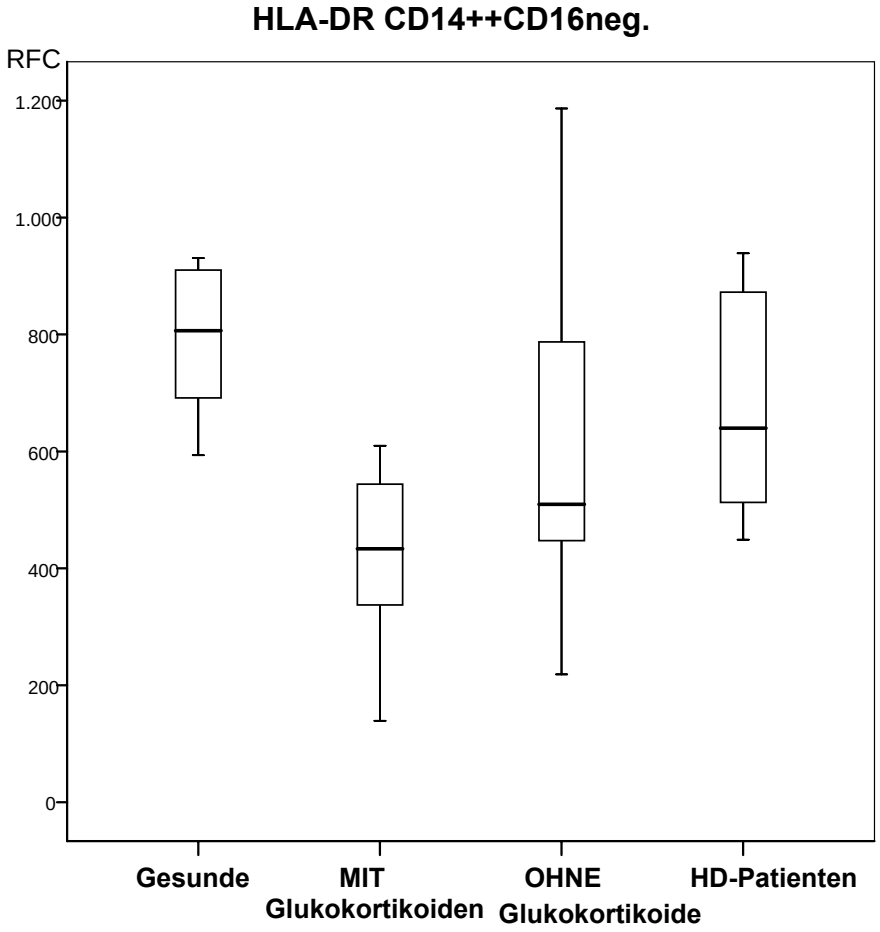


Abb. 39: Patienten unter Glukokortikoidtherapie und HD-Patienten exprimierten weniger HLA-DR auf CD14++CD16neg. Monozyten als Gesunde:

HLA-DR CD14++CD16neg.	Zweiseitige Signifikanz p=
Gesunde und Patienten mit Glukokortikoidtherapie	**0,017***
Gesunde und Hämodialysepatienten	**0,047***

* = Ergebnis nach Anwendung des Bonferroni-Holm-Tests nicht mehr signifikant. Im direkten Mann-Whitney-Vergleich zeigte sich noch ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweils einzelnen Gruppen.

7.6.2 TLR2 CD14+CD16++

Tab. 30: Messergebnisse der CD14+CD16++-Monozyten. Hierbei ergab sich ein zweiseitig signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit Glukokortikoidtherapie und denen, die dialysiert werden.

TLR2 CD14+CD16++	MW	Median	SD	Min	Max
Gesunde (13)	69,34	64,65	17,36	32,2	104,6
Patienten mit Glukokortikoidtherapie (8)	56,77	53,19	31,55	5,19	118,64
Patienten ohne Glukokortikoidtherapie (13)	81,51	68,54	76,30	7,23	317,65
Hämodialysepatienten (29)	83,19	77,74	22,35	49,58	129,8

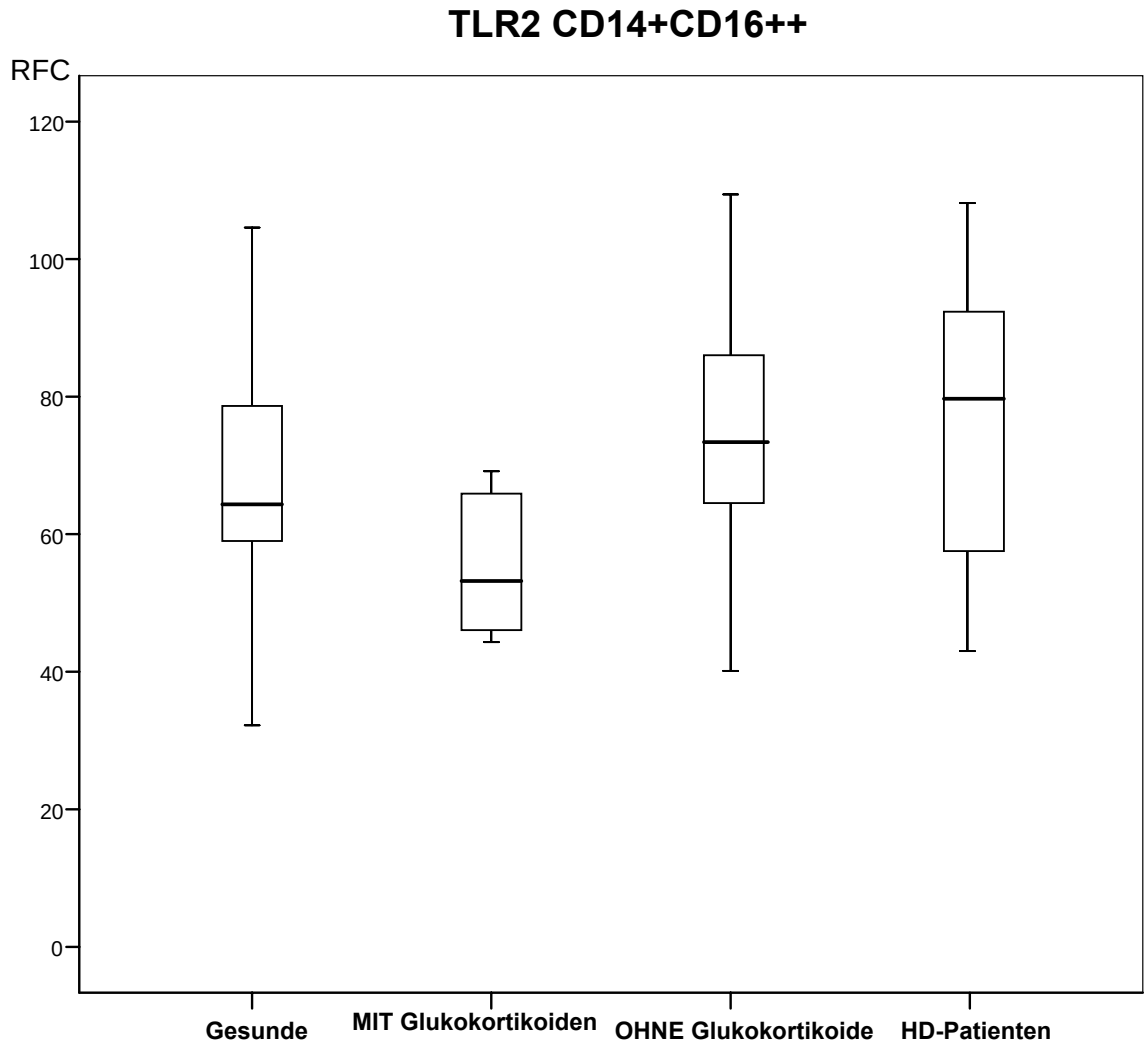


Abb. 40: Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 30. Patienten unter Glukokortikoidtherapie exprimierten weniger TLR2 auf CD14+CD16++-Monozyten. (**p=0,0088***).
* = Ergebnis nach Anwendung des Bonferroni-Holm-Tests nicht mehr signifikant. Im direkten Mann-Whitney-Vergleich zeigte sich noch ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweils einzelnen Gruppen.

7.6.3 TLR4 intrazelluläre CD14+CD16+

Tab. 31: Ergebnisse der intrazellulären TLR4-Expression von CD14+CD16+-Monozyten.

TLR4 intrazellulär CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max
Gesunde (13)	18,78	15,26	11,89	6,74	53,76
Patienten mit Glukokortikoidtherapie (8)	16,23	12,96	7,4	10,05	30,23
Patienten ohne Glukokortikoidtherapie (13)	20,84	19,9	7,97	9,82	40,32
Hämodialysepatienten (29)	34,35	23,71	25,56	10,65	112,4

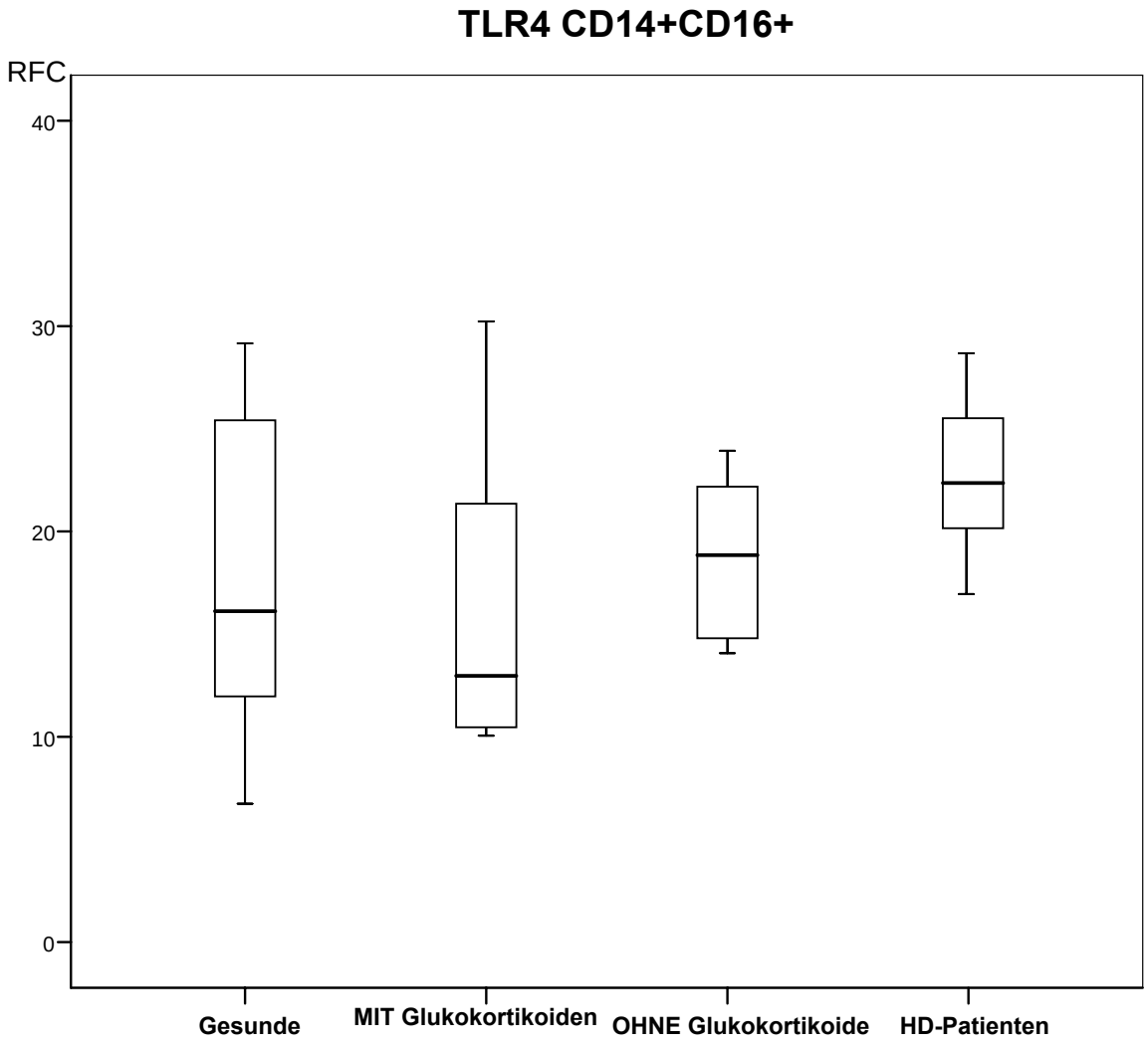


Abb. 41: Dargestellt sind die im FACS gemessenen Ergebnisse der einzelnen Gruppen. Dialysepatienten exprimierten mehr TLR4 in CD14+CD16+-Zellen als Gesunde und Patienten unter Glukokortikoidtherapie. Die zweiseitige Signifikanz betrug:

TLR4 intrazellulär CD14+CD16+	Zweiseitige Signifikanz p=
Gesunde und Patienten mit Hämodialyse	**0,005**
Patienten mit Glukokortikoidtherapie und Patienten mit Hämodialyse	**0,007**

7.6.4 TLR4 intrazellulär CD14+CD16++

Tab. 32: Messergebnisse intrazellulärer TLR4-Expression der CD14+CD16++-Monozyten.

TLR4 intrazellulär CD14+CD16++	MW	Median	SD	Min	Max
Gesunde (13)	15,14	10,18	14,11	2,57	54,25
Patienten mit Glukokortikoidtherapie (8)	11,03	8,22	7,94	1,23	22,88
Patienten ohne Glukokortikoidtherapie (13)	14,24	14,86	4,95	7,3	22,27
Hämodialysepatienten (29)	36,67	22,77	32,77	3,00	119,71

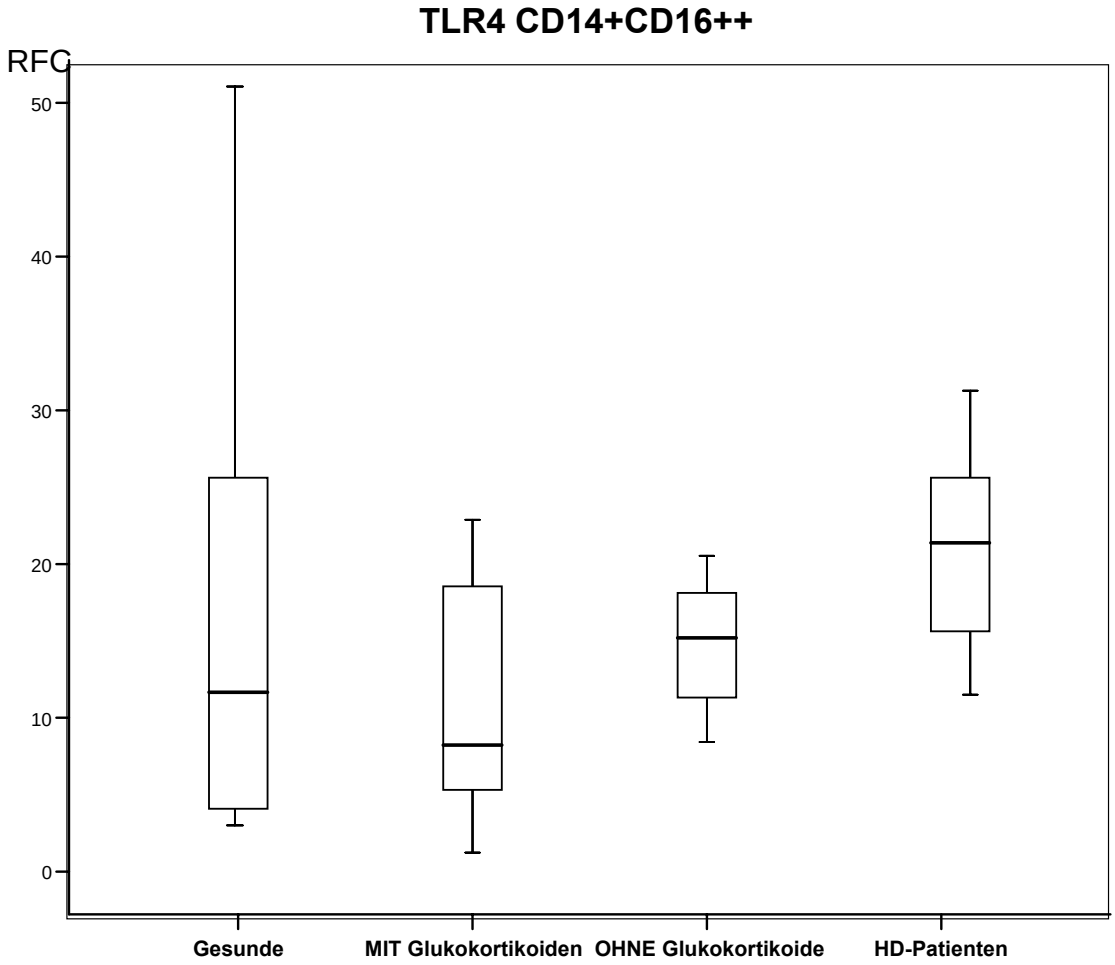


Abb. 42: HD-Patienten exprimierten signifikant mehr TLR4 in CD14+CD16++-Zellen als Personen der Vergleichsgruppen:

TLR4 intrazellulär CD14+CD16++	Zweiseitige Signifikanz p=
Gesunde und Hämodialysepatienten	**0,008**
Patienten mit Glukokortikoidtherapie und Hämodialysepatienten	**0,010**
Patienten ohne Glukokortikoidtherapie und Hämodialysepatienten	**0,012**

7.6.5 Anteil der CD14+CD16+-Monozyten

Tab. 33: Messungen des Anteils von CD14+CD16+-Monozyten an der Gesamtmonozytenpopulation.

Anteil der CD14+CD16+ Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max
Gesunde (13)	6,51	6,55	1,55	3,6	8,84
Patienten mit Glukokortikoidtherapie (8)	9,24	9,8	5,44	2,5	15,52
Patienten ohne Glukokortikoidtherapie (13)	9,6	7,14	5,63	3,66	19,45
Hämodialysepatienten (29)	13,16	14,69	5,54	2,23	21,74

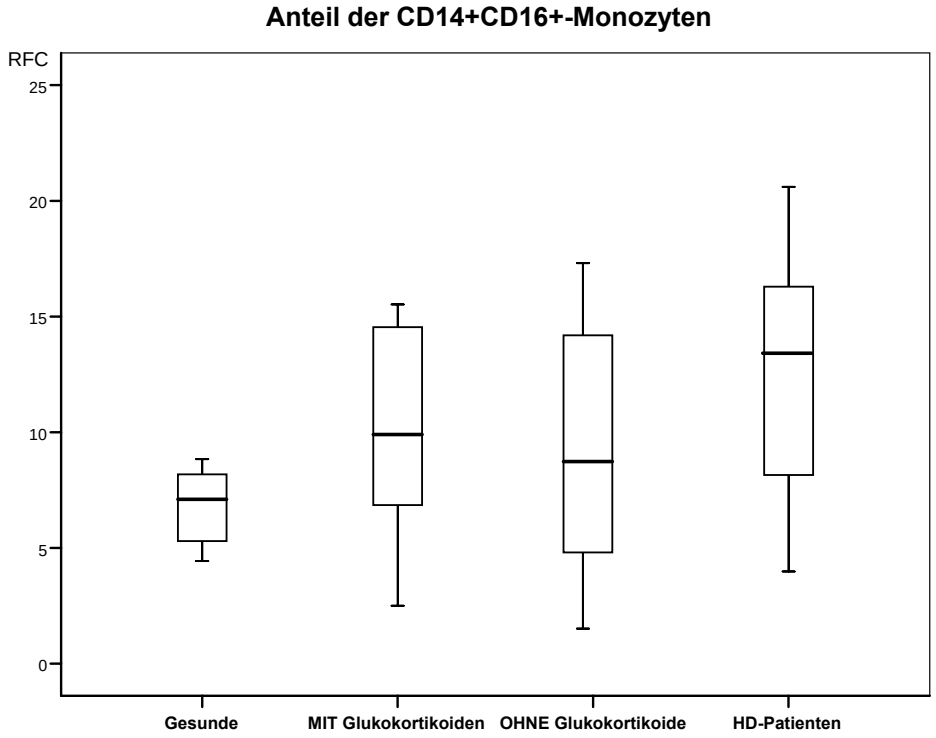


Abb. 43: Anteile der CD14+CD16+-Monozyten bei den unterschiedlichen Kohorten. HD-Patienten hatten signifikant mehr CD14+CD16+-Monozyten im peripheren Blut als Gesunde oder Patienten, die nicht unter GK-Therapie stehen*:*

Anteil der CD14+CD16+ Monozyten	Zweiseitige Signifikanz p=
Gesunde und Hämodialysepatienten	**0,0002**
Patienten ohne Glukokortikoidtherapie und Hämodialysepatienten	**0,048***

* = Ergebnis nach Anwendung des Bonferroni-Holm-Tests nicht mehr signifikant. Im direkten Mann-Whitney-Vergleich zeigte sich noch ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweils einzelnen Gruppen.

Bei Patienten, die Glukokortikoide in therapeutischer Dosierungen erhielten, waren vermehrt CD14+CD16+-Zellen im Blut nachzuweisen. Diese Monozyten sind allerdings nicht ausreichend mit TLR bestückt. Dies könnte ein Hinweis auf einen weiteren immunsupprimierenden Wirkmechanismus der Glukokortikoide sein. Verminderte TLR-Expression führt zu einer geringeren Zytokinfreisetzung und damit einer Suppression der Immunantwort.

7.6.6 CRP

Tab. 34: Konzentration von C-reaktivem Protein im Serum. Der Wert für die Vergleichsgruppe wurde auf 0,3mg/dl festgelegt.

C-reaktives Protein (mg/dl)	MW	Median	SD	Min	Max
Gesunde (13)	0,3	0,3	0	0,3	0,3
Patienten mit Glukokortikoidtherapie (8)	0,75	0,75	0,43	0,3	1,4
Patienten ohne Glukokortikoidtherapie (13)	0,98	0,6	1,16	0,4	4,8
Hämodialysepatienten (29)	0,7	0,6	0,4	0,3	1,9

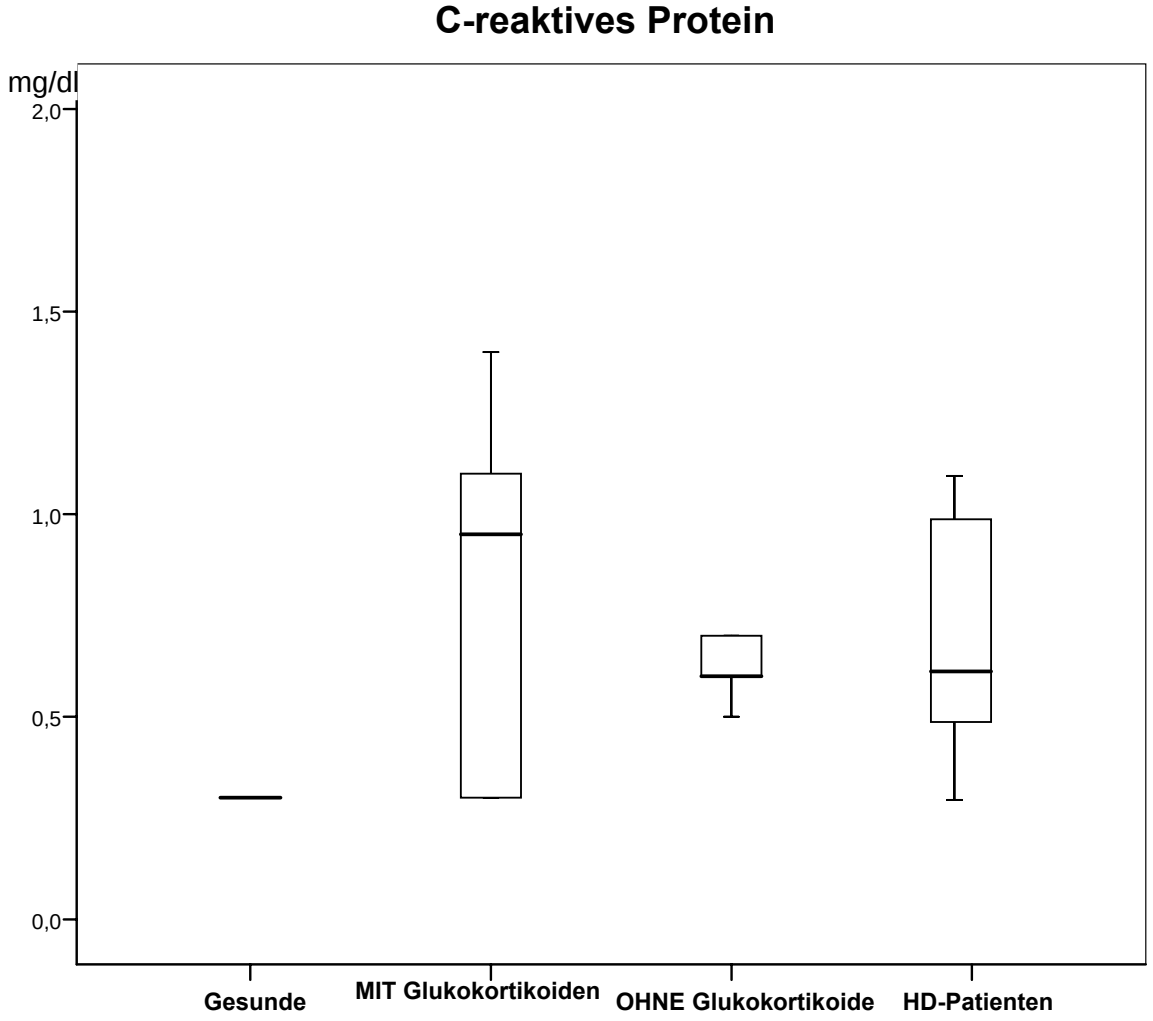


Abb. 44: Nierenkranke Patienten mit GK-Therapie, NK-Patienten ohne GK-Therapie und Dialysepatienten hatten höhere CRP-Konzentrationen (in mg/dl) im Blut als Gesunde:

C- reaktives Protein	Zweiseitige Signifikanz p=
Gesunde und Patienten mit Glukokortikoidtherapie	**0,001**
Gesunde und Patienten ohne Glukokortikoidtherapie	**<< 0,0001**
Gesunde und Hämodialysierte	**<< 0,0001**

7.6.7 Kreatinin

Tab. 35: Ergebnisse der Labormessung von Kreatinin im Patientenserum (in mg/dl). Für die Vergleichsgruppe wurde der Serum-Kreatininwert auf 1,3mg/dl festgelegt.

Kreatinin im Serum (in mg/dl)	MW	Median	SD	Min	Max
Gesunde (13)	1,2	1,2	0	1,2	1,2
Patienten mit Glukokortikoidtherapie (8)	2,3	2,37	0,95	1,21	3,87
Patienten ohne Glukokortikoidtherapie (13)	3,9	3,69	2,41	1,08	7,63
Hämodialysepatienten (29)	8,45	8,0	3,45	0,94	15,26

.

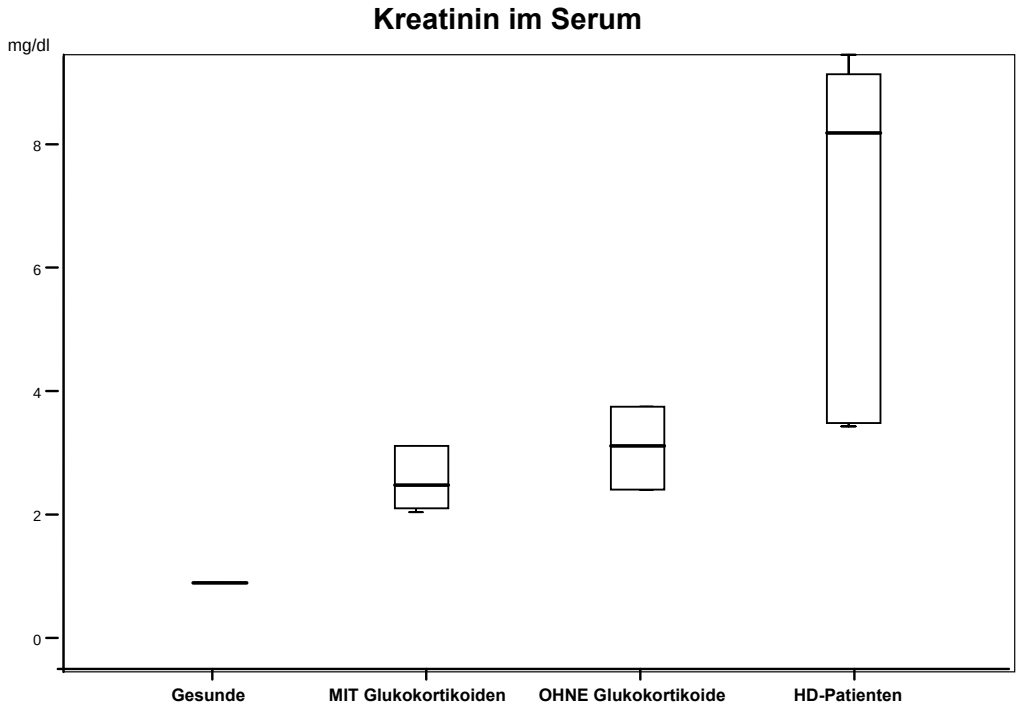


Abb. 45: Boxplotdarstellung zum Kreatinin (in mg/dl). Dialysepatienten hatten im Vergleich den höchsten Kreatininwert im Serum.

Kreatinin im Serum	Zweiseitige Signifikanz p=
Gesunde und Patienten mit Glukokortikoidtherapie	**<< 0,0001**
Gesunde und Patienten ohne Glukokortikoidtherapie	**<< 0,0001**
Gesunde und Hämodialysierte	**<< 0,0001**
Patienten mit Glukokortikoidtherapie und Hämodialysepatienten	**0,0005**
Patienten ohne Glukokortikoidtherapie und Hämodialysepatienten	**0,0003**

Die Expression folgender untersuchter Parameter unterschied sich nicht signifikant zwischen den unterschiedlichen klinischen Gruppen: Totale CD 14 Expression, HLA-DR auf CD14+CD16+ und CD14+CD16++ Zellen, TLR2 auf CD14++CD16neg. und CD14+CD16+ Zellen und TLR4 auf CD14++CD16neg. Zellen. Die einzelnen Messergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

7.7 HLA-DR- und TLR-Expression bei erhöhten humoralen Entzündungsparametern

7.7.1 Nierentransplantierte

Tab. 36: Ergebnisse der HLA-DR-Messung auf CD14++CD16neg.-Monozyten bei hohen und niedrigen CRP-Werten. Hierbei ergab sich ein zweiseitig signifikanter Unterschied von p=0,034.

HLA-DR CD14++CD16neg.	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (21)	669,97	729,93	243,2	214,8	1274,88	**0,034**
CRP>1,0 (5)	410,67	355,45	165,39	235,01	593,52	

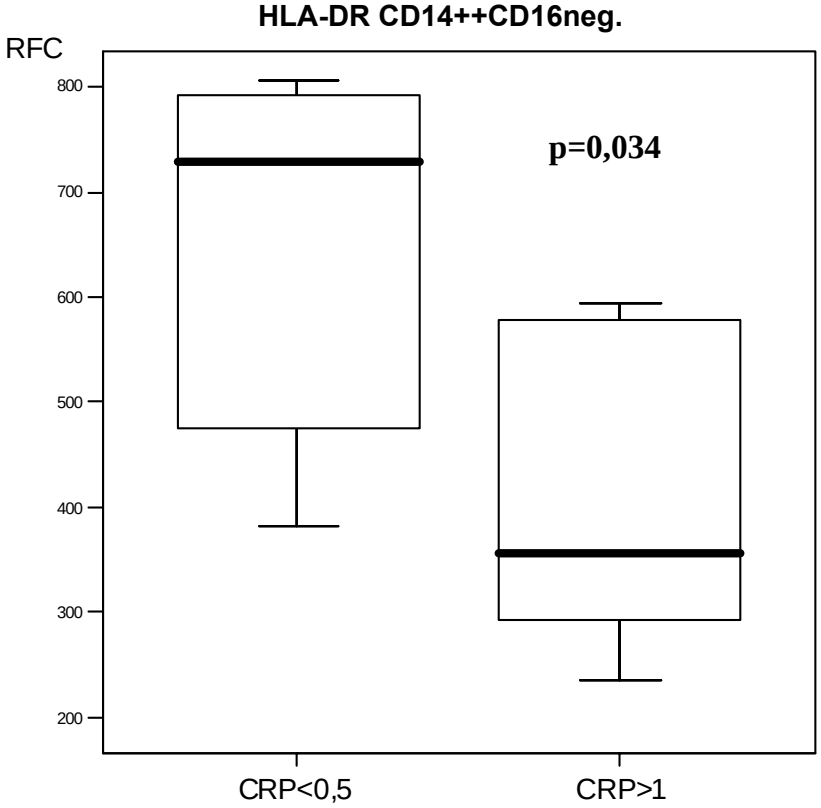


Abb. 46 : NTX-Patienten mit einem hohen CRP exprimierten signifikant weniger HLA-DR auf CD14++CD16neg.-Zellen (p=0,034)

Tab. 37: TLR2-Expression von CD14++CD16neg.-Monozyten bei Nierentransplantierten.

TLR2 CD14++CD16neg.	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (21)	55,22	45,32	25,88	24,58	104,6	**0,006**
CRP>1,0 (5)	28,66	25,71	7,36	20,54	38,89	

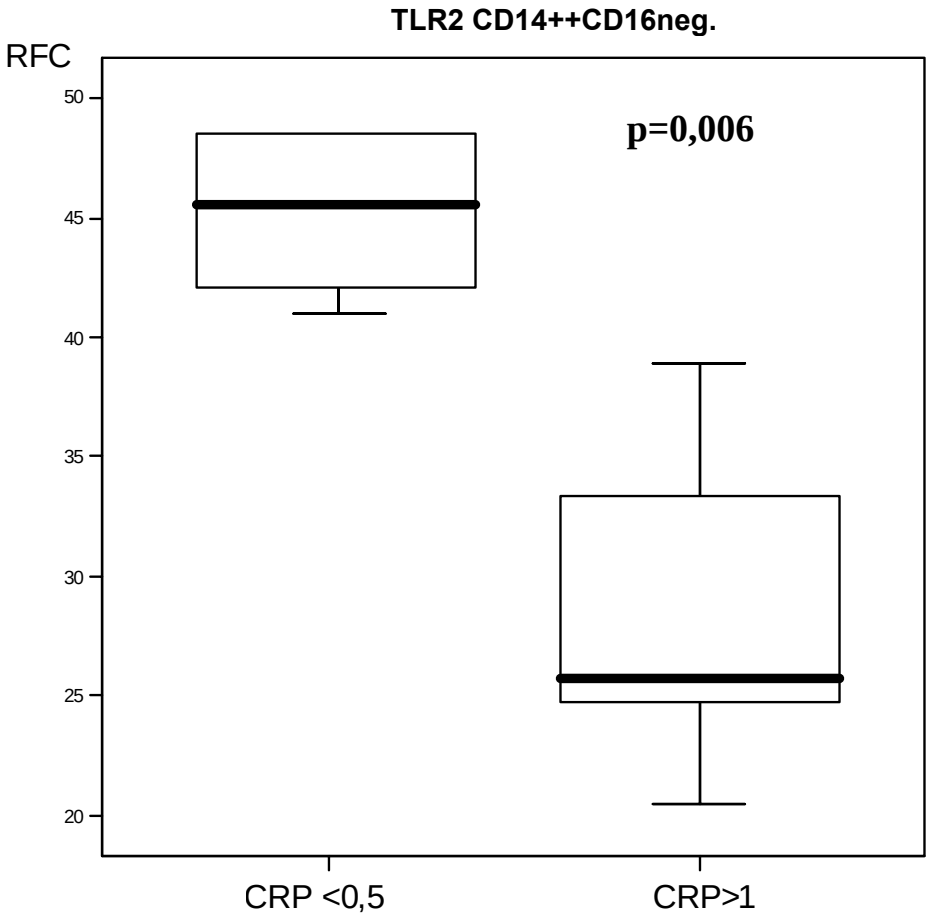


Abb. 47: Expression von TLR2 auf CD14++CD16neg.-Monozyten. NTX-Patienten mit einem hohen CRP exprimierten signifikant weniger TLR2 auf CD14++CD16neg.-Zellen (**p=0,006)**.

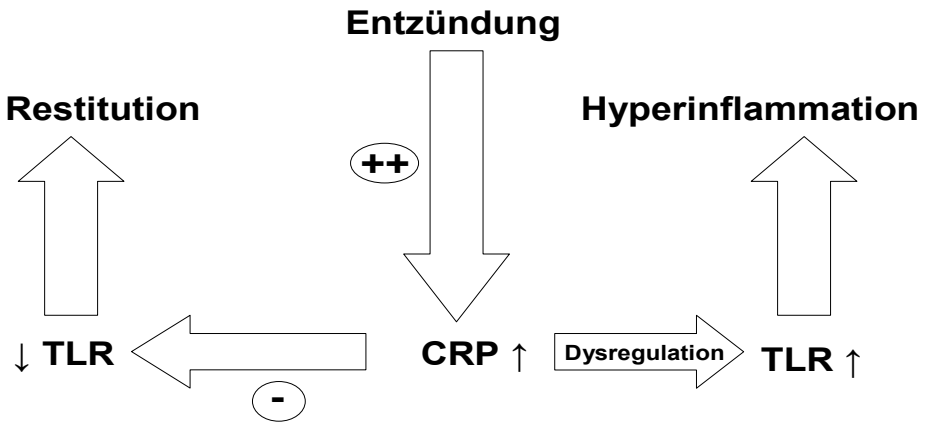


Abb. 48: Die Suppression der TLR in der Gruppe der Nierentransplantierten mit höheren CRP-Werten lässt ein erhöhtes proinflammatorisches Potential bei diesen Patienten vermuten. Nach einem Entzündungsreiz und der Bindung von Liganden an TLR kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen und der humorale Entzündungsmarker CRP steigt an. Danach könnte es zu einer negativen Rückkopplung kommen und die Expression von TLR absinken, mit dem Ziel die Entzündungsreaktion zu unterbrechen und das Transplantat zu schützen. Andererseits könnte eine TLR-Dysregulation zu einer überschießenden Entzündungsreaktion und negativer Verstärkung derselben führen, die eine Gefahr für das Transplantat darstellt.

Tab. 38: TLR2 auf CD14+CD16+-Zellen, gemessen im FACS (Einheit=RFC). Es ergab sich ein zweiseitig signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (**p=0,002)**.

TLR2 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (21)	113,88	113,42	29,59	62,64	168,49	**0,002**
CRP>1,0 (5)	71,43	69,16	6,75	64,36	81,31	

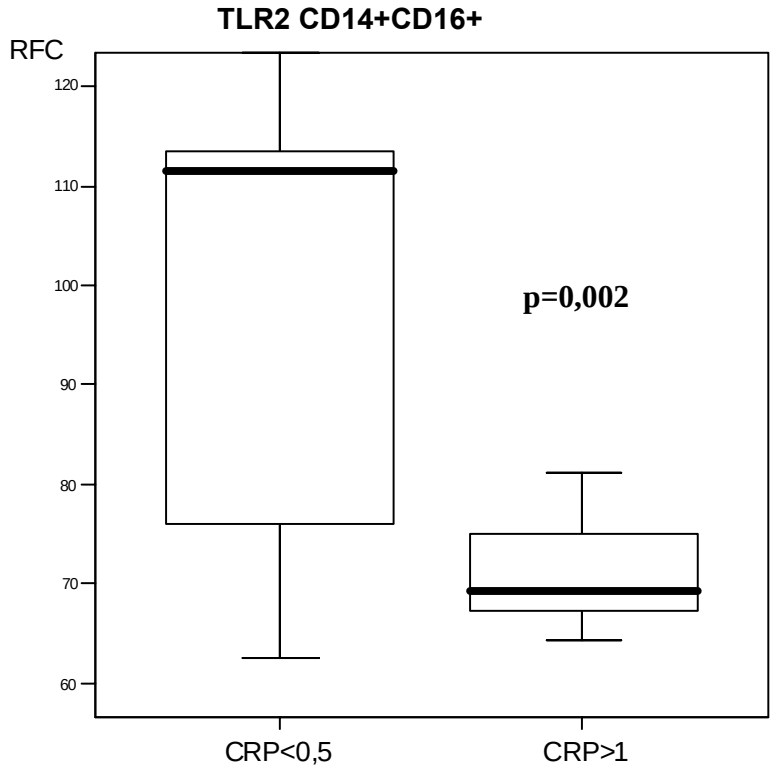


Abb. 49:Nierentransplantierte mit hohem CRP exprimierten weniger TLR2 auf proinflammatorischen CD14+CD16+-Monozyten (**p=0,002**).

Tab. 39: Expression von TLR2 auf CD14+CD16++-Monozyten. Einheiten in RFC (Relative Fluoresceine Counts). Es ergab sich ein zweiseitig signifikanter Unterschied von p=0,005.

TLR2 CD14+CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (21)	76,14	73,65	21,45	35,55	134,56	**0,005**
CRP>1,0 (5)	52,02	52,27	7,64	41,79	62,08	

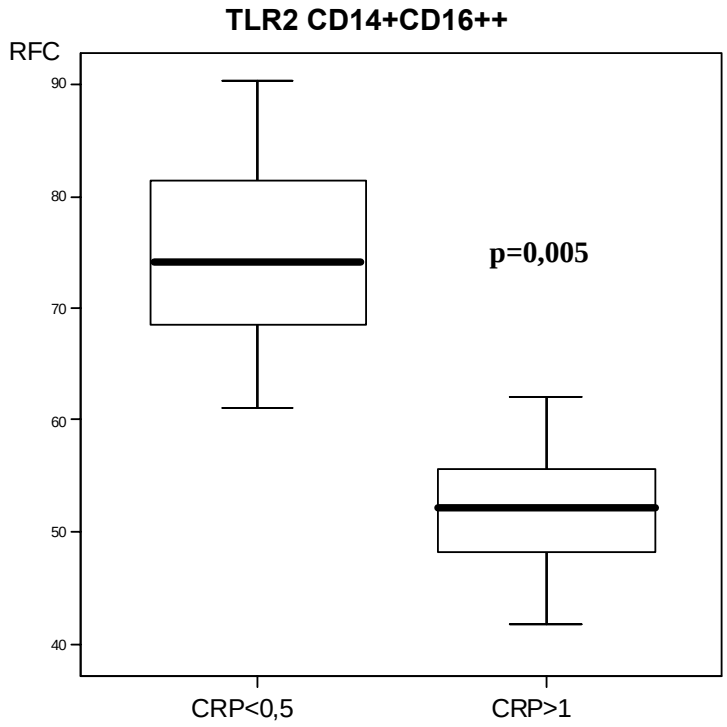


Abb.50: Nierentransplantierte mit einem hohen CRP exprimierten weniger TLR2 auf CD14+CD16++-Monozyten als NTX-Patienten mit niedrigem CRP (**p=0,005)**.

Die Expression folgender untersuchter Parameter unterschied sich bei NTX-Patienten nicht signifikant zwischen den untersuchten klinischen Gruppen: Totale Expression von CD14 Monozyten, HLA-DR auf CD14+CD16+ und CD14+CD16++ Monozyten, TLR4 auf allen Monozytensubpopulationen sowie der Anteil der CD14+CD16+ Zellen und das Kreatinin. Die einzelnen Messergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

Bei HD-Patienten und chronisch Niereninsuffizienten unterschied sich die HLA-DR und TLR-Expression nicht zwischen den untersuchten Gruppen. Bei diesen chronisch kranken Patienten kommt es anscheinend nicht zu einer adäquaten TLR-Regulation, wie dies bei NTX-Patienten zu beobachten war (s. Abb. 48).

7.8 HLA-DR und TLR bei vermehrter Retention

Die HLA-DR und TLR-Expression unterschied sich bei chronisch Niereninsuffizienten und Nierentransplantierten nicht signifikant zwischen den untersuchten klinischen Gruppen. Die einzelnen Messergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

7.9 Expression proinflammatorischer Monozyten bei Nierentransplantierten mit Transplantatdysfunktion

7.9.1 Totale CD14 Expression

Tab. 40: Totale CD14 Expression. MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung. Max/Min=gemessene Maximal- bzw. Mindestwerte. In Klammern steht die Anzahl der Patienten.

Totale CD14 Expression	MW	Median	SD	Min	Max
Hämodialysepatienten (29)	450,29	433,23	92,21	352,27	798,63
Nierentransplantierte und nach Abstoßung wieder Dialysierte (6)	319,91	313,44	41,49	261,80	375,16
Nierentransplantierte (28)	391,78	371,81	93,52	254,83	685,39

.

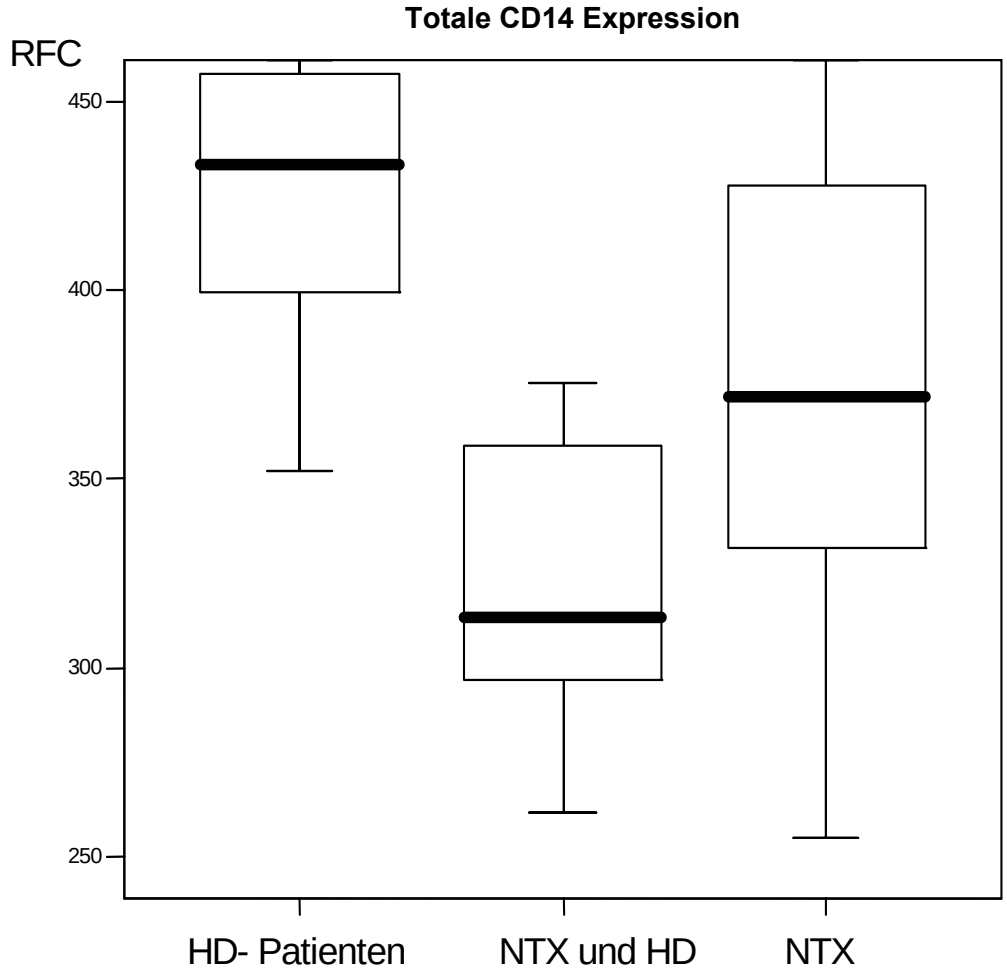


Abb. 51: Nierentransplantierte nach Transplantatabstoßung wiesen am wenigsten CD14-Monozyten auf. Es folgten NTX-Patienten und HD-Patienten.

Totale CD14 Expression	Zweiseitige Signifikanz p=
Nierentransplantierte&Dialysierte mit HD-Pat.	**0,0003**
Nierentransplantierte mit HD-Pat.	**0,002**

7.9.2 TLR2 CD14+CD16+

Tab. 41: TLR2 auf CD14+CD16+-Zellen; Einheiten in RFC (Relative Fluoresceine Counts). MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung. Max/Min=gemessene Maximal- bzw. Mindestwerte

TLR2 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max
Hämodialysepatienten (29)	105,78	95,6	29,88	69,16	182,69
Nierentransplantierte und nach Abstoßung wieder Dialysierte (6)	36,62	28,20	21,94	16,85	64,65
Nierentransplantierte (28)	105,70	105,65	30,24	62,64	168,49

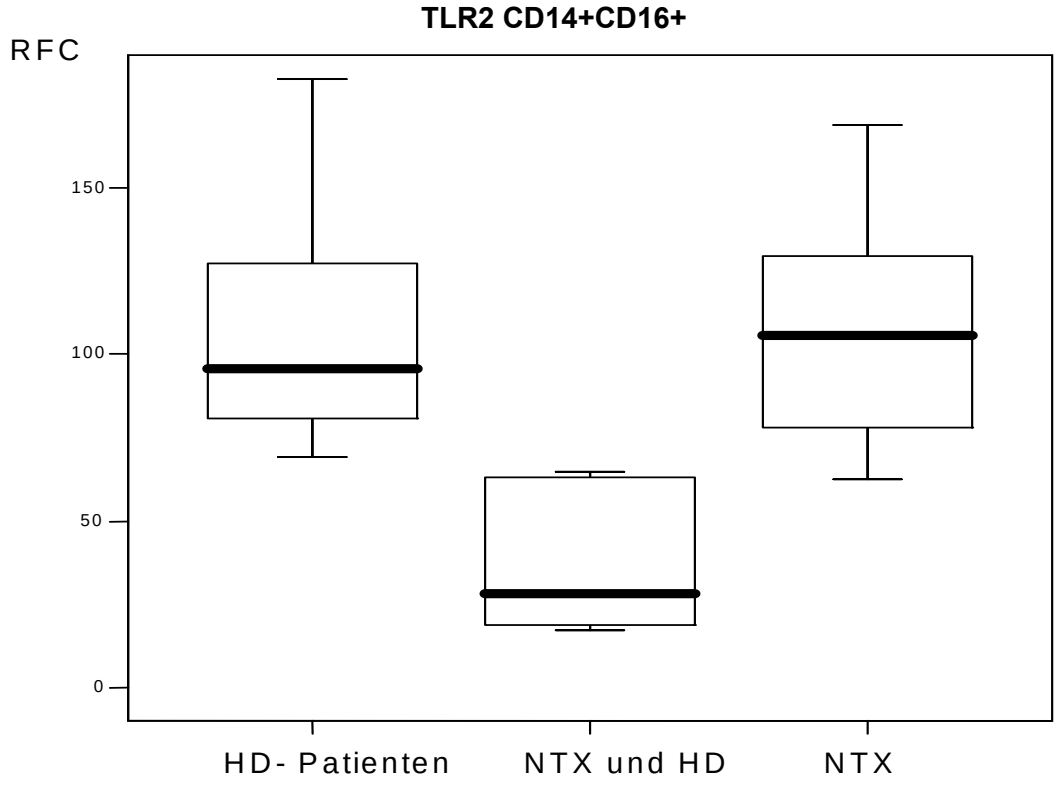


Abb. 52: Boxplotdarstellung der Expression von TLR2 auf CD14+CD16+-Monozyten. Patienten mit Transplantatabstoßung exprimierten signifikant weniger TLR2 auf CD14+CD16+-Zellen als HD- und NTX-Patienten:

TLR2 CD14+CD16+	Zweiseitige Signifikanz p=
Nierentransplantierte&Dialysierte mit NTX-Patienten	**0,0002**
Nierentransplantierte&Dialysierte mit Hämodialysierten	**0,0001**

7.9.3 TLR2 CD14+CD16++

Tab. 42: Expression von TLR2 auf CD14+CD16++-Monozyten.

TLR2 CD14+CD16++	MW	Median	SD	Min	Max
Hämodialysepatienten (29)	83,19	77,74	22,35	49,58	129,80
Nierentransplantierte und nach Abstoßung wieder Dialysierte (6)	21,77	21,02	10,41	11,55	40,32
Nierentransplantierte (28)	73,10	68,23	20,64	35,55	134,56

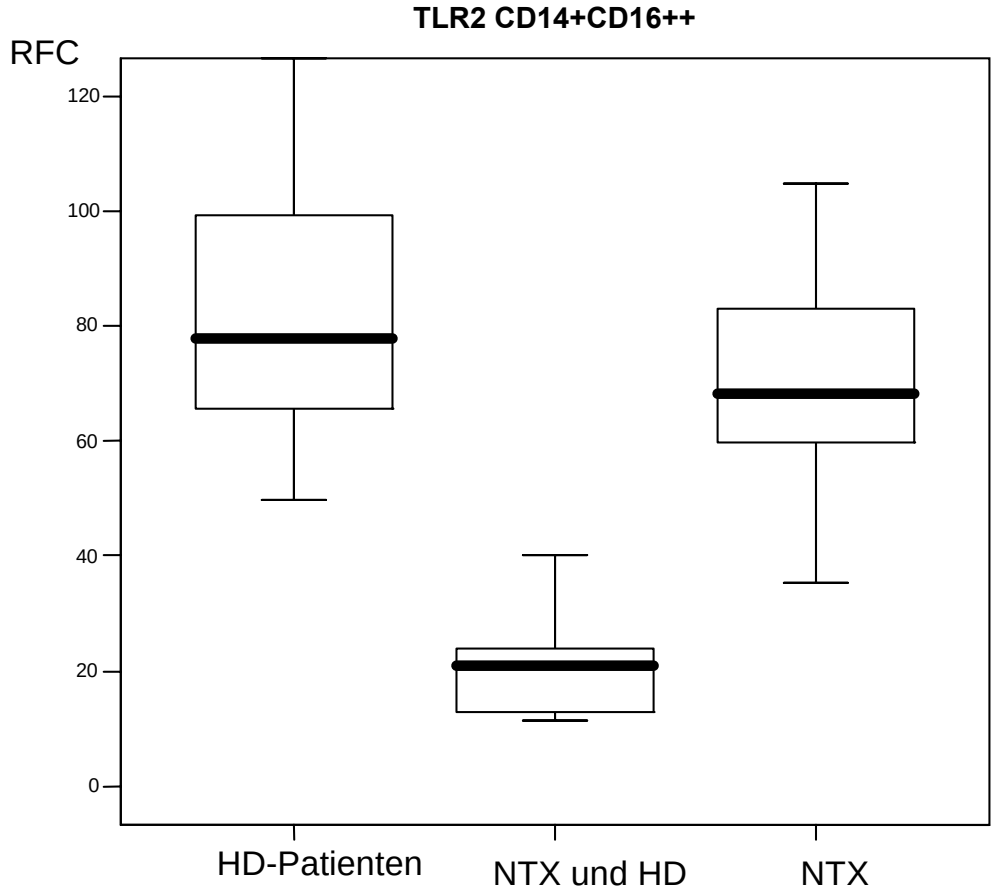


Abb. 53: Boxplot zur TLR2-Expression auf CD14+CD16++-Zellen.
Patienten mit Transplantatabstoßung exprimierten signifikant weniger TLR2 auf CD14+CD16++ Zellen als HD- und NTX-Patienten:

TLR2 CD14+CD16++	Zweiseitige Signifikanz p=
Nierentransplantierte&Dialysierte mit Nierentransplantierten	**0,0002**
Nierentransplantierte&Dialysierte mit Hämodialysepatienten	**0,0001**

7.9.4 TLR4 intrazellulär CD14+CD16+

Tab. 43: Intrazelluläre TLR4-Expression von CD14+CD16+-Zellen.

TLR4 intrazellulär CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max
Hämodialysepatienten (29)	34,35	23,71	25,56	10,65	112,4
Nierentransplantierte und nach Abstoßung wieder Dialysierte (6)	13,59	10,86	6,25	7,3	22,88
Nierentransplantierte (28)	27,40	23,99	18,32	1,6	73,65

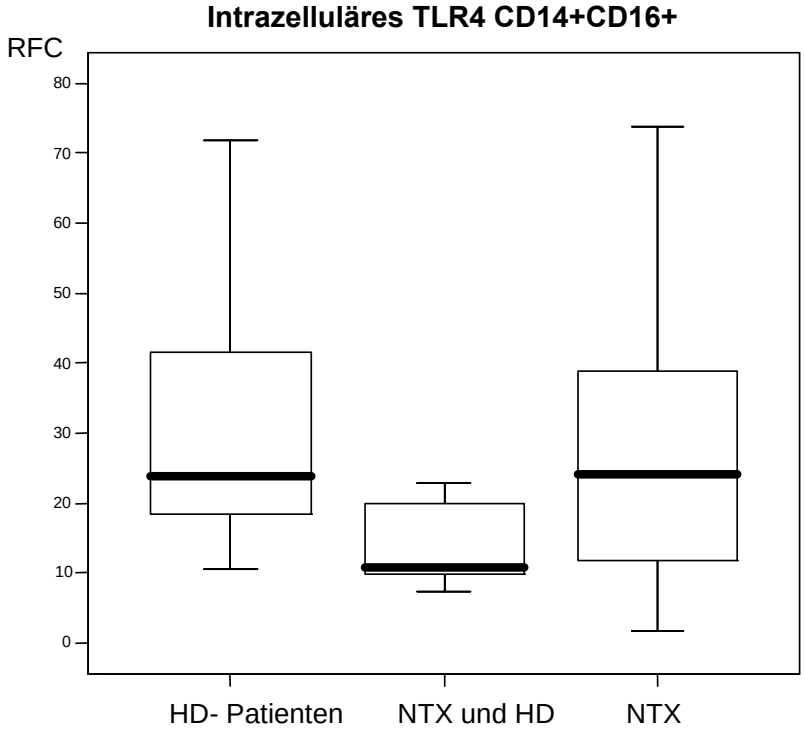


Abb. 54: Boxplotdarstellung zu den Ergebnissen aus obiger Tabelle. Patienten mit Transplantatabstoßung exprimierten signifikant weniger TLR4 in CD14+CD16+-Zellen als HD- und NTX- Patienten:

TLR4 intrazellulär CD14+CD16+	Zweiseitige Signifikanz p=
Nierentransplantierte&Dialysierte mit Nierentransplantierten	**0,049***
Nierentransplantierte&Dialysierte mit Hämodialysepatienten	**0,005**

* = Ergebnis nach Anwendung des Bonferroni-Holm-Tests nicht mehr signifikant. Im direkten Mann-Whitney-Vergleich zeigte sich noch ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweils einzelnen Gruppen.

Patienten nach chronischer Transplantatabstoßung hatten am wenigsten CD14-Zellen im Blut. Die Zahl der proinflammatorischen CD14+CD16+-Monozyten war bei diesen Patienten im Vergleich zu stabilen Dialysepatienten erhöht. Gleichzeitig exprimierten diese Zellen weniger TLR. Diese Beobachtungen deuten auf eine unverändert bestehende „Mikroinflammation“ hin, verursacht durch die erhöhte Anzahl an CD14+CD16+-Monozyten.

.

7.9.5 TLR4 intrazellulär CD14+CD16++

Tab. 44: Intrazelluläre TLR4-Expression der CD14+CD16++- Monozyten.

TLR4 intrazellulär CD14+CD16++	MW	Median	SD	Min	Max
Hämodialysepatienten (29)	36,67	22,77	32,77	3,0	119,71
Nierentransplantierte und nach Abstoßung wieder Dialysierte (6)	11,6	11,29	3,71	6,98	18,02
Nierentransplantierte (28)	23,61	22,02	16,5	1,0	63,78

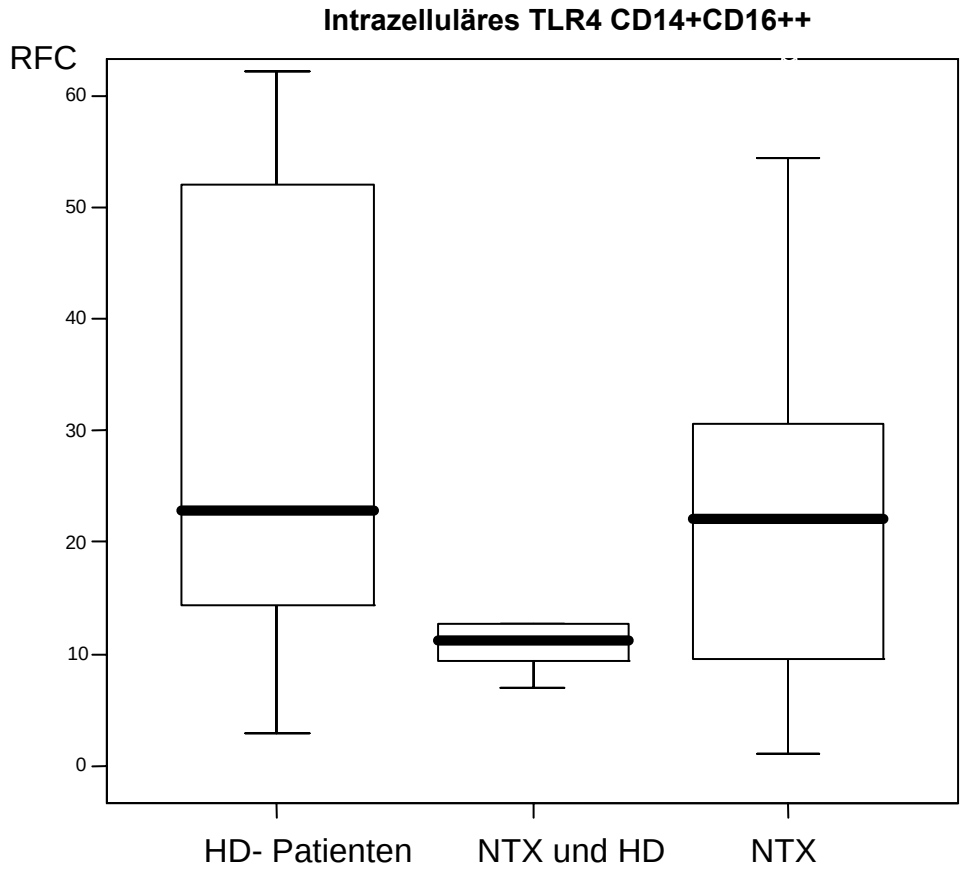


Abb. 55: Expression intrazellulärer TLR4 der CD14+CD16++-Monozyten. Patienten mit Transplantatabstoßung exprimierten signifikant weniger TLR4 in CD14+CD16++-Zellen als HD-Patienten:

TLR4 intrazellulär CD14+CD16++	Zweiseitige Signifikanz p=
Nierentransplantierte&Dialysierte mit Hämodialysierten	**0,017***

* = Ergebnis nach Anwendung des Bonferroni-Holm-Tests nicht mehr signifikant. Im direkten Mann-Whitney-Vergleich zeigte sich noch ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweils einzelnen Gruppen.

7.9.6 CRP

Tab. 45: Ergebnisse der Messungen des C-reaktiven Proteins im Patientenserum (in mg/d)

CRP in mg/dl	MW	Median	SD	Min	Max
Hämodialysepatienten (29)	0,71	0,6	0,41	0,3	1,9
Nierentransplantierte und nach Abstoßung wieder Dialysierte (6)	0,87	0,6	0,66	0,4	2,1
Nierentransplantierte (28)	0,47	0,3	0,31	0,3	1,4

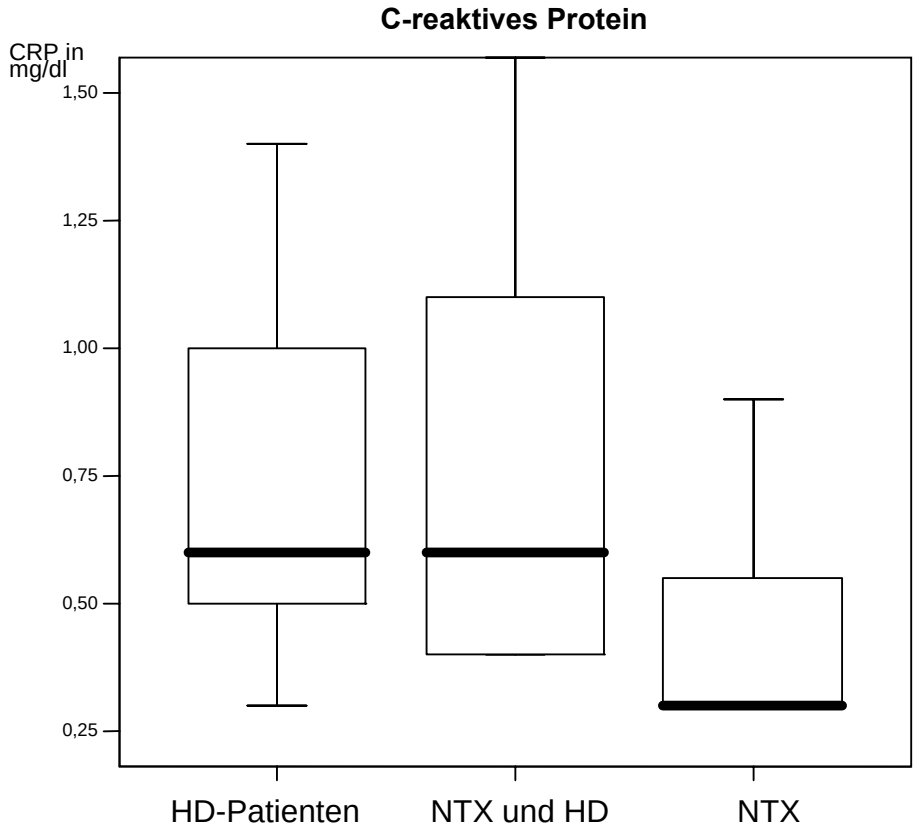


Abb. 56: Boxplotdarstellung des CRP im Patientenserum (in mg/dl). Nierentransplantierte, die immunsupprimiert sind, hatten signifikant weniger CRP im Serum als HD-Patienten und Patienten nach Transplantatversagen. Auffallend ist, dass CGF(chronic graft failure)-Patienten ähnlich hohe CRP-Werte aufwiesen wie HD-Patienten.

CRP	Zweiseitige Signifikanz p=
Nierentransplantierte&Dialysierte mit Nierentransplantierten	**0,009**
Nierentransplantierte mit Hämodialysierten	**0,004**

7.9.7 Kreatinin

Tab. 46: Kreatininwerte der Patientengruppen im Vergleich (in mg/dl)

Kreatinin in mg/dl	MW	Median	SD	Min	Max
Hämodialysepatienten (29)	8,45	8,00	3,45	0,94	15,26
Nierentransplantierte und nach Abstoßung wieder Dialysierte (6)	10,34	10,47	2,95	5,63	14,11
Nierentransplantierte (28)	1,83	1,62	0,79	0,85	3,55

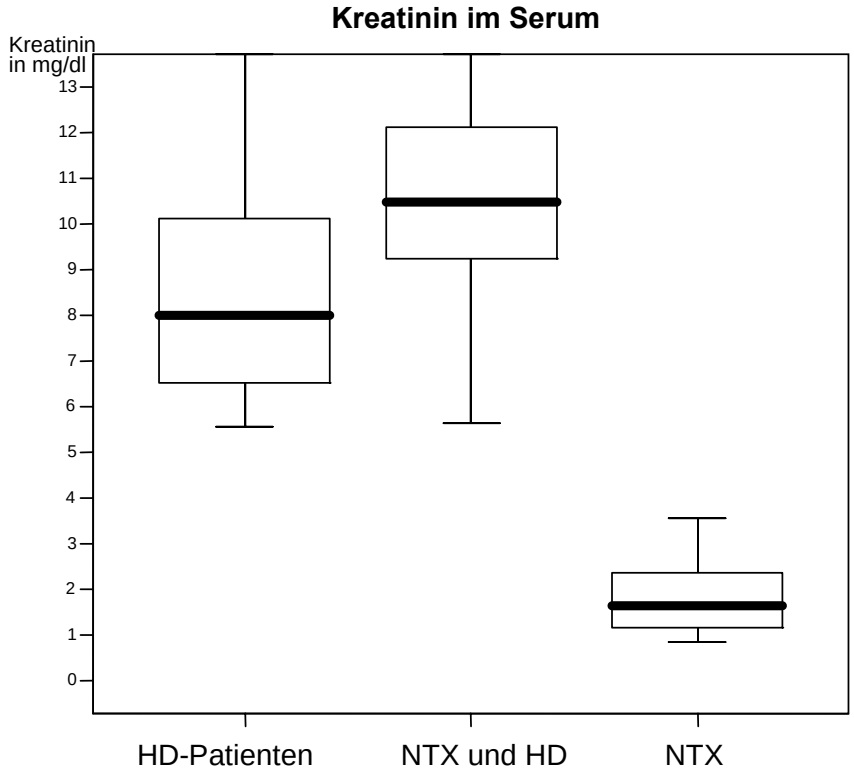


Abb. 57: Kreatinin im Serum der Patienten (in mg/dl). Nierentransplantierte, die immunsupprimiert sind, hatten signifikant weniger Kreatinin im Serum als HD-Patienten und Patienten nach Transplantatversagen:

Kreatinin im Serum	Zweiseitige Signifikanz p=
Nierentransplantierte&Dialysierte mit Nierentransplantierten	**0,0001**
Nierentransplantierte mit Hämodialysierten	**<< 0,0001**

Die Expression folgender untersuchter Parameter unterschied sich nicht signifikant zwischen den unterschiedlichen klinischen Gruppen: HLA-DR auf allen von uns gemessenen Monozyten, TLR2 auf CD14++CD16neg.-, TLR4 in CD14++CD16neg.-Zellen und der Anteil der CD14+CD16+-Zellen. Die einzelnen Messergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

7.10 Expression verschiedener Monozytenepitope nach in-vitro Inkubation mit mikrobiellen Antigenen

7.10.1 100 Kolonien E. coli

In den folgenden Grafiken ist der Expressionsverlauf von TLR2 bzw. TLR4 auf unterschiedlichen Monozytensubpopulationen dargestellt. Sowohl intra- als auch extrazelluläre TLR wurden nach Inkubation mit 100 Kolonien E. Coli vermehrt exprimiert. Dies bestätigt unsere Annahme, dass durch Antigenexposition die TLR-Expression besonders auf phagozytosepotenten Monozyten (CD14+CD16+) zunimmt. Alle erhobenen Mittelwerte sind aus drei Messungen gewonnen worden.

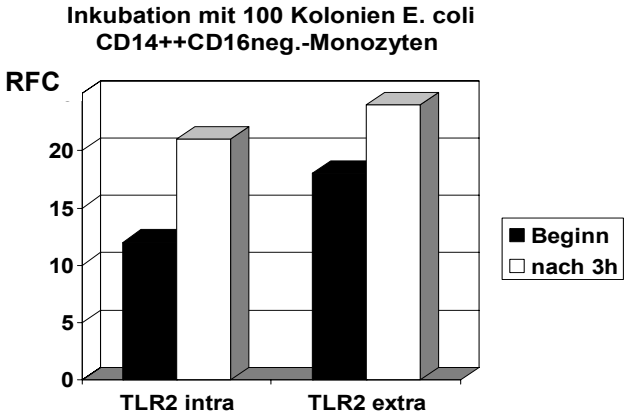


Abb. 58: TLR2 wurde nach Inkubation mit 100 Kolonien E. coli vermehrt intra- als auch extrazellulär von CD14++CD16neg.-Monozyten gebildet.

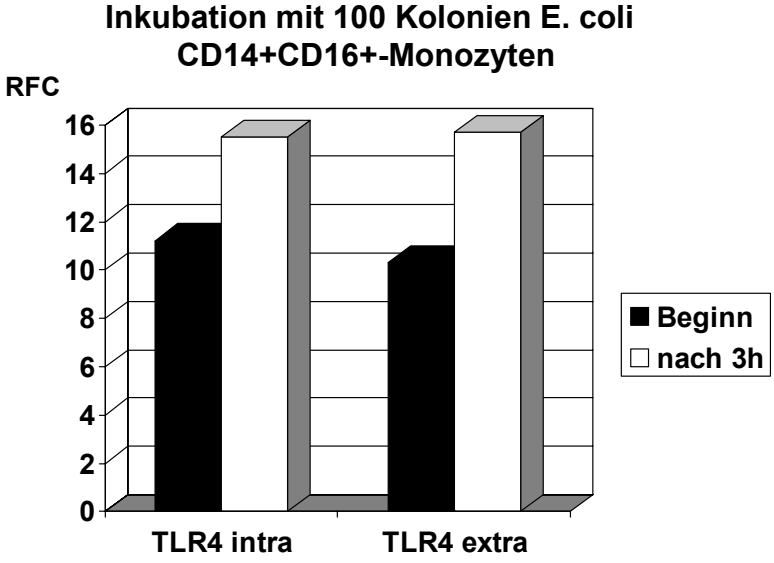


Abb. 59: TLR4 wurde nach Inkubation mit 100 Kolonien E. coli sowohl intra- als auch extrazellulär vermehrt von CD14+CD16+-Monozyten gebildet.

7.10.2 10.000 Kolonien E. Coli

In den folgenden Grafiken ist der Expressionsverlauf von TLR2, TLR3 und TLR4 auf unterschiedlichen Monozytensubpopulationen dargestellt. Sowohl intra- als auch extrazelluläre TLR wurden nach Inkubation mit 10.000 Kolonien E. Coli vermehrt exprimiert. Alle erhobenen Mittelwerte sind aus drei Messungen gewonnen worden.

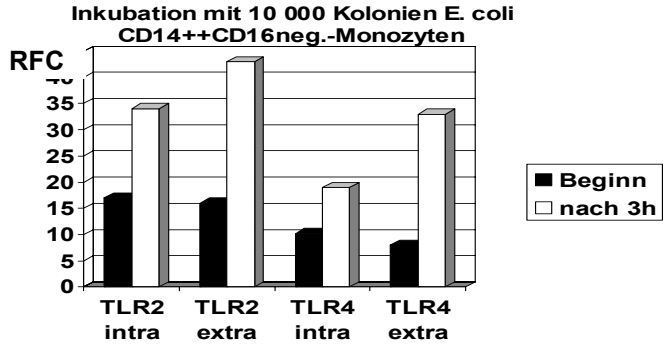


Abb. 60: TLR2 und TLR4 wurden nach Inkubation mit 10 000 Kolonien E. coli sowohl vermehrt intra- als auch extrazellulär von CD14++CD16neg.-Monozyten exprimiert.

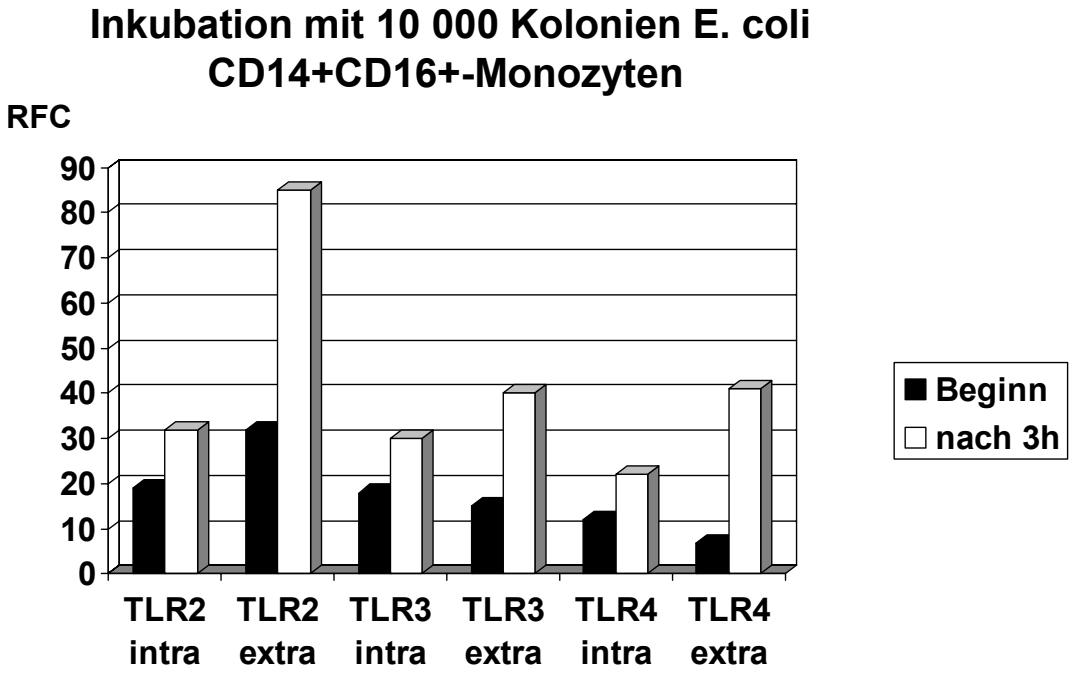


Abb. 61: TLR2, TLR3 und TLR4 wurden nach Inkubation mit 10 000 Kolonien E. coli sowohl vermehrt intra- als auch extrazellulär von CD14+CD16+-Monozyten exprimiert. Dies ist insofern bemerkenswert, da man TLR3 bisher keine Rolle in der Erkennung dieser Erreger zugeschrieben hatte.

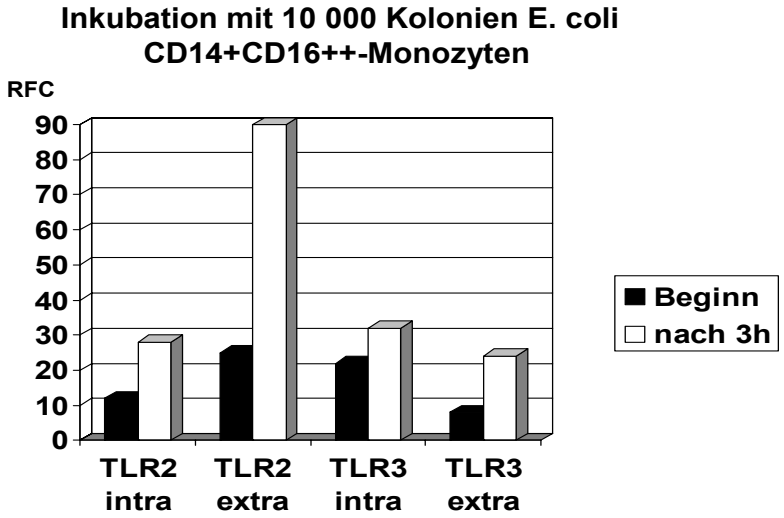


Abb. 62: TLR2 und TLR3 wurden nach Inkubation mit 10 000 Kolonien E. coli vermehrt intra- als auch extrazellulär in/auf CD14+CD16++-Monozyten exprimiert.

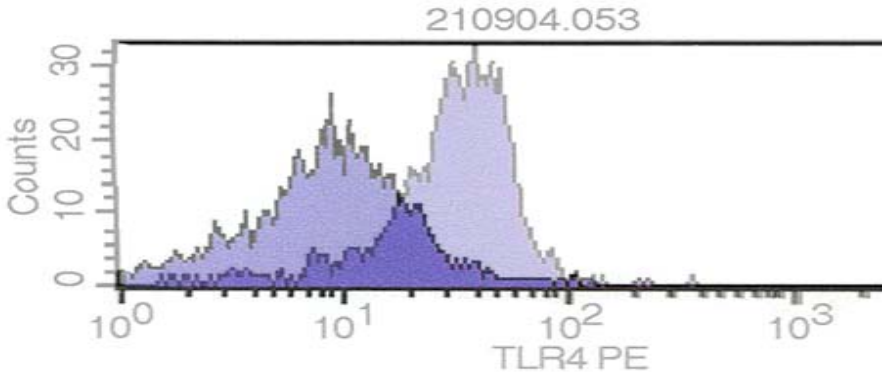


Abb. 63: Diese Abbildung zeigt eine Monozytenmessung im FACS. Die dunklere Kurve links zeigt die Verteilung der Monozyten bei der Anfangsmessung. Die hellere Kurve rechts die Expression, die drei Stunden nach Antigeninkubation gemessen werden konnte.

7.10.3. 100 Kolonien Staphylokokken

In den folgenden Grafiken ist der Expressionsverlauf von TLR2, TLR3 und TLR4 auf unterschiedlichen Monozytensubpopulationen dargestellt. Sowohl intra- als auch extrazelluläre TLR (Ausnahme: TLR2 auf CD14++CD16neg.-Zellen) wurden nach Inkubation mit 100 Kolonien Staphylokokkus aureus vermehrt exprimiert. Alle erhobenen Mittelwerte sind aus drei Messungen gewonnen worden.

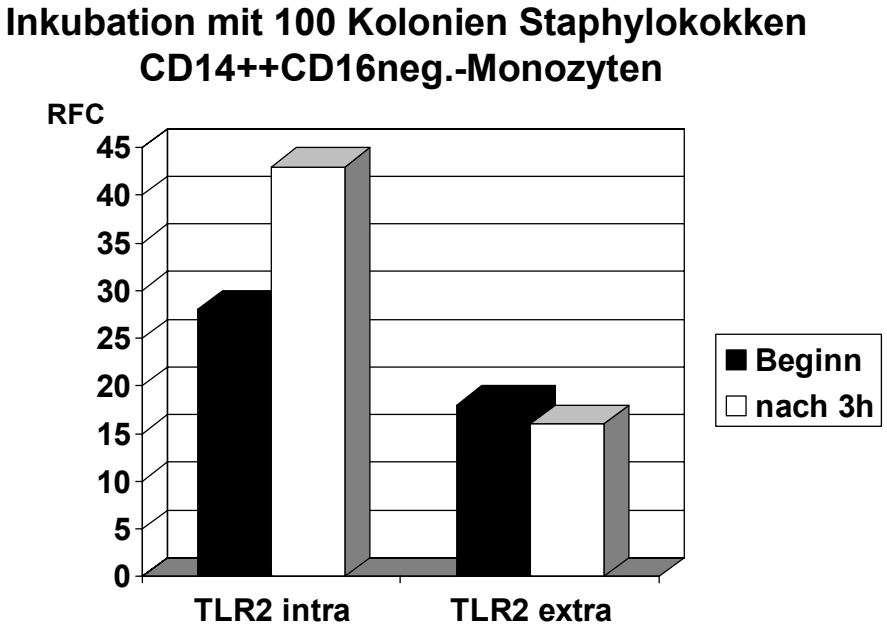


Abb. 64: Nach Inkubation mit 100 Kolonien Staph. aureus bildeten CD14++CD16neg.-Monozyten vermehrt intrazelluläre TLR2. Die Expression des extrazellulären Rezeptors ging dagegen zurück. Dies dürfte am ehesten durch eine Umverteilung extrazellulärer Rezeptoren bedingt sein, beispielsweise durch Inkorporation von Erregern, die intrazellulär abgebaut werden.

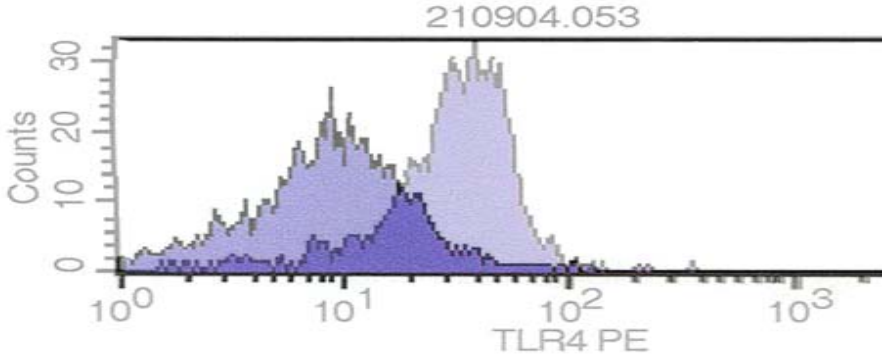


Abb. 65: Diese Abbildung zeigt die grafische Darstellung einer FACS-Messung zur Expression von Monozyten. Die dunklere Kurve zeigt dabei die Ausgangsmessung. Die höhere und hellere Kurve zeigt die Anzahl der gemessenen Monozyten nach 3 Stunden Inkubation mit 100 Kolonien Staph. aureus.

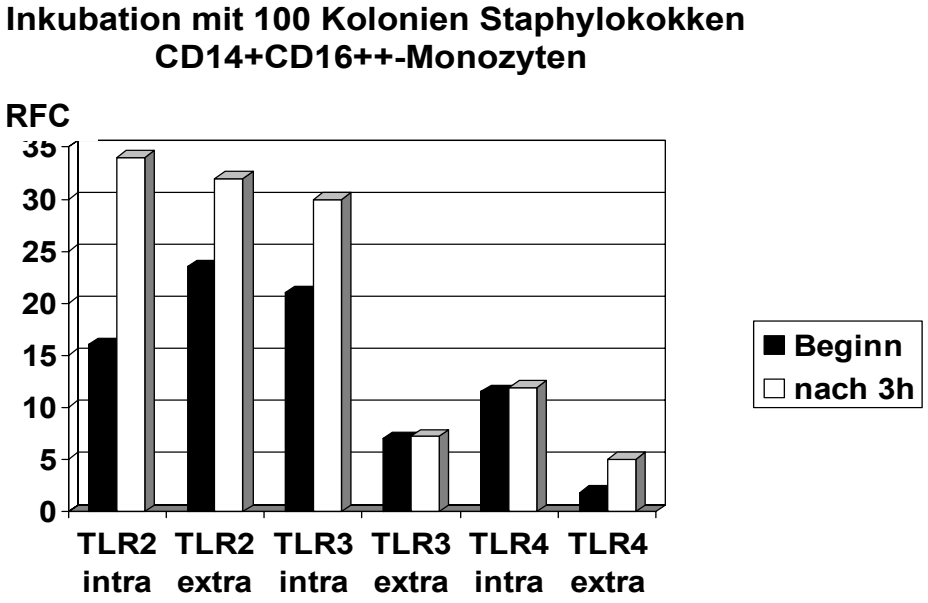


Abb. 66: TLR2, TLR3 und TLR4 wurden nach Inkubation mit 100 Kolonien Staph. aureus sowohl vermehrt intra- als auch extrazellulär von CD14+CD16++-Monozyten gebildet.

7.10.4 10.000 Kolonien Staphylokokken

In den folgenden Grafiken ist der Expressionsverlauf von TLR2, TLR3 und TLR4 auf unterschiedlichen Monozytensubpopulationen dargestellt. Sowohl intra- als auch extrazelluläre TLR (Ausnahme TLR3 CD14+CD16+) wurden nach Inkubation mit 10.000 Kolonien Staph. aureus vermehrt exprimiert. Alle erhobenen Mittelwerte sind aus drei Messungen gewonnen worden.

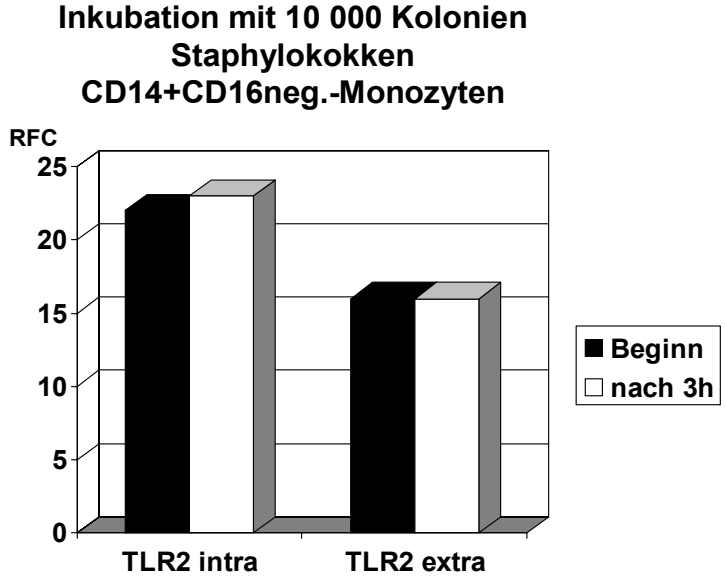


Abb. 67: TLR2 wurde nach Inkubation mit 10 000 Kolonien Staph. aureus vermehrt intra- als auch extrazellulär von CD14++CD16neg.-Monozyten exprimiert.

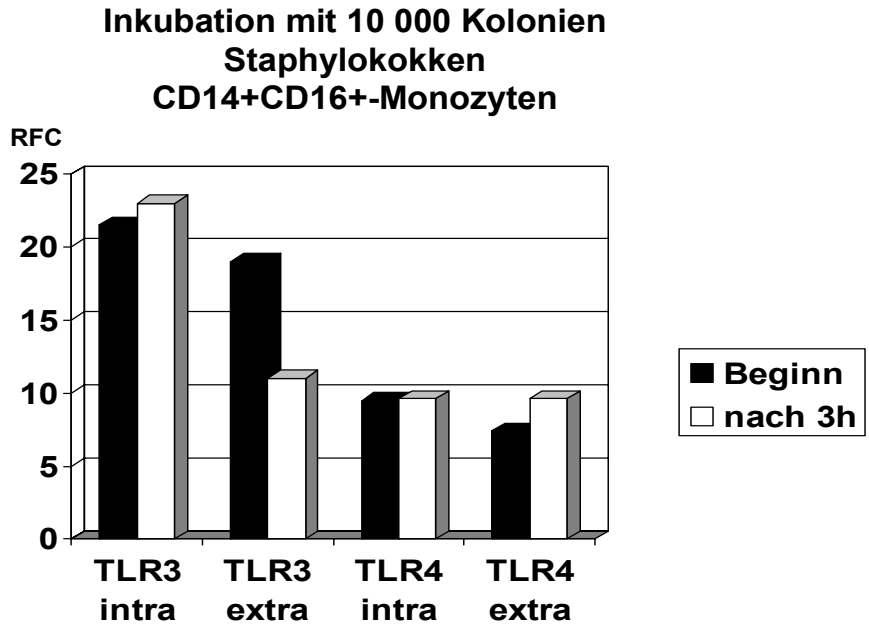


Abb. 68: TLR3 wurde nach Inkubation mit 10.000 Kolonien Staphylokokken intrazellulär stärker exprimiert. Die Expression extrazellulärer Rezeptorkomponenten nahm dagegen ab. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass TLR3 in der Abwehr gegen Staph. aureus eine Rolle spielt und die internalisierten Rezeptoren intrazelluläre Antigenfragmente/Liganden prozessieren.

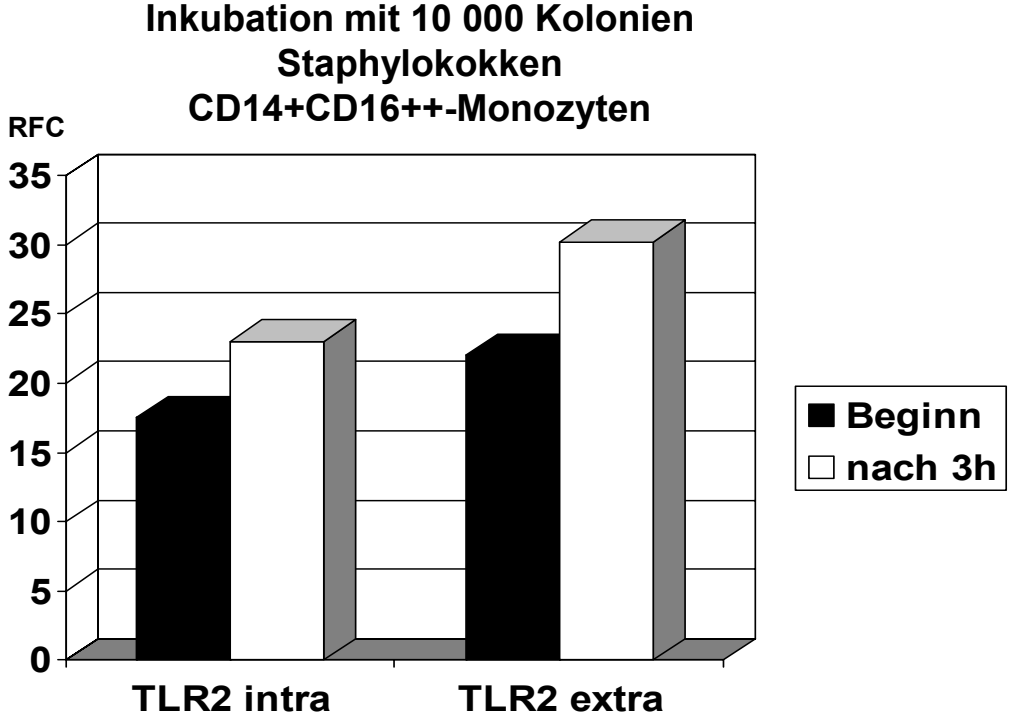


Abb. 69: TLR2 wurde nach Inkubation mit 10 000 Kolonien Staph. aureus sowohl vermehrt intra- als auch extrazellulär von CD14+CD16++-Monozyten exprimiert.

7.10.5 Veränderungen gegenüber der Negativkontrolle

In den folgenden Grafiken ist das Verhalten der TLR-Expression und der Anzahl an CD14-Zellen im Verhältnis zu den Veränderungen der unbeimpften Vergleichsgruppe aufgetragen. Dargestellt sind die prozentualen Abweichungen der antigenbeimpften Proben im Vergleich zur unbeimpften Kontrolle. Alle erhobenen Mittelwerte sind aus drei Messungen gewonnen worden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass TLR nach Antigenexposition vermehrt gebildet wurden. Dies bestätigte unsere Beobachtungen aus dem Patientengruppenvergleich (Kapitel 7.1), bei dem eine Aktivierung der TLR auf CD14+CD16+-Zellen zu einer mikroinflammatorischen Reaktion führt.

7.10.5.1 TLR2 CD14+CD16++

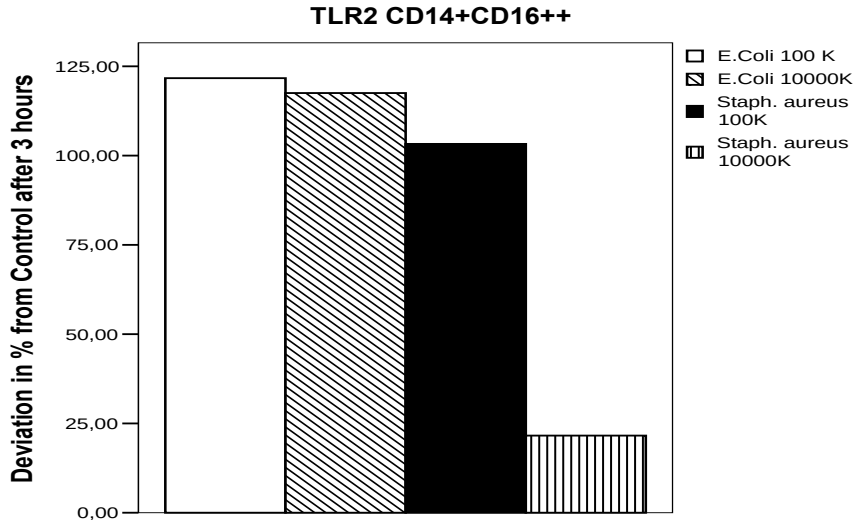


Abb. 70: TLR2 wurde nach antimikrobieller Inkubation verstärkt von CD14+CD16++-Zellen exprimiert.

7.10.5.2 TLR3 extrazellulär CD14+CD16+

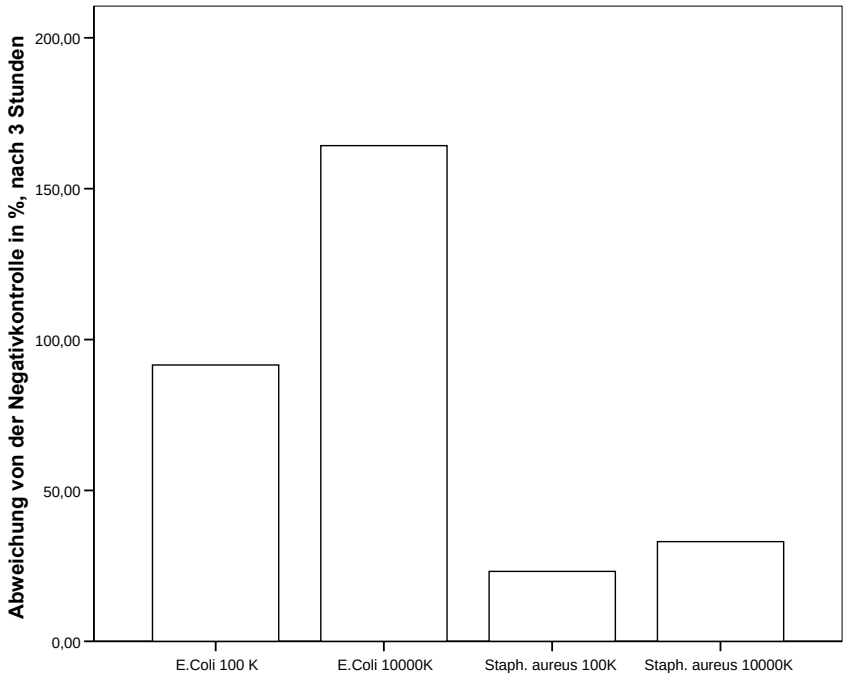


Abb. 71: TLR3 wurde nach antimikrobieller Inkubation von CD14+CD16+-Zellen vermehrt exprimiert. Bisher ging man davon aus, dass TLR3 nur RNS-Viren als Liganden erkennt. Die erhöhte extra- und intrazelluläre Expression nach E.coli Inkubation legen jedoch eine Beteiligung dieses Rezeptors an der Erkennung und Prozessierung von E. coli nahe.

7.10.5.3 TLR3 intrazellulär CD14+CD16+

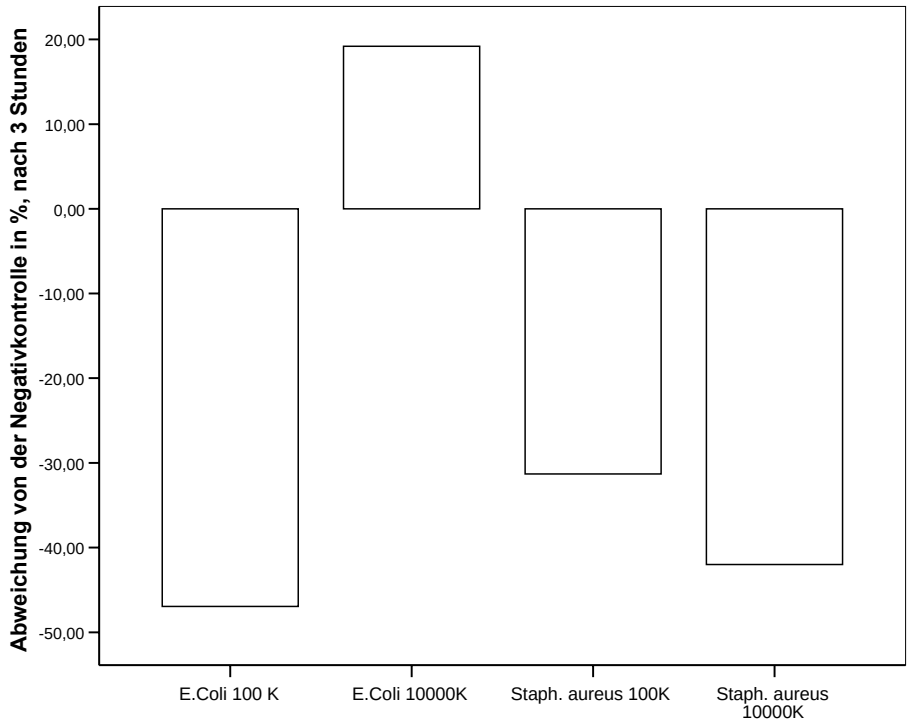


Abb. 72: TLR3 wurde nur nach Inkubation mit 10 000 Kolonien E. coli vermehrt in CD14+CD16+-Zellen gebildet. Bei der Immunantwort auf diese Antigendosis sind somit sowohl intra- als auch extrazelulläre TLR3 eingebunden.

7.10.5.4 TLR4 intrazellulär CD14+CD16+

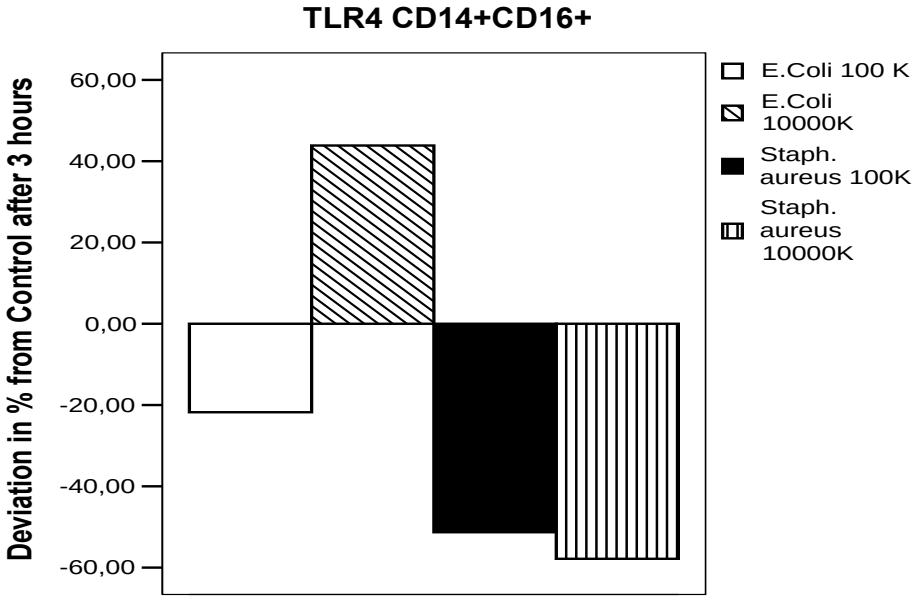


Abb. 73: Intrazelluläres TLR4 wurde von CD14+CD16+-Zellen nur nach Beimpfen mit 10.000 Kolonien E. coli vermehrt exprimiert. CD14+CD16++-Zellen zeigten analoge Befunde (s.u.). Diese Auswertungen zeigen, dass TLR4 in der Abwehr gegen E. coli eine Rolle spielen. Nach einer bestimmten Antigenschwellendosis, die zwischen 100 und 10.000 Kolonien liegt, werden die TLR4 vermehrt exprimiert.

7.10.5.5 TLR4 intrazellulär CD14+CD16++

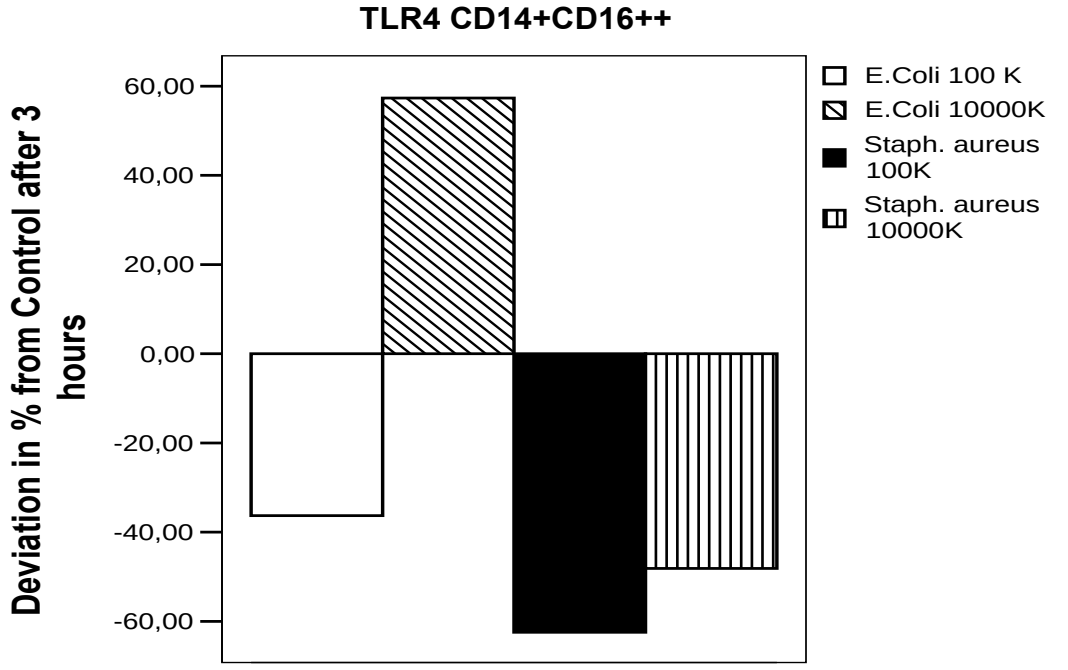


Abb. 74: Nur das Beimpfen mit 10.000 Kolonien E. coli vermehrt die intrazelluläre Expression von TLR4 auf CD14+CD16++-Monozyten.

7.10.5.6 Totale CD14 Expression

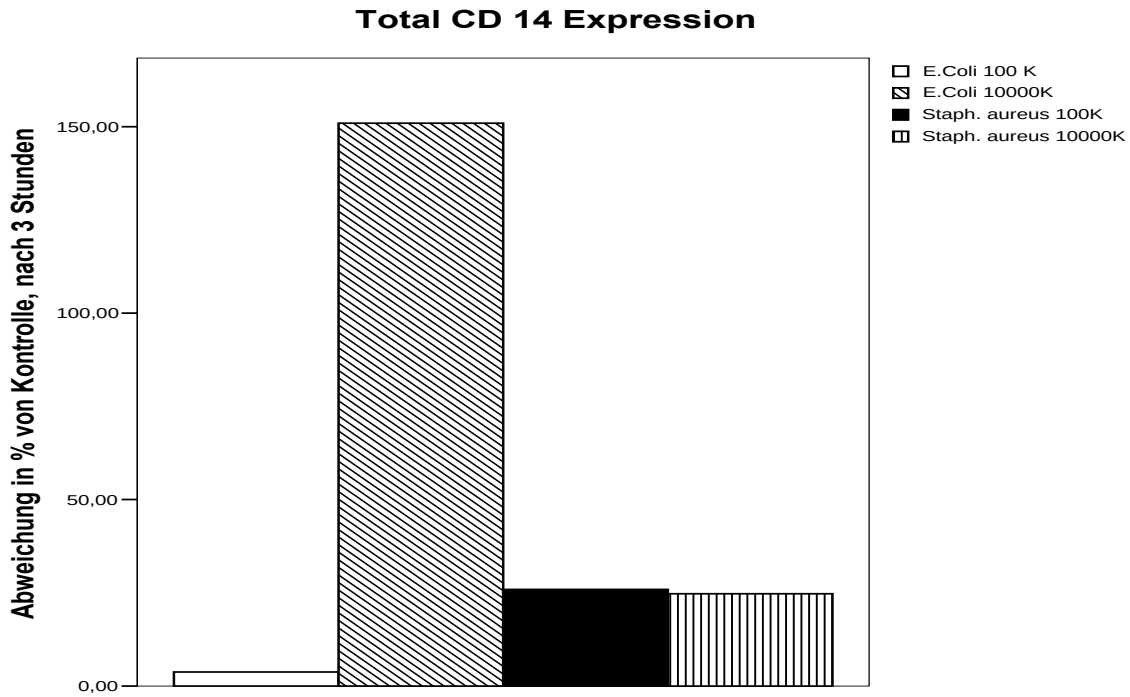


Abb. 75: Nach bakterieller Exposition waren vermehrt CD14 Monozyten nachzuweisen. Später erhöhte sich der Anteil an CD14+CD16+-Zellen.

7.11 Immunzytologische Verlaufsbeobachtungen definierter Krankheitsbilder

Die folgenden Abbildungen zeigen den Expressionsverlauf der untersuchten Membranantigene im Blut von zwei Patienten. Die Grafiken zu Patient 1 (Alter: 67 J.) zeigen die Rezeptorexpressionen im Verlauf einer Nierentransplantatabstoßung. Der Verlauf von Patientin 2 (56 J.) zeigt vergleichend das Verhalten der Rezeptoren bei interstitieller Nephritis. Anhand dieser Verlaufsparameter können potentielle Gefahren für die Patienten frühzeitiger als mit herkömmlichen humoralen Markern (z.B. CRP) erkannt werden.

Patient 1:

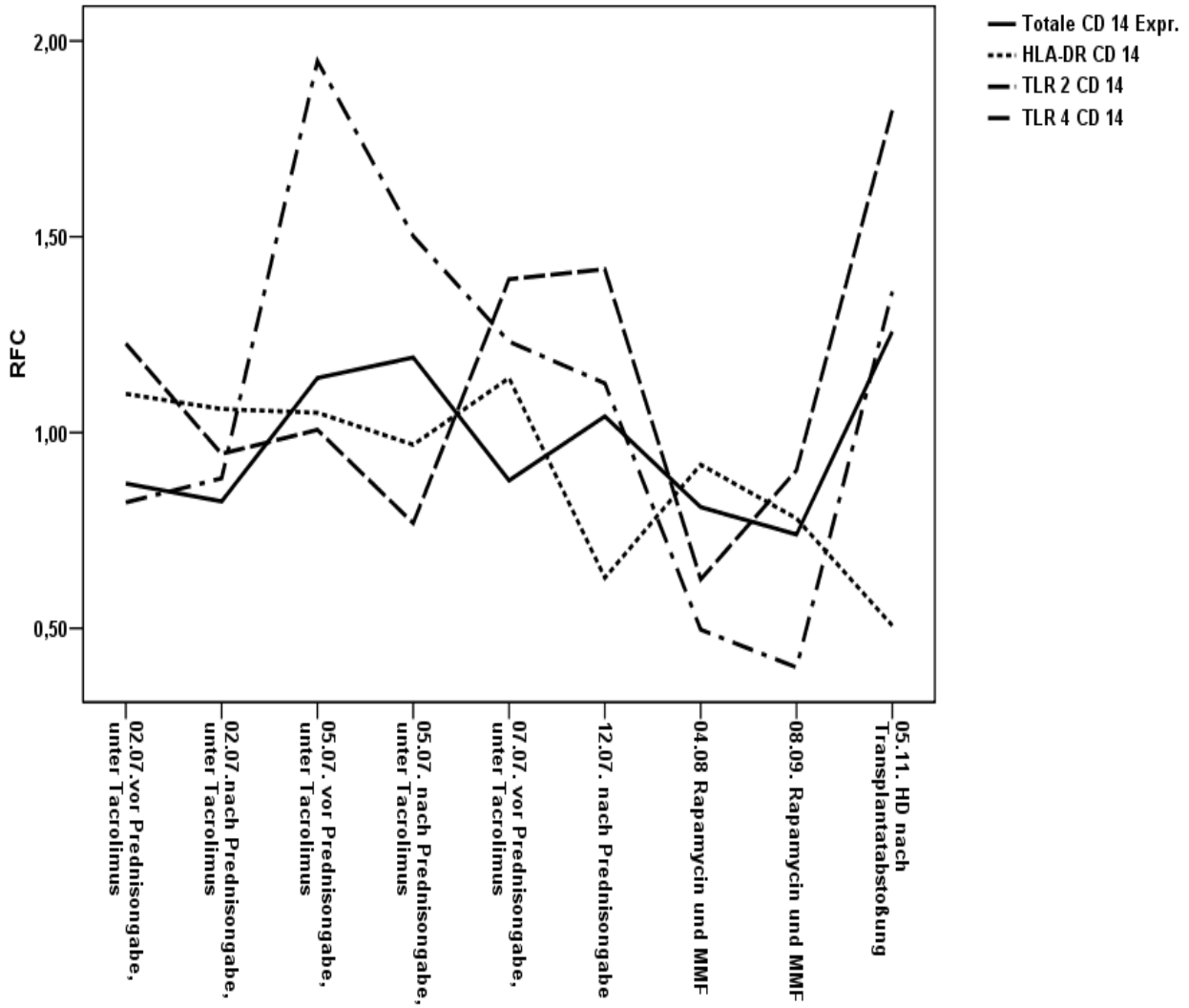


Abb. 76: HLA-DR-, TLR2- und TLR4-Expressionsverlauf der CD14++CD16neg.-Monozyten sowie die Gesamtexpression von CD14-Zellen.

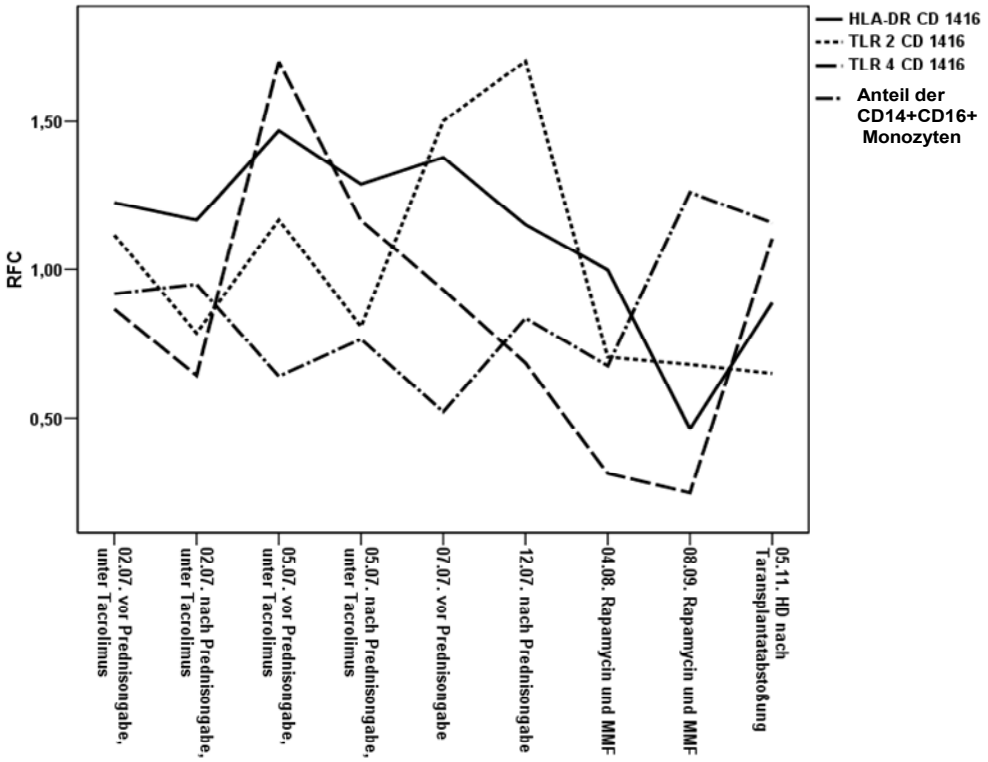


Abb. 77: Verlauf der HLA-DR-, TLR2- und TLR4-Expression auf CD14+CD16+-Monozyten und Anteil der CD14+CD16+-Zellen.

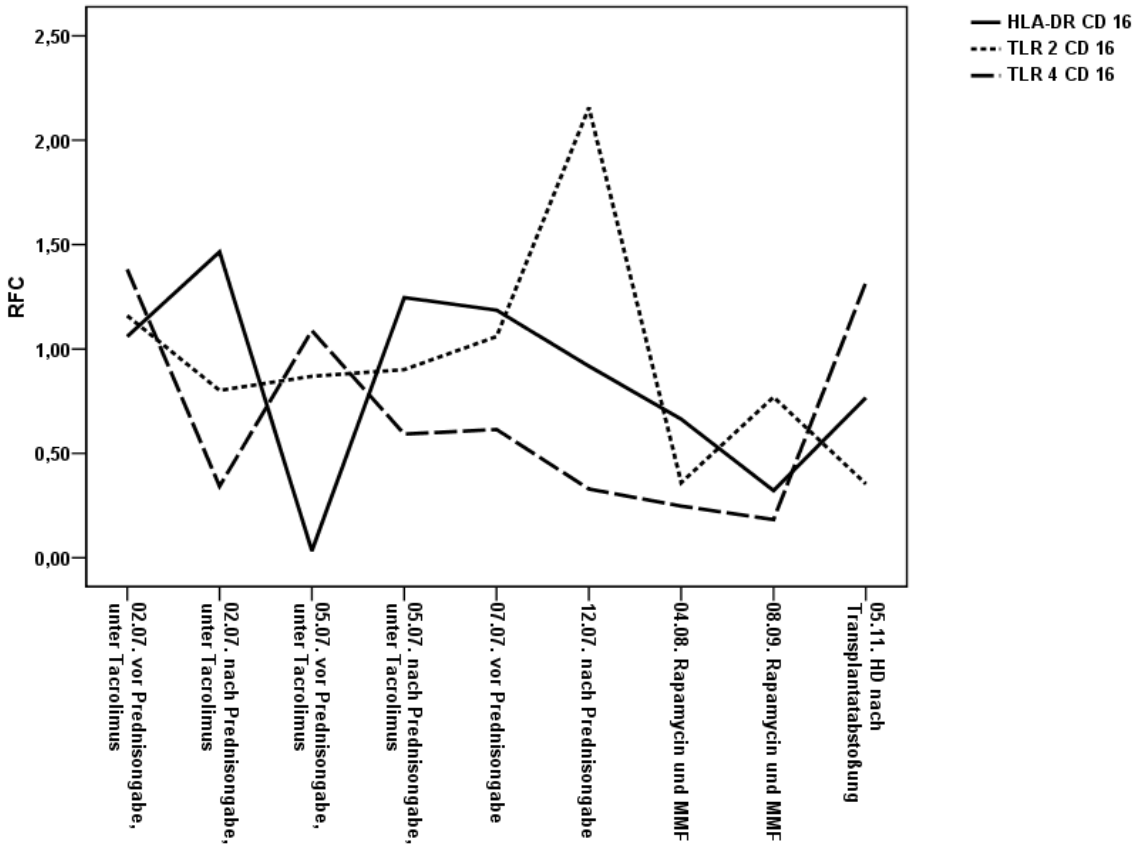


Abb. 78: Verlauf der HLA-DR-, TLR2- und TLR4-Expression auf CD14+CD16++-Monozyten

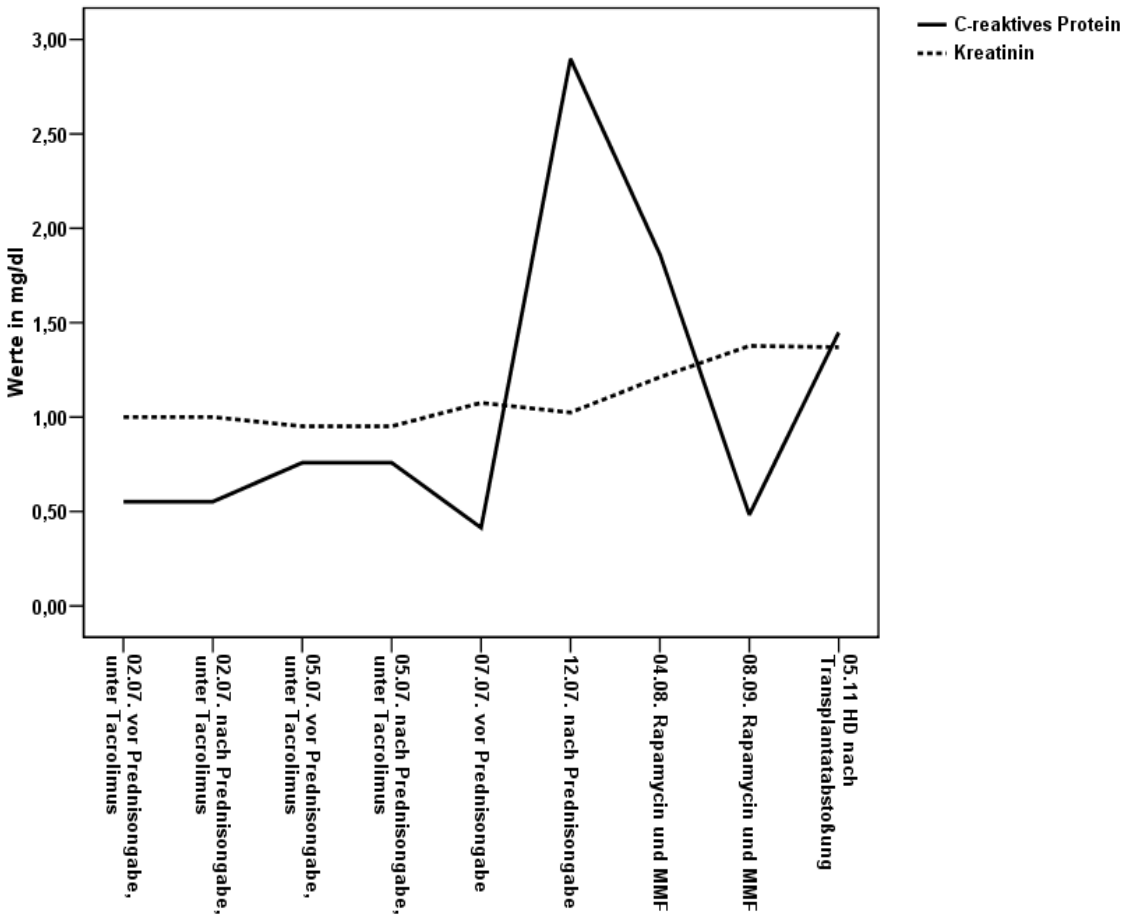


Abb. 79: Verlauf der humoralen Vergleichparameter CRP und Kreatinin.

Glukokortikoide führten zu einer kurzfristigen Abnahme der TLR2-Expression. Bis zum nächsten Patiententermin hatten sich die TLR2 wieder stabilisiert. Diese Erholung der TLR2-Expression blieb erst, kurz bevor der Patient das Transplantat abgestoßen hat, aus. Durch diese Expressionsverminderung sollte am ehesten eine körpereigene Immuntoleranz initiiert werden und so das Transplantat geschützt werden. TLR4 und HLA-DR verhielten sich ähnlich, zeigten aber eine noch frühzeitigere Reaktion als TLR2.

Patientin 2:

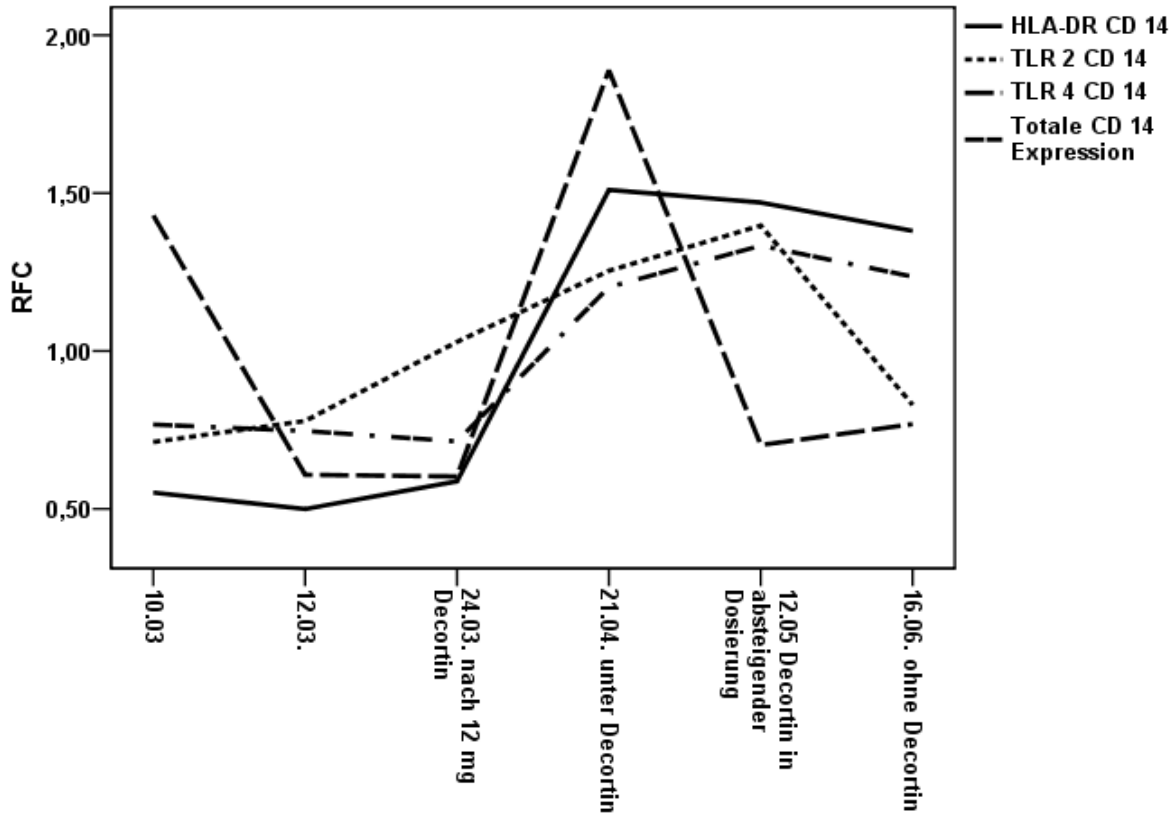


Abb. 80: Verlauf der HLA-DR-, TLR2- und TLR4-Expression auf CD14++CD16neg.-Monozyten sowie die Gesamtexpression von CD14-Zellen.

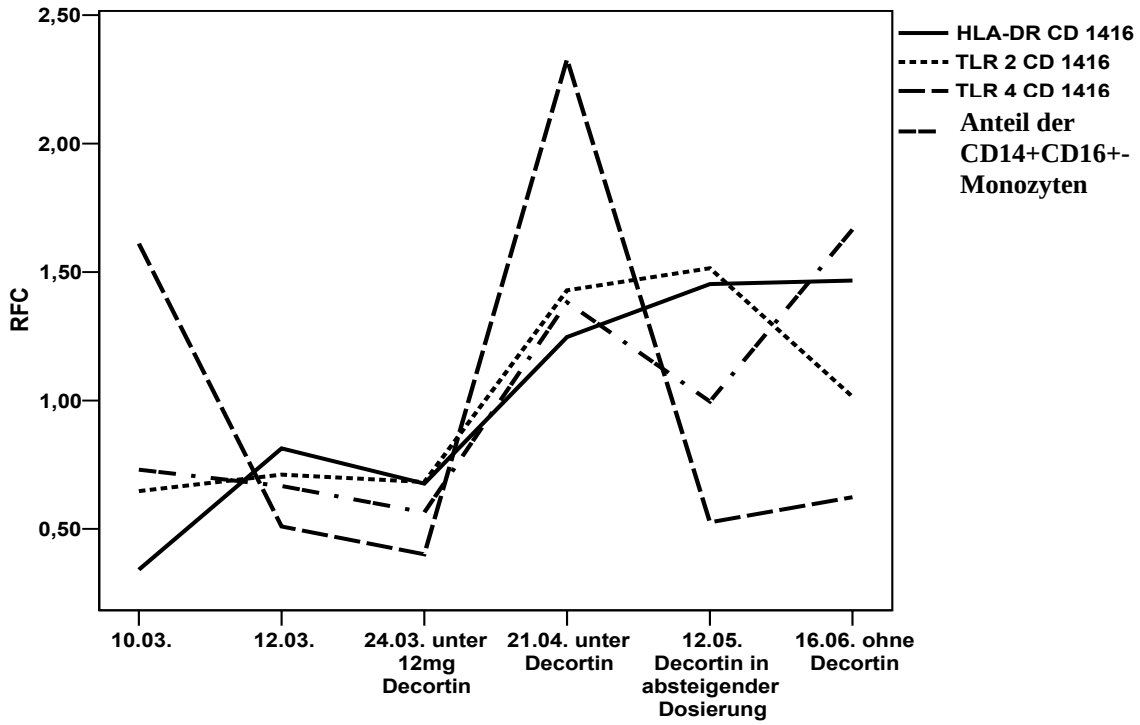


Abb. 81: Verlauf der HLA-DR-, TLR2- und TLR4-Expression auf CD14+CD16+-Monozyten. Des Weiteren ist der Anteil der CD14+CD16+-Zellen gezeigt.

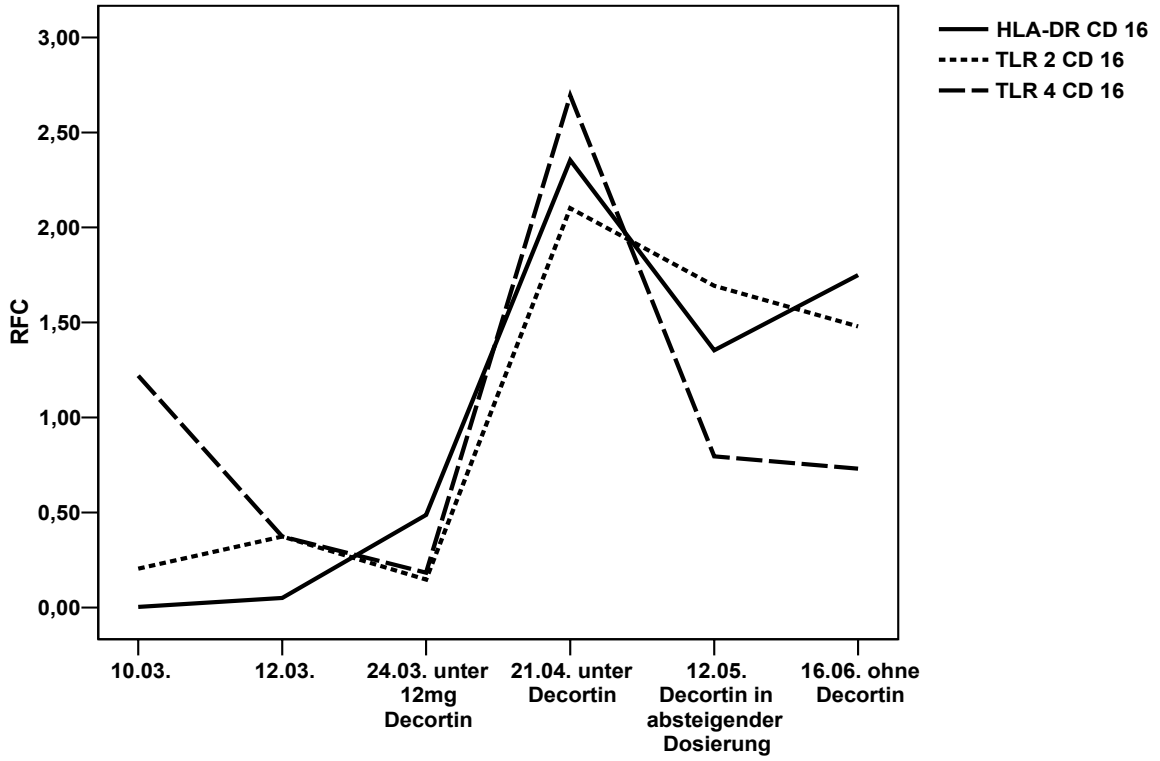


Abb. 82: Verlauf der HLA-DR-, TLR2- und TLR4-Expression auf CD14+CD16++-Monozyten.

Die interstitielle Nephritis führte bei der Patientin zu einer Erhöhung der CD14+CD16+-Zellen und der TLR2-Expression auf allen Monozyten. Diese Beobachtungen bestätigen die Annahme, dass im Rahmen einer klinisch gesicherten Entzündungsreaktion die CD14+CD16+-Monozyten vermehrt gebildet werden und die TLR-Expression ebenfalls steigt um eine Immunantwort zu ermöglichen.

7.12 Vergleich von HLA-DR sowie TLR vor und nach einer Dialysesitzung

7.12.1 Anteil der CD14+CD16+-Monozyten

Tab. 47: Anteil der CD14+CD16+-Monozyten an der Gesamtmonozytenpopulation. Hierbei ergab sich im Wilcoxon-Test ein zweiseitig signifikanter Unterschied von **p=0,043**. MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung. Max/Min=gemessene Maximal- bzw. Mindestwerte

Anteil der CD14+CD16+ Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Vor HD (5)	18,29	19,94	5,67	10,64	25,67	**0,043**
Nach HD (5)	13,73	14,31	4,22	7,46	19,17	

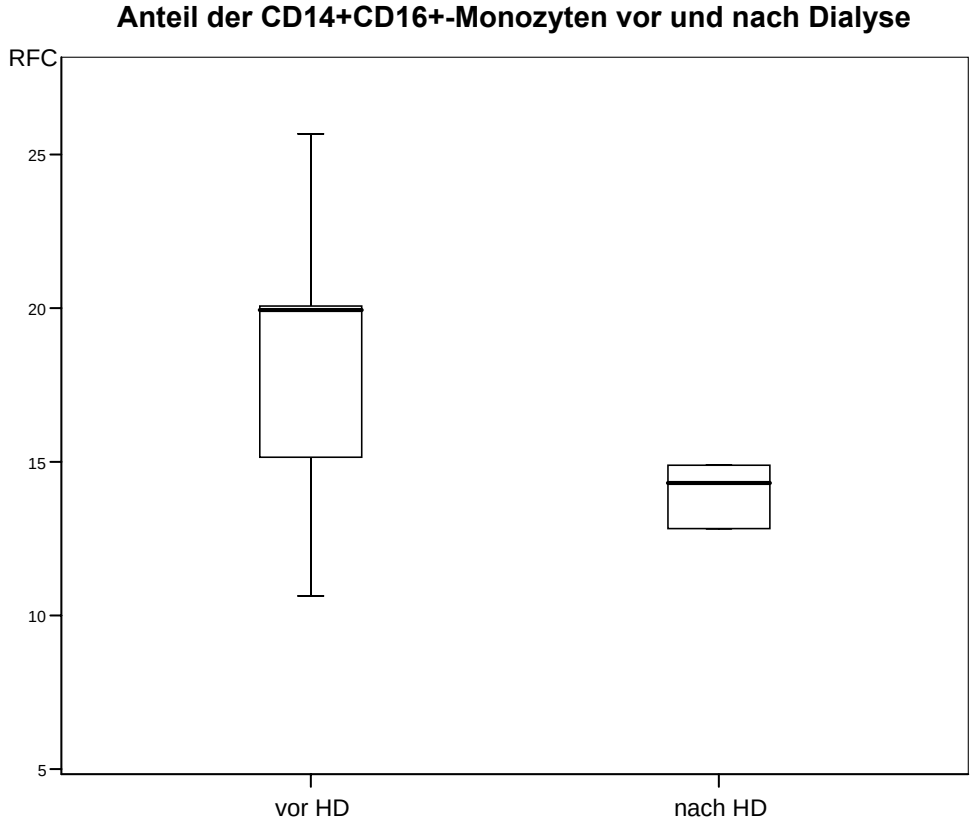


Abb. 83: Boxplotdarstellung der Messergebnisse (Mediane) aus Tabelle 47.

7.12.2 TLR4 extrazellulär CD14+CD16+

Tab. 48: Ergebnisse der Messungen extrazellulärer TLR4 auf CD14+CD16+-Monozyten.
MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung. Max/Min=gemessene Maximal- bzw. Mindestwerte

TLR4 extrazellulär CD14+CD16+ Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max
Vor HD (5)	28,84	16,85	26,93	12,02	76,35
Nach HD (5)	47,2	19,11	57,52	9,65	147,22

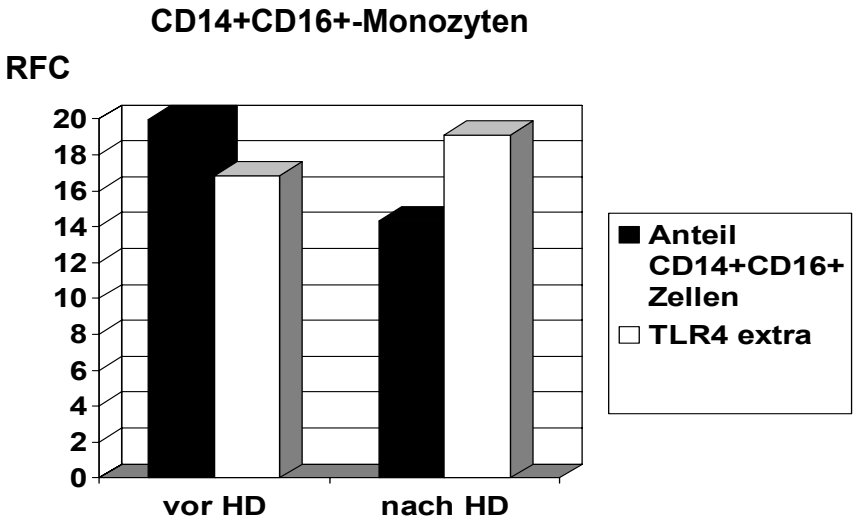


Abb. 84: Entwicklung der extrazellulären TLR4-Expression auf CD14+CD16+-Zellen und des Anteils der CD14+CD16+ Monozyten vor und nach einer Dialysebehandlung. TLR4 konnte nach der Dialyse verstärkt auf CD14+CD16+-Monozyten gemessen werden. Der Anteil dieser Zellen an der Monozytengesamtpopulation nahm jedoch ab, so dass weniger dieser Zellen mehr TLR4 exprimierten.

7.12.3 TLR2 extrazellulär CD14+CD16+

Tab. 49: Ergebnisse der Messungen extrazellulärer TLR2 auf CD14+CD16+-Monozyten.
MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung. Max/Min=gemessene Maximal- bzw. Mindestwerte

TLR2 extrazellulär CD14+CD16+ Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max
Vor HD (5)	119,24	138,24	39,12	53,76	147,22
Nach HD (5)	99,65	78,44	41,78	67,93	170,01

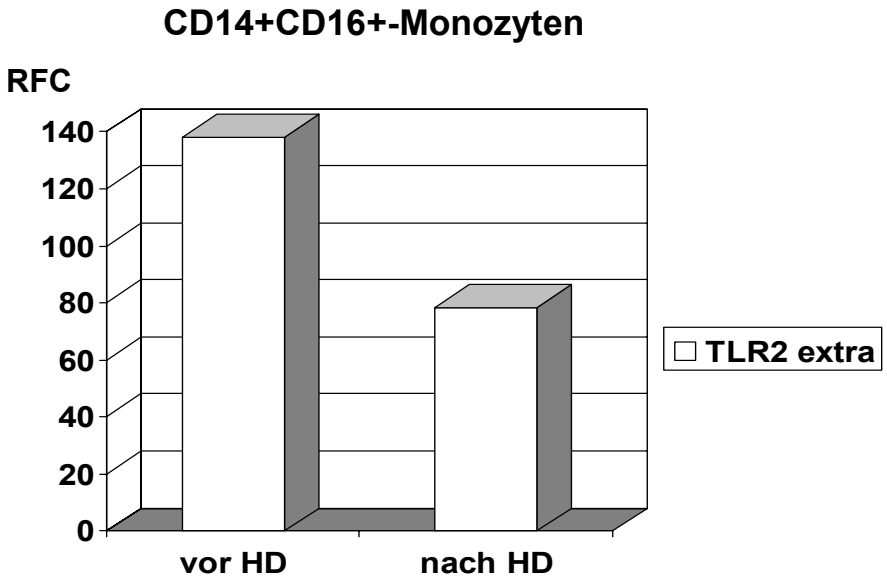


Abb. 85: Verlauf der Rezeptorexpression von TLR2 auf CD14+CD16+-Monozyten. Dargestellt sind jeweils die Mediane, gemessen in RFC (Relative Fluoresceine Counts). Extrazelluläre TLR2 wurden auf dieser Monozytensubpopulation nach der Dialyse weniger-, TLR4 dagegen vermehrt exprimiert.

8. Besprechung der Ergebnisse

Die momentan verfügbare **Sekundärliteratur** bezüglich Monozyten und deren **TLR-Expression beim Menschen** ist **sehr spärlich**. Der größte Teil der Literatur bezieht sich auf Laborversuche mit Nagetieren oder Zellkulturen. Eine verlässliche Übertragung der Ergebnisse auf menschliche TLR ist nicht möglich. Des Weiteren beziehen sich andere Forschergruppen meist nur auf eine gemeinsame Gruppe von Monozyten, **unterscheiden aber nicht** hinsichtlich der **Subpopulationen**.
Unsere vorliegenden Versuche haben ergeben, dass eine solche Unterscheidung substanziell ist, da die verschiedenen Monozytensubpopulationen nicht nur immunphänotypisch, sondern auch ultrastrukturell und funktionell unterschiedlich sind. Subpopulationen peripherer Blutmonozyten wurden nur von ganz wenigen Gruppen näher analysiert (Ziegler-Heitbrock *et al.*; Nockher und Scherberich).
Besonderheiten der von uns näher beschriebenen Subsets peripherer Blutmonozyten sind grafisch in Abb. 8 dargestellt bzw. im ersten Kapitel erläutert.
Jeweils einzeln für das jeweilige Subset wurden in dieser Arbeit die Phänotypen der Epitope für die Moleküle CD14, CD16, HLA-DR, TLR2 und TLR4 bestimmt.

In unseren Augen ist die Analyse zellulärer Vorgänge zur Erklärung „inflammatorischer Krankheitsprozesse“ hilfreicher als die Beschreibung humoraler Faktoren wie CRP, Long Pentraxin, SAA, Fibrinogen etc. Diese Mediatoren werden erst nach vorheriger Aktivierung immunkompetenter Zellen wie Blutmonozyten, Gewebsmakrophagen etc. generiert (z.B. Hochregulation der CRP-Biosynthese in der Leber); sie liegen damit in der Entzündungskaskade wesentlich weiter „hinten“.

8.1 Verhalten inflammatorischer Monozyten und ihrer Oberflächenrezeptoren bei verschiedenen Krankheitsgruppen

In dieser Studie wurden die verschiedenen Patientengruppen (chronisch Nierenkranke, Nierentransplantierte und Hämodialysepatienten) mit einer gesunden Vergleichsgruppe bezüglich der Monozytenexpression verglichen.
Chronisch Niereninsuffiziente wiesen im Vergleich zu Gesunden auf CD14++CD16neg.-Monozyten die **geringsten** Expressionen an **HLA-DR**, einer wichtigen regulatorischen Erkennungsstruktur antigenpräsentierender Zellen, auf, gefolgt von Nierentransplantierten und Dialysepatienten. Bezüglich der HLA-DR-Expression auf CD14 Zellen unterschieden sich Nierenkranke signifikant von Gesunden ($p = 0,005$). Beim Vergleich auf CD14+CD16+ und CD14+CD16++-Monozyten zeigte sich ein ähnliches Bild, allerdings ließ sich hier kein signifikanter Unterschied feststellen. Chronische Niereninsuffizienz ist demnach mit einer wesentlichen Beeinträchtigung der Antigenprozessierung und -präsentation assoziiert.
Die **Gesamtexpression von CD14** (alle Monozytensubsets) verhielt sich ähnlich zur Expression des **HLA-DR** auf dieser Zellpopulation. Dabei hatten Nierentransplantierte signifikant weniger CD14 Zellen als Gesunde (453,16 RFC vs. 371,81 RFC; $p = 0,0028$) und Dialysepatienten (371,81 RFC vs. 433,23 RFC; $p = 0,0021$). Die CD14 Zellen sind junge Monozyten und besitzen im Vergleich zu reiferen CD14+CD16+-Monozyten eine nur eingeschränkte Phagozytosekapazität. Bei den untersuchten Patientengruppen spielen die jungen, weniger „potenten“ Monozyten anscheinend eine untergeordnete Rolle. Monozyten mit höherer phagozytotischer Kompetenz (z.B. CD14+CD16+) scheinen dagegen keine Einschränkungen in der Präsentationsfähigkeit von prozessierten Antigenfragmenten zu haben. Die hohe Phagozytosekapazität der CD14+CD16+-Zellen findet durch deren geringeren prozentualen Anteil an der Gesamtmonozytenpopulation (8 % aller CD14-positiven Monozyten bei Gesunden) hier nicht genügend Beachtung. Dies gilt insbesondere unter krankhaften Bedingungen: Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, entzündlichen Systemerkrankungen und metabolischen Störungen (z.B. Hyperlipidämie) weisen in aller

Regel deutlich erhöhte CD14+CD16+-Blutmonozyten auf. Der Anteil dieser proinflammatorischen Subpopulation (CD14+CD16+ und CD14+CD16++) kann in bestimmten Fällen bis zu 30 % und mehr der gesamten zirkulierenden Blutmonozyten betragen [Nockher 1998; Scherberich 1999]. Hintergründe für die erhöhte Zahl dieser Zellen sind mutmaßlich akkumulierte Mediatoren im Blut dieser Patienten wie z.B. reaktive Sauerstoffradikale, Urämietoxine, erhöhter Einfluss von LPS durch enterale Translokation ins Blut (Herzinsuffizienz, Dialysepatienten), Schaumzellbildung durch Endozytose reaktiver Lipoproteine etc.

Gesunde Probanden hatten im Vergleich mit den von uns untersuchten Krankheitsgruppen den **niedrigsten Anteil an CD14+CD16+-Monozyten** im Blut. Von den Hämodialysepatienten unterschieden sie sich dabei am stärksten (6,55 RFC vs. 14,69 RFC, p = 0,0001). CD14+CD16+-Monozyten sind potente Phagozyten, deren Anzahl im peripheren Blut Gesunder niedriger war als in den untersuchten Krankheitsgruppen. Dieser Rückgang findet am ehesten zu Gunsten der CD14++CD16neg.-Vorläuferzellen statt, die im Blut von gesunden Probanden vermehrt nachweisbar waren.

Auf CD14++CD16neg.-Monozyten konnten keine Unterschiede in der TLR2- und **TLR4-**Expression nachgewiesen werden. Anders verhielten sich diese TLR auf den phagozytosestarken **CD14+CD16+- und CD14+CD16++-Monozyten**. Bei **HD-Patienten** zeigte sich eine **erhöhte** Expression des Toll-Like-Rezeptors 4 im Vergleich zu Gesunden (p = 0,004 auf CD14+CD16+ bzw. p = 0,008 auf CD14+CD16++).

Diese Ergebnisse widersprechen den Beobachtungen, die Kuroki *et al.* gemacht haben. Sie beschreiben eine geringere TLR4-Expression der HD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings wurde von dieser Forschergruppe keine Unterteilung in Monozyten-Untergruppen vorgenommen [Kuroki 2007]. Als Ursache nehmen die Autoren eine chronische Stimulation dieses Rezeptors durch wiederholte Exposition mit „Materialien“ im „Umfeld“ der Nierenersatztherapie an (v.a. Endotoxin aus Dialysat). Allerdings ist allein durch Gebrauch ultrareinen Dialysats (mit nur sehr geringer LPS-Exposition der Patienten) eine dadurch induzierte „Beeinträchtigung“ der Synthese oder der Halbwertszeit des TLR4-Moleküls nicht unbedingt schlüssig. Nach unseren Daten, mit genauer Betrachtung der monozytären Subsets, zeigte sich vielmehr eine chronische und bleibend stabile „Aktivierung“ des TLR-Systems aufgrund der stets nachweisbaren sog. „Mikroinflammation“. Diese Mikroinflammation drückte sich z.B. auch in der in aller Regel erhöhten Serumkonzentration von CRP und anderen humoralen Inflammationsmarkern (Long Pentraxin 3, SAA) aus [Zimmermann 1999; Ridker 2000 und 2002]. Ungeachtet chronischer Einflüsse möglicher TLR-stimulierender Faktoren (chron. Niereninsuffizienz, Dialysepatienten) scheint nach unseren Daten die TLR-Präsenz (Biosynthese, Fähigkeit der Hochregulierung) nicht beeinträchtigt zu sein. Andererseits wäre die erhöhte Serumkonzentration von CRP und anderen humoralen Inflammationsmarkern bei diesen Kranken ohne die Hochregulation von TLR4 (LPS-Rezeptor) wenig verständlich. Erst bei hoher Komorbiditätsrate wäre eine relative Immundefizienz mit geringer TLR-Expression denkbar, wie wir sie auch in der Gruppe der Höchstrisikopatienten (mit Kunstgefäßen) gefunden haben.

Bei **gesunden** Probanden werden die **TLR** nach durchstandener Infektion wieder **herunterreguliert**. Dialysepatienten zeigen dagegen einen instabileren Zustand, der nicht dieser Regulation folgen muss: Sie sind in der Regel anfälliger für Infektionen und sind über die Dialysemembran einer höheren wiederholten, chronischen Exposition gegenüber Endotoxinen (LPS) ausgesetzt [Nockher und Scherberich 1995]. Durch den chronischen Kontakt von Blutzellen mit der Dialysemembran verändert sich die TLR-Expression. Bei Hämodialysepatienten liegen offensichtlich im Blut Liganden vor, die neben der erhöhten CD14+CD16+ Subfraktion im Blut auch die TLR-Expression modulieren (14,69 RFC bei HD-Patienten vs. 7,79 RFC bei chronisch Nierenkranken; p = 0,0062).

Chronisch Niereninsuffiziente exprimierten in unseren Versuchsreihen **geringere** Mengen **TLR4** als HD-Patienten (p = 0,006 auf CD14+CD16+ bzw. p = 0,002 auf CD14+CD16++). Identisch verhielten sich CD14+CD16++-Zellen bei Nierentransplantierten,

die ebenfalls mehr TLR4 aufwiesen als chronisch Nierenkranke (Median: 22,02 RFC vs. 14,66 RFC; p = 0,012).
Ando *et al.* beschrieben eine geringere TLR4-Expression von chronisch Nierenkranken (Prädialyse) im Vergleich zu einer gesunden Vergleichsgruppe (FACS-Analyse). Die LPS-vermittelte Zytokinsekretion der Monozyten war bei diesen Patienten verringert, wohl wegen der geringeren TLR4-Expression [Ando 2006]. Diese Beobachtung konnten wir nicht bestätigen. Nur auf CD14++CD16neg.-Monozyten zeigte sich auch bei uns ein solches Verhältnis; dieses war allerdings nicht signifikant. Werden andere, inflammatorisch potentere Monozytensubpopulationen (CD14+CD16+ und CD14+CD16++) nicht untersucht, wird das Gesamtbild aufgrund ihres geringen Anteils an der Gesamtpopulation verzerrt (Bias). Unsere Daten zeigten, dass auf diesen gereiften und phagozytischen Zellen (teils signifikant) mehr TLR4 exprimiert wurde als in der Vergleichsgruppe. Dies führt nachfolgend zu einer vermehrten Freisetzung von Zytokinen und zur Aktivierung nachfolgender Schritte in der Inflammationskaskade (T- und B-Zellen, Neutrophile etc.). **Chronische Niereninsuffizienz** war im Vergleich zu den anderen untersuchten Krankheitsgruppen (HD-Patienten, Nierentransplantierte) mit einer **verminderten TLR4-Expression** assoziiert. Bei Infektionen werden TLR4 auf Blutzellen induziert. Eine verminderte Expression von TLR4 ist bei chronisch kranken Patienten Ausdruck einer schlechteren Krankheitsprognose [Haruta 2007].

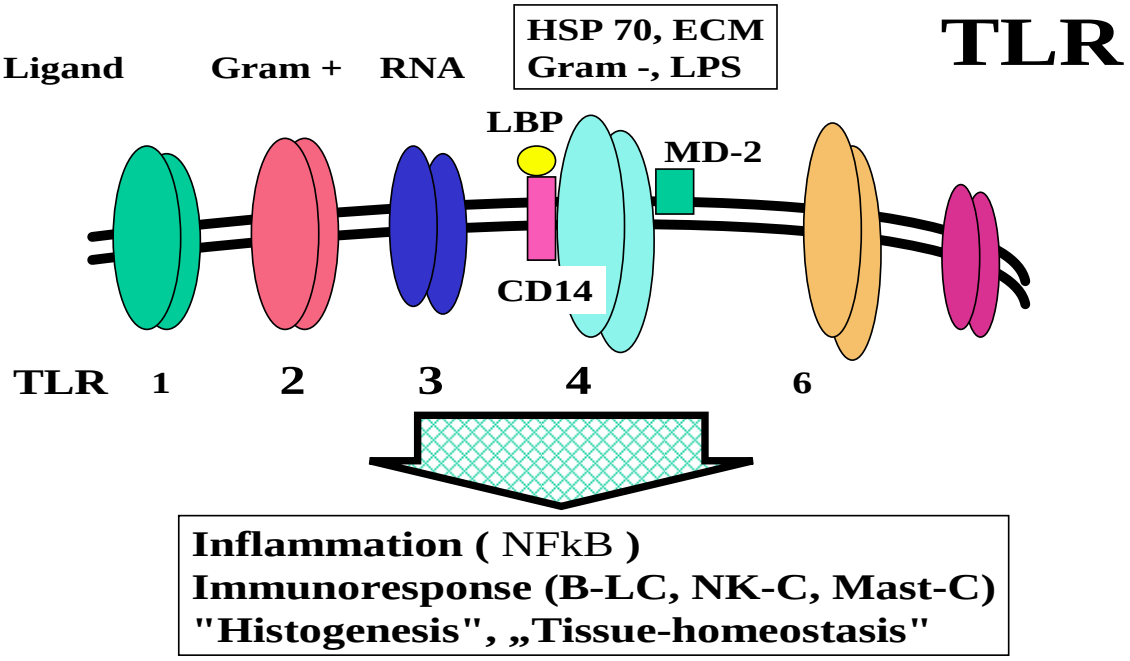


Abb. 86: Schema ausgewählter transmembraner TLR auf Monozyten [Beeck 2008].

Nierentransplantierte hatten gegenüber HD-Patienten und chronisch Nierenkranken (kompensierte Niereninsuffizienz) die geringsten Serumkonzentrationen des humoralen Inflammationsmarkers CRP (0,3 mg/dl vs. 0,6 mg/dl bei HD-Patienten, p = 0,005; 0,3 mg/dl vs. 0,8 mg/dl bei chronisch Niereninsuffizienten, p = 0,0003). Dies ist ganz offensichtlich begründet durch die „optimierte Serumspiegel-kontrollierte Immunsuppression“. Dennoch ist der Anteil proinflammatorischer Blutmonozyten (CD14+CD16++) bei nierentransplantierten Patienten signifikant höher [Einzelheiten vergleiche Scherberich 2004; Farmakiotis 2008]. Diese Monozyten scheinen durch die Immunsuppression weniger mit TLR bestückt zu sein (siehe 8.6 und 8.9). Die Höhe des Serum-CRP unterschied sich bei chronisch Nierenkranken hochsignifikant von Gesunden ($p = 1{,}4 \times 10^{-6}$), gefolgt von Dialysepatienten mit $p = 5{,}02 \times 10^{-5}$.
Der Vergleich der Kreatinin-Serumkonzentrationen zeigte, dass erwartungsgemäß sämtliche Patientengruppen im Vergleich zu Gesunden höhere Kreatininwerte hatten,

insbesondere die Patienten mit regelmäßiger drei- bis viermal wöchentlicher Hämodialyse (Median: 8,0mg/dl; $p = 6{,}08 \times 10^{-6}$); es folgten Nierenkranke (Median: 2,47 mg/dl; $p = 5{,}75 \times 10^{-9}$) und Nierentransplantierte mit einer Kreatinin-Serumkonzentration von 1,62 mg/dl ($p = 0{,}028$). Zwischen den verschiedenen Patientengruppen unterschieden sich die chronisch Nierenkranken von den Nierentransplantierten durch einen höheren Kreatininwert (Median: 2,47 mg/dl vs. 1,62 mg/dl; $p = 0{,}008$). Im Vergleich zu HD-Patienten hatten nicht-dialysepflichtige Patienten mit chronischem Nierenversagen einen niedrigeren Kreatininwert (Median: 2,47 mg/dl vs. 8,0 mg/dl; $p = 2{,}59 \times 10^{-5}$). Ein weiterer signifikanter Unterschied bestand zwischen Transplantierten und Dialysepatienten (Median: 1,62 mg/dl vs. 8,0 mg/dl; $p = 1{,}68 \times 10^{-7}$).

8.2 Vergleich humoraler und zellulärer Inflammationsmarker bei HD-Patienten mit unterschiedlichen Gefäßzugängen

Eine mögliche Beteiligung mikroinflammatorischer Zellmarker im Zusammenhang mit der Krankheitsschwere in beiden Patientengruppen wurde hier verglichen.
Patienten mit Kunstshunt (PTFE-Shunt) haben einen schlechteren Gefäßstatus und wesentlich höhere Komorbiditäten als Patienten, für die primär eine native AV-Fistel (Ciminoshunt) als Dialysezugang angelegt wird (vgl. Tabelle 2, Seite 27). Kunstshuntpatienten haben ein höheres Risiko, aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse hospitalisiert zu werden. Hinzu kommt, dass Kunststoffgefäße potenziell eine höhere Affinität gegenüber bakteriellen Kapselbestandteilen haben können (Adhärenz). Unklare Fieberzustände bei Nierentransplantierten ließen sich in Fällen alter noch bestehender teilthrombosierter Kunstgefäße auf latente Infektionen gerade dieser Shunts zurückführen [Nasser 2002]. Auch wir konnten in zwei Fällen eine ähnliche Konstellation belegen. Die nachfolgende Aufnahme zeigt eine solche Shuntinfektion bei einem unserer Patienten.

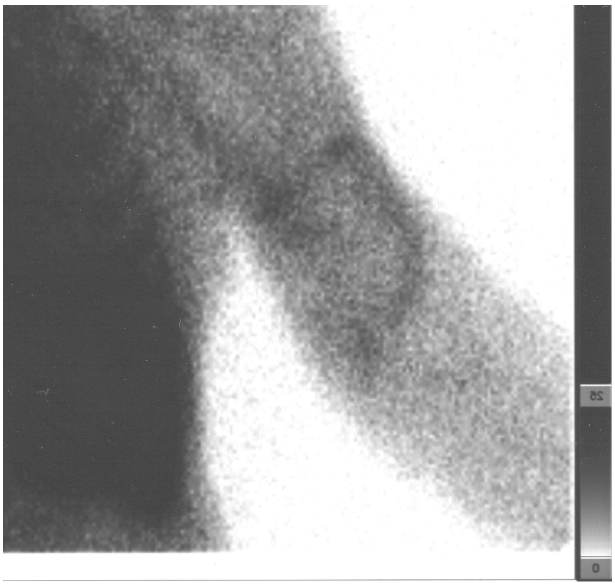


Abb. 87: Indium-Leukozytenscan. Im Shuntbereich (Kunstgefäß) zeigt sich eine deutliche Kontrastmittelaufnahme.

Patienten mit **Kunstshunt** hatten **erhöhte humorale Inflammationsmarker** im Blut. Weitere Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass mikroinflammatorische Prozesse ablaufen, welche durch Monozyten vermittelt werden. Die erhöhte Infektionsbereitschaft spiegelte sich in der erhöhten Anzahl der (shuntbedingten) Krankenhausaufenthalte wider (3 bei Kunstgefäßpatienten vs. 0 bei Cimino-Shunt-Patienten, $p < 0{,}0001$). Patienten mit Kunstshunt hatten signifikant erhöhte Werte des C-reaktiven Proteins (0,9 mg/dl vs. 0,6 mg/dl; $p = 0{,}026$). Die Patienten der Kunstgefäßgruppe besaßen allerdings einen

signifikant höheren Hämoglobinwert als die Patienten der Cimino-Shunt-Gruppe (11,5 g/dl vs. 11 g/dl; p = 0,028), obwohl letztere höhere Erythropoetin-Dosen erhielten (3500 IE/Woche vs. 6000 IE/Woche; nicht signifikant).
Patienten mit **Kunstshunt** waren anfälliger für Infektionen, was mit ein Hospitalisierungsgrund war. Bei dieser mit **hoher Komorbidität** behafteten Untergruppe (höhere Sterblichkeit, hohe Zahl kardiovaskulärer/vaskulärer Ereignisse, pAVK etc.) von Dialysepatienten kam es zu einer Umkehrung des im Vergleich der Patientengruppen (siehe 8.1) beobachteten Befundes, dass stabile Dialysepatienten gegenüber Gesunden vermehrt monozytäres TLR4 exprimieren. Dialysepatienten sind jedoch durch häufigen Kontakt mit der Dialysatormembran und dem Dialysat (bei High-Flux-Membranen sog. „backflow“) einer chronischen Einwirkung von Antigenen (u.a. LPS und LPS-Fragmenten) ausgesetzt [Lonnemann 2003]. TLR-Rezeptoren werden als Schutzmechanismus hochreguliert, um durch Zytokinfreisetzung und Rekrutierung von Leukozyten einen inflammatorischen Fokus zu überwinden. So wird eine „adäquate Antwort“ des (hier: angeborenen) Immunsystems auf TLR-bindende Liganden gewährleistet. HD-Patienten mit niedriger monozytärer TLR-Expression können mutmaßlich auf einwirkende Antigene weniger effektiv bzw. nur abgeschwächt reagieren. Höhere bzw. erhöhte Expression der TLR ist damit innerhalb dieser Patientenpopulation Ausdruck einer eher guten oder zumindest akzeptablen Abwehrlage. **Sinkt** die **TLR-Expression** ab, so **erhöht sich** das **Infektionsrisiko**; wahrscheinlich durch mangelhafte Rekrutierung von Leukozyten und ungenügender Sekretion von Zytokinen, die für die Überwindung der Infektion in ihrer Initialphase essenziell sind. Diskutiert wird auch die Möglichkeit, dass TLR inflammatorische Vorgänge hemmen oder abschwächen [Sabroe 2008].
Die Patientengruppe mit **(nativem) Ciminoshunt** hatte aufgrund der **erhöhten** Expression von **TLR2-Rezeptoren** auf CD14+CD16++-Monozyten (p = 0,05 **und TLR4**-Rezeptoren auf den beiden phagozytosestärksten CD14+CD16+ (p = 0,012) und CD14+CD16++-Monozyten (p = 0,001)) offensichtlich eine bessere zelluläre Immunkompetenz als die der Kunstgefäßgruppe. Patienten mit Ciminoshunt besitzen möglicherweise eine bessere Abwehr gegen gramnegative (und grampositive) Erreger, da sie auch klinisch stabiler sind. Allerdings ergab sich in unserer Vergleichsstudie kein Anhalt für eine TLR2-vermittelte Abwehrreaktion durch CD14++CD16neg.- und CD14+CD16+-Monozyten.
Zusammenfassend haben wir eine vermutlich günstigere TLR4-vermittelte zelluläre Immunkompetenz bei **Hämodialysepatienten mit** nativem Ciminoshunt **nachgewiesen.**

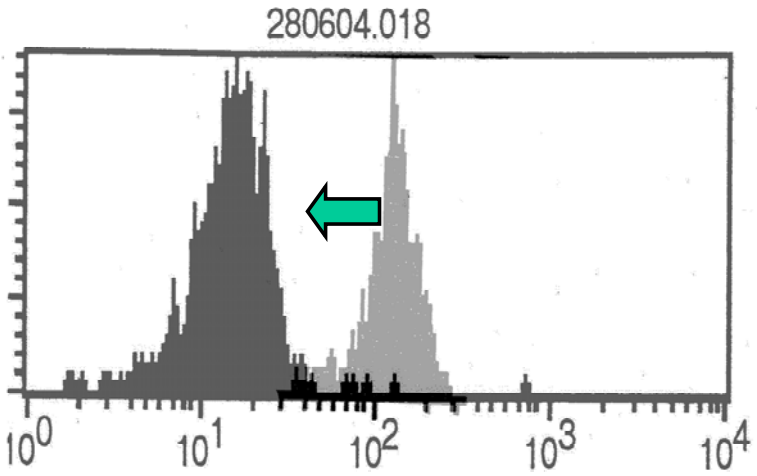


Abb. 88: Darstellung der Verlagerung der CD14+CD16++-Monozyten bei Patienten mit AV-Fistel (Ciminoshunt, hellgrau, rechts) und Kunstgefäßshunt (dunkelgrau, links).

8.3 Vergleich inflammatorischer Marker bei Tages- und Nachtdialysepatienten

Eventuell bestehende Unterschiede in der Monozytenexpression und/oder bei Routinelaborparametern (z.B. CRP) sollten bei diesen beiden unterschiedlich langen Dialyseverfahren ermittelt werden.
Mit **Ausnahme** der TLR4-Expression ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Somit kann die nächtliche Dialyseschicht unter diesem Aspekt als relativ gleichwertig angesehen werden. Aus „**mikroinflammatorischer", zellimmunologischer** Sicht ist sie der Tagesdialyse offenbar nicht überlegen. Die Rezirkulationszeiten bei der Nachtdialyse sind im Vergleich zur Tagdialyse länger. Daraus resultiert vermehrter Membrankontakt und eine erhöhte Zellaktivierung, u.a. durch Antigene wie LPS bzw. LPS-Fragmente.
Auf sämtlichen Monozytenpopulationen exprimierten **Nachtdialysepatienten** deutlich **weniger TLR4** auf zirkulierenden Blutmonozyten (CD14++CD16neg.: 35,87 RFC vs. 23,29 RFC, $p = 0{,}029$; CD14+CD16+: 46,56 RFC vs. 20,17 RFC, $p = 3{,}2 \times 10^{-5}$; CD14+CD16++: 53,28 RFC vs. 14,39 RFC, $p = 1{,}4 \times 10^{-5}$). Bei Dialysepatienten könnte die erhöhte Expression von TLR4 auf Blutmonozyten mit einer besseren Abwehrlage assoziiert sein. Hier gelten die unter 8.2 angesprochenen Aspekte zur Rezeptorverteilung. Dialysepatienten, die vermehrt TLR4 exprimieren, scheinen weniger anfällig für Infektionen zu sein (bessere Immunkompetenzlage).
Im direkten Vergleich zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der CRP-Serumkonzentration. Bei Nachtdialysepatienten war diese etwas höher (0,65 mg/dl vs. 0,5 mg/dl). Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein von der Leber gebildeter humoraler Entzündungsmarker geringer Spezifität. CRP kann nicht als Frühmarker einer Entzündungsreaktion verwendet werden.
Patienten aus der Nachtdialyse hatten tendenziell niedrigere Hämoglobinwerte (11,3 mg/dl vs. 10,8 mg/dl; nicht signifikant), was durch die geringere Erythropoetindosen dieser Patienten (6000 IE/Woche vs. 3000 IE/Woche) erklärbar wäre.
Messungen bezüglich des HLA-DR (alle Subsets), der Gesamt-CD14-Expression, dem relativen Anteil von CD14+CD16+-Zellen, TLR2-Expression (alle Subsets), Kreatinin und Hämatokrit zeigten keine signifikanten Unterschiede.

8.4 Vergleich der intra- und extrazellulären Expression des TLR4-Rezeptors

Es gibt verschiedene Interpretationsansätze bezüglich einer („veränderten") **intra**zellulären Expression von TLR, die hier in dieser Arbeit erstmals genauer untersucht wurde. Fest steht lediglich, dass nach chemischer Perforation der Monozytenmembran intrazellulär eine TLR4-Expression gemessen werden kann, die die extrazellulär gemessene teils sogar übertrifft. Dieser Befund war bisher so nicht bekannt. Es besteht die Möglichkeit einer Internalisierung des extrazellulären Toll-Like-Rezeptorkomplexes, unterschiedlicher Signaltransduktionswege oder eines verlangsamten intrazellulären Abbaus dieser Rezeptoren [Mantovani 2004, Meylan 2006, Girardin 2002].
Von Viren ist bekannt, dass zytosolische (intrazelluläre) HIV-RNA eine TLR-vermittelte Immunreaktion aktiviert [Beignon 2005]. Ob es sich hierbei um membranständige Teile eines transmembranen TLR-Komplexes handelt oder um gelöst im Zytoplasma bzw. in Endosomen vorkommende TLR, ist Gegenstand weiterer Analysen [Stetson 2006]. Welche Faktoren bei unseren Patienten zu unterschiedlichen extra- und intrazellulären TLR-Expressionen führen, bleibt zurzeit spekulativ.

Chronisch Nierenkranke haben eine **erhöhte** monozytäre Expression von intrazellulärem **TLR4 auf CD14++CD16neg.** Monozyten (20,91 vs. 12,24; $p = 0{,}0002$).
Dialysepatienten hatten analoge Befunde (28,13 RFC vs. 10,94 RFC, $p = 5{,}58 \times 10^{-9}$).

Die TLR4-Expression auf der CD14+CD16+-Subpopulation war dagegen für beide klinischen Gruppen (chron. Niereninsuffiziente vs. Dialysepatienten) nicht unterschiedlich. Allerdings war bei dieser Monozytensubpopulation, im Gegensatz zu CD14++CD16neg.-Zellen, die Expression des **extra**zellulären Anteils des TLR4-Rezeptors **höher als** die des **intra**zellulären Anteils. CD14+CD16+- bzw. CD14+CD16++-Monozyten gehören zu den potentesten Abwehrzellen des Körpers und sorgen für eine schnelle Immunantwort auf extrazelluläre Antigene. Nach chronischer Antigenexposition wäre eine erhöhte Expression intrazellulärer Rezeptorkomponenten denkbar, z.B. durch beschleunigte Signaltransduktion und Internalisierung. Intrazellulärer TLR4 würde demnach einer temporär erhöhten extrazellulären Expression folgen (nach zuvor erfolgtem Antigenkontakt). Dieser Schritt gewährleistet offenbar eine adäquate intrazelluläre Prozessierung von Antigenfragmenten, insbesondere deren Abbau (z.B. durch Proteasomen) bzw. Präsentation gegenüber Lymphozyten.
CD14++CD16neg.- wie auch **CD14+CD16++**-Monozyten verhielten sich bezüglich der intrazellulären TLR4-Expression ähnlich. Sie könnten als „first defence"-Zellen bei „Gefahr" für eine beschleunigte Signalübermittlung sorgen und/oder ihren Hauptaufgabenbereich in der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene haben. Bei **Dialysepatienten** wurde der **intra**zelluläre Anteil der TLR in diesen Zellen **vermehrt** exprimiert (20,68 RFC vs. 14,99 RFC; p = 0,002). Derartige Befunde wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben. Die akzentuierte intrazelluläre Präsenz der TLR4 deutet auf eine, vorsichtig interpretiert, „modulierte" Internalisation des Rezeptorkomplexes hin, zum Beispiel durch vermehrte Ligandenbindung an extrazelluläre TLR, die sekundär die intrazelluläre Signalübertragung fördern. Hämorheologisch relevante „mechanische Kräfte" („shedding" von Zellkomponenten durch Scherkräfte) könnten im Verlauf der Dialyse zu einem Anstieg von Zelldebris und Mikropartikeln führen und einen intrazellulären Eintritt und Abbau, vermittelt durch intrazelluläre TLR, begünstigen.
Alle anderen Patientengruppen (chron. NI- und NTX-Patienten) zeigten keine signifikanten Unterschiede, exprimierten jedoch die intrazelluläre Komponente in CD14+CD16++-Monozyten tendenziell stärker.
Personen aus der **Vergleichsgruppe sowie** die unter immunsuppressiver Therapie stehenden **nierentransplantierten** Patienten wiesen **keinen** Unterschied **zwischen intra- und extra**zellulärem TLR4 auf. Dies betrifft alle von uns untersuchten monozytären Subpopulationen. Bei diesen Personen herrscht offenbar, im Gegensatz zu chronisch Kranken, ein TLR4-Gleichgewicht zwischen extra- und intrazellulärer Präsenz. Diese Balance verschiebt sich möglicherweise erst nach Antigenkontakt (Membraneffekt, Zelladhärenz, Zytolyse).

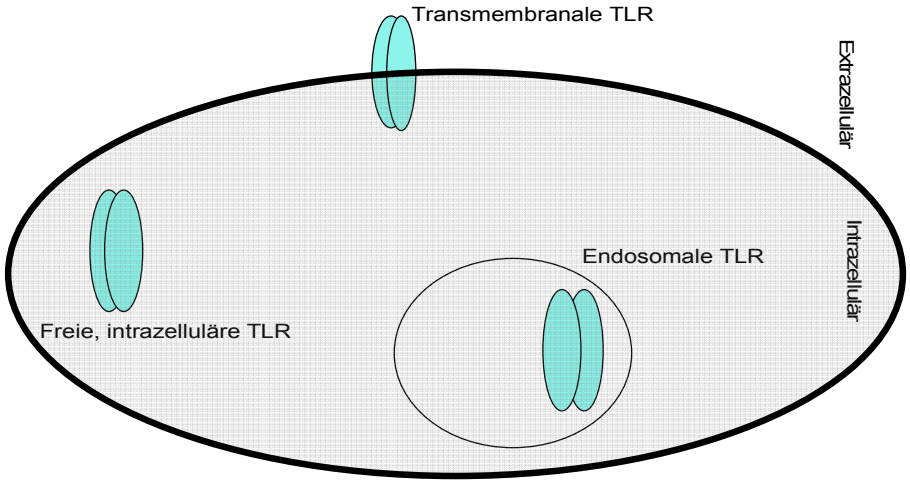


Abb. 89: Schematische Darstellung einer möglichen TLR-Verteilung in Monozyten.

8.5 HLA-DR und TLR3 bei virusinfizierten (HBV, HCV) Dialysepatienten

Eventuell nachweisbare Expressionsunterschiede der TLR, ausgelöst durch DNA- bzw. RNA-Viren, sollten mit dieser Studie nachgewiesen werden. Des Weiteren untersuchten und verglichen wir die Expression intra- und extrazellulärer TLR3.
In unserem Vergleich zwischen der Expression extra- und der intrazellulärer TLR3 zeigte sich, dass die Expression des **extrazellulären Rezeptoranteils** bei sämtlichen erhobenen Daten **unter der Expression des intrazellulären** TLR3 lag. Dies war unabhängig vom Infektionsstatus mit Hepatitis (HD-Patienten, CD14+CD16++: 8,24 RFC vs. 20,54 RFC; p = 0,002). Eine Ausnahme bildeten CD14+CD16+-Monozyten bei nicht mit Hepatitis infizierten Dialysepatienten (23,71 RFC vs. 18,77; p = 0,017). Bei diesen Zellen fand sich vermehrt extrazellulärer TLR3. Intrazellulär vorkommende Virenpartikel könnten zu einer Verschiebung der Expression von extrazellulär nach intrazellulär führen.
Im Vergleich zwischen für Hepatitis seronegativen Dialysepatienten und solchen mit Hepatitis-Infektion (HBV, HCV oder beides) zeigte sich, dass mit Hepatitis B infizierte Dialysepatienten eine ähnliche Expression von TLR3 (extrazellulär) hatten wie die nicht infizierten HD-Patienten (CD14+CD16++: 8,94 RFC vs. 8,24 RFC). Die Expression des **intrazellulären TLR3** war bei **HBV**-Patienten jedoch deutlich **erhöht** und überstieg auf CD14++CD16neg.- und CD14+CD16+-Monozyten sogar noch die von HCV-positiven Patienten (CD14+CD16+ → HBV: 35,04 RFC, HCV: 28,3 RFC). Nach Akira *et al.* kann TLR3 nur RNS-Viren erkennen [Akira 2003]. DNS-Viren wie HBV sind demnach kein Ligand von TLR3. Diese These können wir in der vorliegenden Arbeit unter diesen Bedingungen nicht bestätigen.
Die intrazelluläre TLR-Expression aktiviert die intrazelluläre Signalkaskade der Monozyten über den nukleären Transkriptionsfaktor NF-κB mit daraus resultierender Zytokinsekretion, und zwar besonders proinflammatorischer Zytokine. Damit lassen sich Befunde von Neuman *et al.* bestätigen. Diese beschreiben erhöhte Konzentrationen von TNF-α, IL-6, IL-8 und IL-12 im Blut von HCV-Patienten, verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe [Neuman 2001]. Perrin-Cocon *et al.* beschrieben, dass es bei HCV-positiven Patienten durch einen spezifischen Defekt (Aktivierung des „MEK/ERK-pathway“) zu einer Monozytenaktivierung kommt. Die Sekretion von Zytokinen ist erhöht [Perrin-Cocon 2008]. Nach Villacres *et al.* war die absolute IL-6-Synthese und -Sekretion als Antwort auf TLR3- und TLR4-vermittelte Liganden bei HCV-Patienten eingeschränkt (ex-vivo). Die Autoren schlussfolgerten, dass HCV entweder direkt oder über eine indirekte „Infizierung“ von Monozyten zu einer „defekten“ bzw. defizienten Zytokinsekretion führt. Die Rolle der TLR wurde allerdings nicht weiter diskutiert. Offen bleibt, welche intrazellulären Abläufe, wenn nicht die durch TLR-vermittelten, zu der Ausschüttung von Zytokinen führten [Villacres 2008].
Sato *et al.* konnten nach Inkubation mit HCV-Core-Protein auf CD14++CD16neg. Monozyten eine erhöhte Expression von TLR2 aber eine verminderte Expression von TLR4 messen [Sato 2007]. Derartige Analysen haben wir bei unseren Patienten nicht durchgeführt. Insgesamt zeigt sich damit aber die weitgehende Einbeziehung der TLR bei „Infektionserregern“ eines weiten Spektrums. Bezüglich des Einflusses von HCV auf das Überleben von Spendernieren fanden Pedroso *et al.*, dass HCV-Patienten länger an der Dialyse verbleiben (aus Gründen der verlängerten Wartezeit) und auch mehrere vorherige frustrane Transplantationsversuche hatten [Pedroso 2006].
Beschreibungen, dass TLR3 nur in Endosomen vorliegt [Uematsu 2006], konnten wir mit unserer Studie nicht sicher belegen, da sich auch während der Präparationsphase TLR3 auf Monozyten messen ließ.

8.6 HLA-DR- und TLR-Expression unter immunkompromittierten Bedingungen

Die Auswirkungen einer Glukokortikoidtherapie auf die Expression von Oberflächenantigenen auf Monozyten sollte mit dieser Studie beurteilt werden.
Patienten unter Glukokortikoidtherapie exprimierten im Vergleich zu Gesunden weniger HLA-DR auf CD14++CD16neg.-Monozyten (433,39 RFC vs. 820,47 RFC) und auf CD14+CD16+-Monozyten (3822,94 RFC vs. 5376,12 RFC). Die **CD14-**Gesamtexpression war bei den mit **Glukokortikoiden** Behandelten im Vergleich zu gesunden Probanden tendenziell geringer (337,65 RFC vs. 453,16 RFC). Diese Ergebnisse decken sich mit unseren vorangegangenen Befunddaten [Nockher 1997; Scherberich 1999 und 2003].

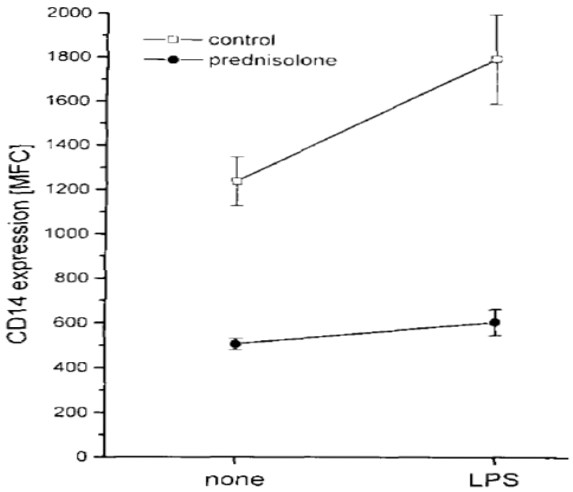


Abb. 90: Verminderte Hochregulation der LPS(Endotoxin)-stimulierten CD14 Expression (Monozytenkulturen) nach Inkubation mit GC. Aus Nockher WA, Scherberich JE: Expression and release of the monocyte lipopolysaccharide receptor antigen CD14 are suppressed by glucocorticoids in vivo and in vitro. J. Immunol. 1997.

Chronisch nierenkranke Patienten, die nicht unter Glukokortikoidtherapie stehen und somit nicht immunsupprimiert sind, zeigten **höhere Expressionen** aller von uns erhobenen Parameter als Patienten, die Glukokortikoide in therapeutischer Dosierung erhielten. Einzige Ausnahmen bildeten der Anteil der CD14+CD16+-Monozyten (7,14 RFC vs. 9,8 RFC) und das CRP (0,6 mg/dl vs. 0,75 mg/dl).
Gesunde Probanden wiesen gemeinsam mit Nierenkranken ohne Glukokortikoidtherapie anteilsmäßig am wenigsten CD14+CD16+-Monozyten im Blut auf.
Die unter Glukokortikoidtherapie stehenden Probanden haben aufgrund ihrer Immunsuppression ein höheres Risiko, eine Infektion zu erleiden. Das zeigt sich auch am höheren Anteil an CD14+CD16+-Monozyten. Allerdings scheinen diese Monozyten nicht ausreichend mit TLR bestückt zu sein, was eventuell ein weiterer Aspekt der Wirkung der Glukokortikoide ist. Verminderte Expression von TLR führt zu einer geringeren Zytokinsekretion aus der Zelle und somit zu einer verminderten Immunreaktion gegen konfrontierende Antigene. Eine erhöhte Expression von TLR2 und TLR4 nach Glukokortikoidgabe, wie sie Rozkova auf dendritischen Zellen beschreibt, konnten wir nicht bestätigen [Rozkova 2006]. Die von uns festgestellte verminderte Rezeptorendichte deckt sich hingegen mit den Ergebnissen von Nockher et al. und Rowland et al., die beschreiben, dass Dexamethason die Expression von CD14 auf monozytären Zellen sowie die Zytokinsekretion vermindert [Nockher 1997; Rowland 1998]. Des Weiteren war nach einer gepulsten Steroidtherapie (bei Lebertransplantation) die Expression von TLR2 und TLR4 vermindert [Deng 2007].

8.7 HLA-DR- und TLR-Expression bei erhöhten humoralen Entzündungsparametern

Mit dieser Studie wollten wir untersuchen, wie TLR bei pathologisch erhöhten sowie bei normalen CRP-Werten auf proinflammatorischen Monozyten innerhalb der verschiedenen Patientengruppen exprimiert werden.
Zwischen Dialysepatienten mit unterschiedlicher Expression des humoralen Entzündungsmarkers CRP fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von HLA-DR, TLR2 oder TLR4. Gleiches galt für chronisch Nierenkranke.
Nierentransplantierte exprimierten dagegen vermehrt HLA-DR auf CD14++CD16neg.-Monozyten (729,93 RFC vs. 355,45 RFC, p = ,034), sofern humorale Entzündungsmarker unterhalb der pathologischen Schwellenkonzentration im Serum lagen (**CRP unter 0,5 mg/dl)**. TLR2 wurde bei Nierentransplantierten mit niedrigerem CRP vermehrt exprimiert. Auf CD14++CD16neg.-Monozyten betrug die zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit dazu p = 0,006 (45,32 RFC vs. 25,71 RFC), auf CD14+CD16+-Monozyten p = 0,002 (113,42 RFC vs. 69,16 RFC) und auf CD14+CD16++ Zellen p = 0,005 (73,65 RFC vs. 52,27 RFC).
Nierentransplantierte Patienten scheinen demnach am sensibelsten auf Änderungen des CRP-Wertes und generell auf TLR2-Liganden zu reagieren. Bei diesen Patienten ist unter Umständen die TLR2-vermittelte Zytokinproduktion bei höheren CRP-Werten eingeschränkt. Möglicherweise liegt ein negatives Feedback vor. Frei interpretiert soll die verminderte TLR2-Expression z.B. unter Infekten die **Immuntoleranz erhöhen** und das Transplantat schützen.

8.8 HLA-DR und TLR bei vermehrter Retention

Diese Studie sollte untersuchen, ob es bei unterschiedlichem Retentionsstatus der Patienten zu abweichender TLR-Expression kommt.
Sowohl chronisch Nierenkranke als auch Patienten nach Nierentransplantation unterschieden sich nicht in der monozytären Expression von HLA-DR, TLR2 oder TLR4, wenn man diese Patientengruppen nach ihrem Kreatininwert in zwei Gruppen (Kreatinin > 3 mg/dl und Kreatinin < 3 mg/dl) aufteilt. Somit beeinflusst offenbar der Marker „Kreatinin“ nicht zwingend die monozytäre TLR-Expression.

8.9 Expression proinflammatorischer Monozyten bei Nierentransplantierten mit Transplantatdysfunktion

Mit dieser Studie sollte der Status proinflammatorischer Parameter bei Patienten mit **Nierentransplantation und anschließendem Transplantatversagen** (chronic graft failure, CGF) dokumentiert und mit dem der HD-Patienten und Nierentransplantationspatienten verglichen werden.
Wir zeigten, dass Patienten, die **nach chronischem Transplantatversagen** wieder dialysepflichtig geworden waren, sowohl **weniger HLA-DR** als auch weniger **TLR2** und **TLR4** exprimierten als HD-Patienten bzw. Nierentransplantierte. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus unserem Patientenverlauf (siehe Kapitel 8.11; Patient 1). Dort deutet ein **steter Abfall** (**nach** einem „**Expressionspeak**“) von **TLR2, TLR4 und HLA-DR** auf eine **Dysfunktion** der Transplantatniere hin. Nach akuter Abstoßung einer Spenderniere wandern vermehrt Monozyten und T-Zellen ins Nierengewebe ein. Die Anzahl infiltrierter Monozyten (Makrophagen) steht hierbei in direktem Zusammenhang mit der Transplantatdysfunktion [Girlanda 2008]. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu wissen, ob im peripheren Blut vermehrt CD14+CD16+-Zellen gemessen werden konnten.

Bei einer akuten Lebertransplantatabstoßung fanden Deng *et al.* signifikant höhere TLR2- und TLR4-Expressionen. Eine Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat tritt erst auf, sobald Monozyten im peripheren Blut zirkulieren [Deng 2007]. Ein analoges Rezeptorverhalten könnte auch bei Nierentransplantationen eine Rolle spielen. Palmer *et al.* wiesen bei **akutem** Nierentransplantatversagen eine Aktivierung von TLR4 nach. Allerdings bezogen sich diese Befunde nicht auf Lebendspenden und betrachteten nur einen bestimmten TLR4-Polymorphismus [Palmer 2005].
Bei Patienten mit Transplantatversagen wurde HLA-DR tendenziell auf allen Monozyten vermindert exprimiert. Auf CD14+CD16+-Monozyten exprimierten Patienten mit chronischer Transplantatdysfunktion (Chronic Graft Failure, CGF) tendenziell am wenigsten HLA-DR (3640,14 RFC vs. 3928,16 RFC bei Transplantierten und 5186,13 RFC bei Hämodialysierten).
Sowohl **TLR2-** als auch **TLR4-**Rezeptoren auf **CD14+CD16+** Zellen wurden bei **CGF**-Patienten **vermindert exprimiert** (TLR2: $p = 0{,}0002$ zu NTX bzw. $p = 0{,}0001$ zu HD; TLR4: $p = 0{,}005$ zu HD). Ein **erhöhte**r relativer Anteil der **CD14+CD16+-Zellen** im Blut dieser Patienten, zusammen mit der relativ geringen Zahl an TLR- und HLA-DR-Rezeptoren, weist auf eine supprimierte Immunabwehr hin. Diese wird besonders deutlich durch die Expressionshöhe von TLR2 auf CD14+CD16++-Zellen. Verglichen mit den anderen Patienten exprimierten Patienten mit chronischer Transplantatdysfunktion signifikant weniger TLR2 (21,02 RFC vs. 68,23 RFC bei NTX bzw. 77,74 RFC bei HD-Patienten). Das zweiseitige Signifikanzniveau liegt bei $p = 0{,}0002$ zu NTX-Patienten bzw. $p = 0{,}0001$ zu HD-Patienten.
Nach Braudeau *et al.* exprimieren Patienten mit chronischer Nierentransplantatdysfunktion vermehrt TLR4 und MyD88 [Braudeau 2008]. Diese Beobachtungen konnten wir bezüglich des TLR2 und TLR4 auf CD14+CD16+-Monozyten nicht bestätigen. Eine vermehrte Zytokinsekretion aus den Monozyten, die wiederum aus der erhöhten TLR-Expression resultiert, entspricht nicht dem Therapieprinzip einer Immunsuppression.
Die TLR2-Expression im Transplantatgewebe scheint mit einer verbesserten zweijährigen Prognose bei Patienten nach Nierentransplantation (NTX) assoziiert zu sein. Hierüber liegen zurzeit bei NTX-Patienten so gut wie keine Berichte vor. Bisher wurde in wenigen Arbeiten über die Gewebsverteilung und Konzentration von TLR im Nierengewebe berichtet. Hiernach soll eine höhere TLR2-Expression im Gewebe des distalen Tubulus zu einem besseren Transplantatüberleben führen [de Groot 2008]. Nach ausführlicher Korrespondenz mit den Autoren der Arbeit relativierten diese jedoch ihre in der erwähnten Arbeit publizierten Daten. Eine dauerhaft verminderte TLR2-Expression könnte unter Infekten die Immuntoleranz erhöhen und so das Transplantat schützen (siehe auch 8.7).
Die Gesamtexpression von CD14-Monozyten war in der CGF-Patientengruppe geringer, wohl zugunsten der potenteren CD14+CD16+-Zellen. Im Vergleich mit den HD-Patienten war dieser Unterschied zweiseitig signifikant (313,44 RFC vs. 433,23 RFC; $p = 0{,}0003$).
Patienten mit chronischer Transplantatdysfunktion zeigten in unserem Vergleich zu Dialysepatienten eine hohe Kreatininkonzentration im Serum (10,47 mg/dl vs. 8,0 mg/dl).

Die proinflammatorischen Monozyten-Subsets wiesen bei Patienten mit chronischem Nierentransplantatversagen weniger TLR auf, die Anzahl an CD14+CD16+ Zellen war jedoch immer noch höher als bei Patienten mit stabiler NTX-Funktion [Farmakiotis 2008]. Somit kommt es bei diesen Patienten trotz erhöhter Zahl phagozytosefähiger CD14+CD16+ Monozyten zu einer absolut verminderten Bindung von Liganden und daraus resultierend zu verminderter Zytokinbildung. Die Tatsache, dass NTX-Patienten unabhängig von der TLR-Expression erhöhte Anteile (> 8 %) proinflammatorischer CD14+CD16+ Blutmonozyten aufweisen, deutet auf einen unverändert bestehenden „Inflammationsstatus“ hin, trotz spiegelkontrollierter, „optimierter“ Immunsuppression [Scherberich 2004].

8.10 Expression verschiedener Monozytenepitope nach In-vitro-Inkubation mit mikrobiellen Antigenen

Mit Hilfe dieses Laborversuches konnten wir das In-vitro-Verhalten der TLR in den ersten drei Stunden nach Beimpfung mit Antigenen auf unterschiedlichen Monozytensubsets beobachten. Im dreistündigen Verlauf wurde eine Änderung des Expressionsprofils der Monozyten im Vergleich zur unbeimpften Kontrolle deutlich. Weiterhin ließ sich ein abweichendes Expressionsverhalten zwischen intra- und extrazellulärer TLR-Expression nachweisen.

TLR2: TLR2 zeigte die größten Veränderungen auf **CD14+CD16++-Monozyten**: Diese Zellen bildeten nach drei Stunden Inkubation deutlich **mehr TLR2** als die Vergleichsgruppe, und zwar unabhängig vom zugefügten Erreger (100 Kolonien E. coli: 121,67 %; 10.000 K. E. coli: 117,5 %; 100 K. Staph. aureus: 103,27 %; 10.000 K. Staph. aureus: 21,59 %). Auffällig war, dass bei hohen Staphylokokkenzahlen die Zunahme deutlich geringer ausfiel als bei niedrigeren Keimzahlen. An dem deutlichen TLR2-Zuwachs nach Beimpfen mit 100 Kolonien Staph. aureus hatte maßgeblich der **intrazelluläre TLR2**-Anteil. Im direkten Vergleich mit extrazellulären Rezeptoren stieg er überproportional stark an (15,68 RFC auf 34,29 RFC; extrazellulär → 23,19 auf 32,78). Bezüglich E. coli waren solche Effekte nicht zu beschreiben; hier stieg nach Beimpfen mit 10.000 Kolonien der extrazelluläre TLR-Wert stärker an als der intrazelluläre (24,69 RFC auf 88,17 RFC; intrazellulär→ 14,46 auf 33,68). Intrazellulärer TLR2 wurde auf unbeimpften CD14++CD16neg.- und CD14+CD16+-Zellen als einziger TLR nach drei Stunden weniger stark exprimiert (verglichen mit dem Ausgangswert). Der intrazelluläre TLR2-Anstieg nach Beimpfen war dosisabhängig und nahm auf diesen Zellen bei Erhöhung der E.-coli-Dosis stärker zu. Bei Zunahme der Staphylokokkendosis fiel dieser Zuwachs hingegen geringer aus.
Zusammenfassend beobachteten wir eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte TLR2-Expression nach Antigenexposition. Nach Beimpfen mit grampositiven Bakterien wurden intrazelluläre TLR2 deutlich stärker exprimiert als extrazelluläre. Dies bestätigt unsere Annahme, dass TLR bei inflammatorischen Vorgängen vermehrt gebildet werden und es zu einer Internalisierung der TLR kommt, wie dies auch im Kapitel 8.4 beschrieben wurde.

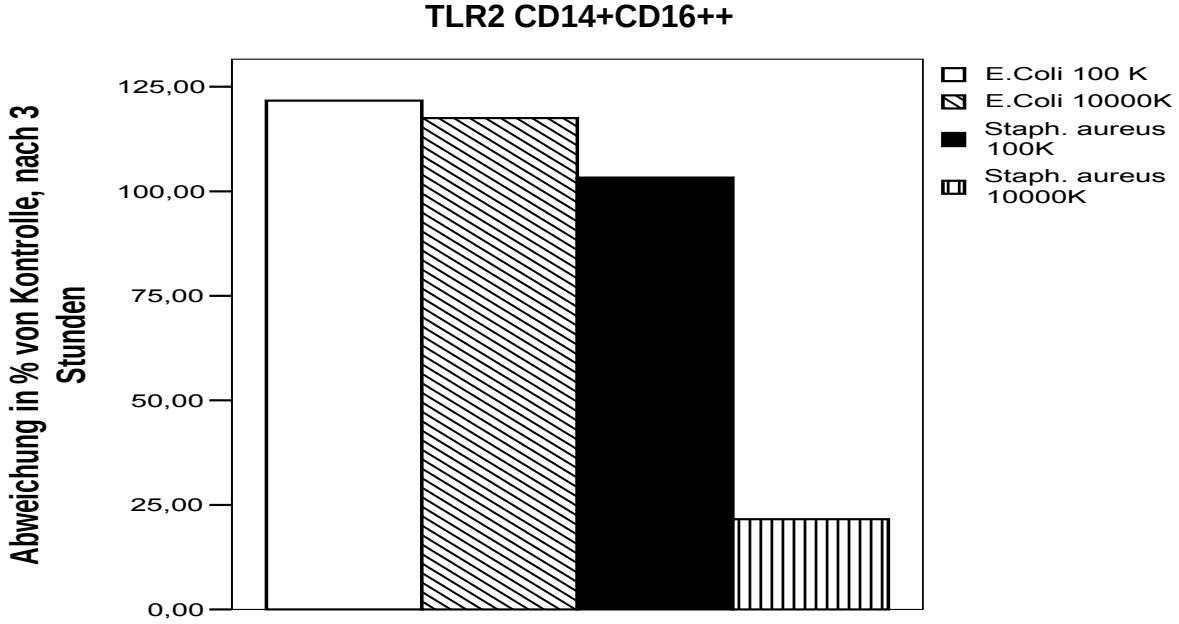


Abb 91: Prozentuale Veränderung der TLR2-Expression auf CD14+CD16++-Monozyten, nach Inkubation mit Antigenen.

TLR3: TLR3 scheint nicht nur in der Abwehr gegen Viren eine Rolle zu spielen. Dieser TLR-Subtyp scheint auch eine wesentliche Rolle bei der **Abwehr gegen E. coli** zu spielen. Sämtliche Monozytensubpopulationen reagierten mit einer, relativ zur Negativkontrolle verminderten, Expression intrazellulärer TLR3, nach Kontakt mit Staphylokokkus aureus, und zwar unabhängig von dessen Kolonienzahl (100 K. Staph. aureus: CD14++CD16neg. → -22,91 %; CD14+CD16+ → -31,3 %; CD14+CD16++→ -19,7 %; 10.000 K. Staph. aureus: CD14++CD16neg. → -53,5 %; CD14+CD16+ → -41,99 %; CD14+CD16++ → -44,38 %). Sowohl die extra- als auch die intrazelluläre TLR3-Expression wurde hingegen erhöht, wenn man CD14+CD16+-Monozyten mit 10.000 Kolonien E. coli impft (extrazellulär → 164,25 %; intrazellulär → 19,19 %). Auf den beiden potentesten Monozytenpopulationen CD14+CD16+ und CD14+CD16++ konnte man bei einer niedrigen Kolonienzahl dieses gramnegativen Bakteriums eine stärkere Erhöhung extrazellulärer und eine geringere Erhöhung intrazellulärer TLR3 finden (CD14+CD16+: extrazellulär → 11,7 RFC auf 23,40 RFC, intrazellulär → 24,25 RFC auf 26,3 RFC; CD14+CD16++: extrazellulär → 8,28 RFC auf 22,88 RFC; intrazellulär → 25,03 RFC auf 28,26 RFC). Intrazelluläres TLR3 stieg unter erhöhter mikrobieller Antigenexposition wesentlich stärker an (CD14+CD16+: 18,11 RFC auf 31,62 RFC; CD14+CD16++: 21,77 RFC auf 32,78 RFC). Extrazelluläre TLR3 reagierten dafür schon auf niedrige Antigenmengen. Ein Signal zur vermehrten Expression (bzw. intrazellulären Transformation) von intrazellulärerem TLR3 scheint hingegen erst ab einer bestimmten Kolonienzahl, die für E. coli zwischen 100 und 10.000 liegt, stattzufinden.
Hiermit haben wir Hinweise dafür gefunden, dass TLR3-Rezeptoren neben dsRNS-Viren auch eine Rolle in der Abwehr von E. coli spielen könnten. Des Weiteren werden auch Staphylokokken erkannt. TLR3 wird nach deren Kontakt mit Blutmonozyten in vitro vermindert gebildet. Der Grund für diesen Expressionsrückgang liegt wohl in einer erhöhten Expression anderer, spezifischer TLR.

TLR4: Nach Inkubation kultivierter Monozyten mit Staph. aureus kam es zu einer relativen Verminderung der TLR4-Expression auf CD14+CD16+ (-51,3 % bei 100 Kolonien; -57,85 % bei 10.000 Kolonien) und CD14+CD16++-Monozyten (-62,43 % bei 100 Kolonien; -48,14 % bei 10.000 Kolonien) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei CD14+CD16++-Zellen war die relative Abnahme (zur Kontrolle) bei höherer Kolonienzahl von Staph. aureus geringer. Besonders die hoch phagozytosefähigen Monozyten wie **CD14+CD16+ und CD14+CD16++** verminderten (relativ zur Kontrolle) ihre intrazelluläre TLR4-Rezeptoranzahl in den ersten drei Stunden nach dem Beimpfen mit Staph. aureus. Im direkten Vergleich zwischen Intra- und Extrazellulärdomäne geschah dies unter **Zunahme der extrazellulären Expression** in dosisabhängiger Weise (CD14+CD16+ und 10.000 Kolonien: extrazellulär→ 7,4 RFC auf 9,65 RFC; intrazellulär→ 9,47 RFC auf 9,56 RFC).
Nach Inkubation mit **E. coli** fand auf **CD14+CD16+- und CD14+CD16++-Monozyten** ab einer bestimmten Antigendosis eine TLR4-Umverteilung statt. Die **extra**zellulären TLR4 wurden vermehrt gebildet. Auf CD14+CD16+-Monozyten kam es zu einer relativen Abnahme der **intra**zellulären Rezeptorenzahl nach Inkubation mit 100 Kolonien E. coli (-21,79%). Gleichzeitig nahm die extrazelluläre Komponente auf Kosten der intrazellulären zu (extrazellulär: 10,37 RFC auf 15,75 RFC; intrazellulär: 11,4 RFC auf 15,4 RFC). Bei 10.000 Kolonien E. coli stieg die TLR4-Expression auf beiden Zellpopulationen, verglichen mit der Kontrolle, stark an (CD14+CD16+: 43,86 %; CD14+CD16++: 57,33 %). Dabei wurde die **intrazelluläre** Komponente **vermehrt** exprimiert. Im Vergleich mit der extrazellulären fiel dieser Zuwachs allerdings deutlich geringer aus (CD14+CD16++: extrazellulär→ 1,97 RFC auf 26,42 RFC; intrazellulär→ 10,27 RFC auf 23,19 RFC).
TLR4 ist traditioneller Rezeptor für LPS von gramnegativen Bakterien. Unsere Befunde sprechen dafür, dass es ab einer bestimmten Antigenschwellendosis zu einer erhöhten Expression von TLR4 kommt.
Diese Beobachtungen ähneln der Erkenntnis, dass bei Harnwegsinfekten P-Fimbrien (E. coli) vom Tamm-Horsfall-Protein in Urothel- und Tubuluszellen gebunden werden. Diese Bindung führt zur direkten Aktivierung von TLR4. THG interagiert hierbei auch mit TLR4 (etwa in tubulären Epithelien) und kann TLR aktivieren [Übersicht Scherberich 2008].

Eine wie von Forster-Waldl bei Neugeborenen mit geringem Geburtsgewicht beschriebene Reduktion des TLR4 konnten wir bei unseren adulten Monozyten nur bei Exposition mit niedrigen CFU (Colony Forming Units) von E. coli nachweisen [Forster-Waldl 2005].

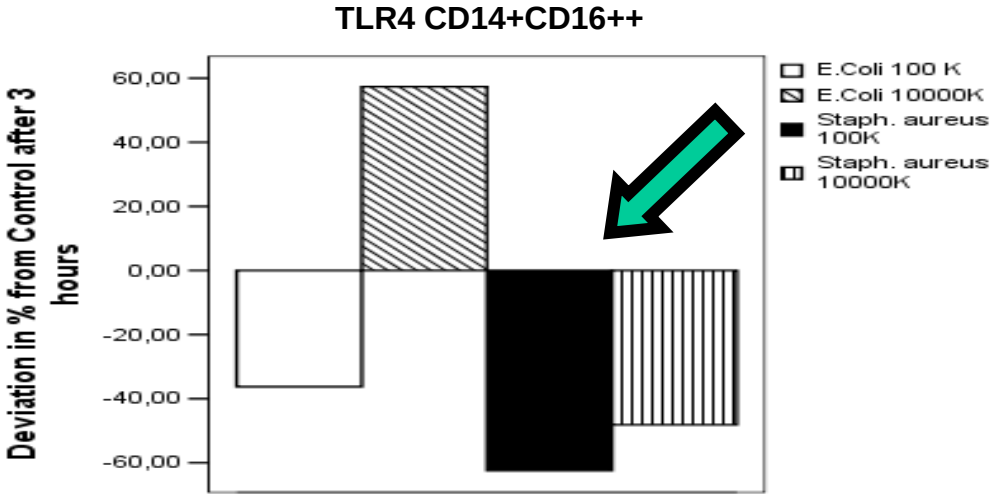
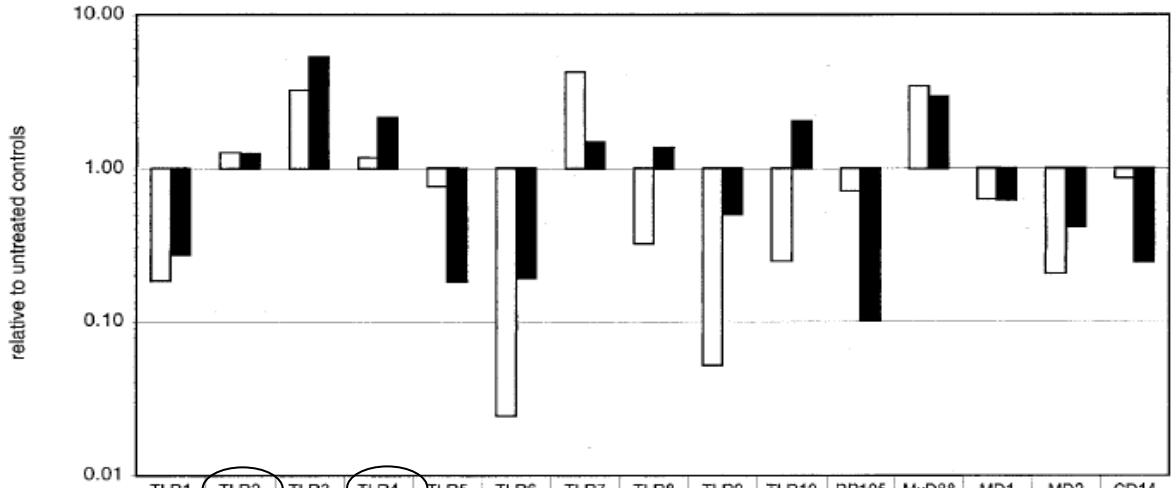


Abb 92: Prozentuale Abweichung der TLR4-Expression mikrobiell exponierter CD14+CD16++ Monozyten, im Vergleich zur unbeimpften Kontrolle. Nach Inkubation mit grampositiven Bakterien (Staph. aureus) kam es zur verminderten Expression von TLR4 auf diesen Monozyten. Dieser Befund war neu, da TLR4 bisher nur als Rezeptor für gramnegative Bakterien beschrieben wurde, jedoch eindeutig pleiotrope Eigenschaften aufweist.

Die Gesamtexpression der CD14-Monozyten erhöhte sich unabhängig vom zugeführten Antigen. Besonders stark fiel dieser Anstieg nach Inkubation mit 10.000 Kolonien E. coli aus. Hier kam es zu einer Zunahme um 150%. Staphylokokken führten ebenfalls zu einer Erhöhung der CD14 Zellen; mit ca. 25 % allerdings in wesentlich geringerem Umfang.
Nach Inkubation mit 10.000 Kolonien E. coli kam es zu einer relativen Zunahme der HLA-DR-Expression auf CD14++CD16neg.-Monozyten (66,98 %). Fast identisch nahm auch die Anzahl der CD14+CD16+-Monozyten nach Inkubation mit derselben Bakteriendosis zu (66,89 %).
Die CD14+CD16++-Monozyten hingegen exprimierten weniger HLA-DR nach dem Beimpfen mit 10.000 Kolonien E. coli (-2,39%). CD14+CD16++ Zellen scheinen als erste Zellreihe vermehrt im peripheren Blut nachweisbar zu sein (first defence, s. 8.4). Im Anschluss werden jüngere Monozyten vermehrt gebildet und die CD14+CD16++-Expression sinkt ab.
Nach Beimpfen mit 10.000 Kolonien Staph. aureus exprimierten CD14++CD16neg.-Monozyten (-2,08 %), CD14+CD16+-Monozyten (-21,78 %) und CD14+CD16++-Monozyten (-53 %) weniger HLA-DR. Das Beimpfen mit 100 Kolonien Staph. aureus führte auf allen Zellpopulationen zu keiner nennenswerten Veränderung in Bezug auf die Vergleichsgruppe. Die maximale Veränderung betrug 6,46 % auf CD14+CD16+-Monozyten.



	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10	RP105	MyD88	MD1	MD2	CD14
□ Granulocytes	0.19	1.26	3.23	1.17	0.77	0.02	4.21	0.32	0.05	0.25	0.72	3.43	0.63	0.21	0.87
■ Monocytes	0.27	1.24	5.32	2.13	0.18	0.19	1.49	1.36	0.50	2.02	0.10	2.93	0.62	0.42	0.25

Abb 93: Expression von TLR-mRNS in Monozyten bzw. Granulozyten, relativ zur unbeimpften Kontrolle. Die Forscher konnten eine erhöhte Expression von TLR2-mRNS und TLR4-mRNS in peripheren Blutmonozyten nachweisen (nach Inkubation mit E. Coli). Diese Befunde decken sich mit denen von uns erhobenen Daten. Aus: Zarember KA, Godowski PJ: Tissue expression of human Toll-like-receptors and differential regulation of Toll-like-receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products and cytokines. J. Immunol 168 (2): 554-61, 2002

8.11 Immunzytologische Verlaufsbeobachtung definierter Krankheitsbilder

Bei zwei Patienten wurden über zwei Jahre die Expression der Oberflächenmoleküle peripherer Blutmonozyten wiederholt gemessen. Hierbei ließen sich die Reaktionen der TLR und HLA-DR (z.B. durch Medikamente) gut dokumentieren.
Patient 1 ist ein 67-jähriger, nierentransplantierter Patient, der im Verlauf eine Abstoßungsreaktion gegen seine Transplantatniere zeigte und wieder dialysepflichtig wurde. Anhand dieses Patientenverlaufs wird ersichtlich, dass die präinflammatorischen Marker potenzielle Gefahren für Transplantatempfänger deutlich früher erkennen lassen als der humorale Entzündungsmarker CRP oder auch das Kreatinin.

Messungen am selben Tag vor und **nach** Gabe der **Glukokortikoide** (i.v.) zeigten jeweils eine kurzfristige, starke **Abnahme der TLR2-Expression**. Aus dem Verlauf ist ersichtlich, dass sich nach jeder Glukokortikoidgabe die TLR2-Expression auf CD14+CD16+-Zellen bis zur nächsten Blutabnahme wieder erholte und anstieg. Dies könnte auf die relativ kurze Halbwertszeit (HWZ) von Prednison zurückzuführen sein (HWZ ca. 3 Stunden). Der Patient erhielt allerdings zeitgleich Tacrolimus, sodass ein Einfluss dieses Immunsuppressivums auf den beobachteten Verlauf nicht ausgeschlossen werden kann (Plasmaeliminationshalbwertszeit 4 bis 60 Stunden).
Nach der Behandlung am 12.07. sank das TLR2 zuerst steil und dann kontinuierlich ab. Dies könnte ein Hinweis auf das bevorstehende Transplantatversagen sein. Eine Erklärung könnte der unter 8.7 postulierte Ansatz sein, dass durch eine verminderte TLR2-Expression die Immuntoleranz erhöht und so das Transplantat noch geschützt werden soll.
Reziprok verhielt sich der **relative Anteil der CD14+CD16+-Monozyten**. **Nach** jeder **Prednisongabe stieg** dieser **initial an**, um dann bis zur nächsten Untersuchung wieder abzufallen. Schlussendlich stieg dieser Wert dann jedoch auch ohne Glukokortikoidtherapie an, um am ersten Dialysemesspunkt wieder abzufallen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden aus Kapitel 8.6. Glukokortikoide scheinen demnach bei chronischer

Anwendung die Anzahl der CD14+CD16+-Monozyten zu erhöhen und gleichzeitig deren TLR-Expression herabzusetzen.
Nach der ersten Prednisongabe, und damit schon eine Woche vor dem TLR2, zeigte das **TLR4 auf CD14+CD16+- und** auch auf **CD14++CD16neg.-Zellen** einen **Maximalwert**, um anschließend im Verlauf **stetig abzufallen**. Auf CD14+CD16++-Monozyten zeigte sich zum selben Zeitpunkt der größte negative Ausschlag des HLA-DR.
Maximale TLR4-Expression und niedrige HLA-DR-Expression sind damit dem Anstieg von CRP und der maximalen TLR2-Expression um eine Woche voraus. Damit liegen sie deutlich vor dem bisher möglichen labortechnischen Nachweis einer Entzündungsreaktion, die zum Transplantatversagen führen kann. Messungen monozytärer Antigene könnten damit eine aussagekräftige Verlaufsbeurteilung nierentransplantierter Patienten zulassen**.**

Patientin 2 ist eine 56-jährige Patientin mit interstitieller Nephritis. Ab dem dritten Untersuchungstag wurde sie mit 12 mg Decortin® behandelt. Ab dem fünften Untersuchungstag wurde das Prednison ausgeschlichen (12. Mai).
Aus dem Verlauf dieser Patientin wird ersichtlich, dass es zum Zeitpunkt der klinischen Diagnose ihrer interstitiellen Nephritis zu einem **Anstieg** der **CD14+CD16+-Monozyten und** der **TLR2**-Rezeptoren auf sämtlichen Monozyten kam. Die Aussagen bezüglich des TLR2-Verlaufs scheinen denen unserer Glukokortikoidvergleichsstudie entgegenzustehen. Allerdings muss man beachten, dass es sich hierbei um den Verlauf einer einzelnen Person handelt und ein ansteigendes TLR2 nicht heißt, dass dieser Patient generell mehr TLR2 exprimiert als Patienten ohne Glukokortikoidtherapie. Außerdem scheint es bei der hier beschriebenen kurzzeitigen Anwendung von Glukokortikoiden (GC), im Gegensatz zu Patient 1 mit langfristiger GC-Therapie, nicht zu einem TLR-modulierenden Effekt zu kommen. Der TLR2-Anstieg ist in diesem Fall am ehesten auf die Verbesserung der zellulären Immunkompetenz zurückzuführen, mit dem Ziel, die Infektion zu bekämpfen.
Nachdem die Prednisondosis verringert wurde (Verbesserung der klinischen Symptome), fiel auch die TLR2-Expression auf allen Monozytensubpopulationen. Die Gesamtexpression von CD14 nahm unter GC-Therapie bei unserer Patientin zu. Nach Dosisreduktion fiel sie wieder ab. Unter Prednisontherapie wurde HLA-DR auf CD14+CD16+-Monozyten vermehrt exprimiert. Die Dosisreduktion hatte keinen Einfluss auf die HLA-DR-Expression dieser Monozyten.
Beobachtungen der Forschergruppe um Ziegler-Heitbrock konnten wir nicht bestätigen. Sie beobachteten bei Multiple-Sklerose-Patienten, dass diese unter GC-Therapie weniger CD14+CD16+-Monozyten exprimieren [Fingerle-Rowson 1998]. Gesunden Probanden, denen GC infundiert wurde, zeigten analoge Effekte. Fünf Tage nach der Therapie konnte nur noch ein kleiner Rest (5 % des Ausgangswertes) CD14+CD16+-Monozyten gefunden werden [Dayyani 2003]. Beide Untersuchungen wurden mit einer fünftägigen (high-dose) GC-Therapie durchgeführt. Es ist nicht bekannt, wie die CD14+CD16+-Monozyten sich danach verhalten. Die von uns durchgeführten Untersuchungen beziehen sich auf Zeiträume von mehreren Wochen bzw. Monaten (Patient 1). Eine dauerhaft niedrige oder sogar ganz unterdrückte Expression von CD14+CD16+-Monozyten ließ sich bei unseren immunsupprimierten NTX-Patienten nicht nachweisen (siehe Kapitel 8.1).

8.12 Vergleich von HLA-DR sowie TLR vor und nach einer Dialysesitzung

Mit dieser Studie wollten wir eventuell auftretende Veränderungen der TLR-Expression vor und nach einer Dialyse beobachten.
Im Verlauf einer Dialysesitzung sanken die Expressionen der von uns gemessenen Parameter ab. Die einzige Ausnahme stellten HLA-DR auf CD14+CD16++-Zellen sowie TLR4 auf sämtlichen Monozytensubpopulationen dar.
HLA-DR war nach der Dialyse vermehrt auf CD14+CD16++-Zellen nachweisbar (vor HD: 1610,76 RFC; nach HD: 2196,83 RFC). Extrazelluläres TLR4 wurde auf allen

Monozytensubpopulationen vermehrt gemessen (CD14++CD16neg.: 26,66 RFC auf 43,71 RFC; CD14+CD16+: 16,85 RFC auf 19,11 RFC; CD14+CD16++: 5,0 RFC auf 10,5 RFC). Der relative Anteil der CD14+CD16+-Monozyten nahm, wie auch die restlichen Parameter, im Verlauf einer Dialyse ab (19,94 RFC auf 14,31 RFC; p = 0,043). Griveas *et al*. sind zu ähnlichen Ergebnissen gekommen und berichten über einen Abfall der CD14+CD16+-Monozyten in den ersten 30 Minuten einer Dialyse. Dieser ist unabhängig vom verwendeten Dialysematerial [Griveas 2006].

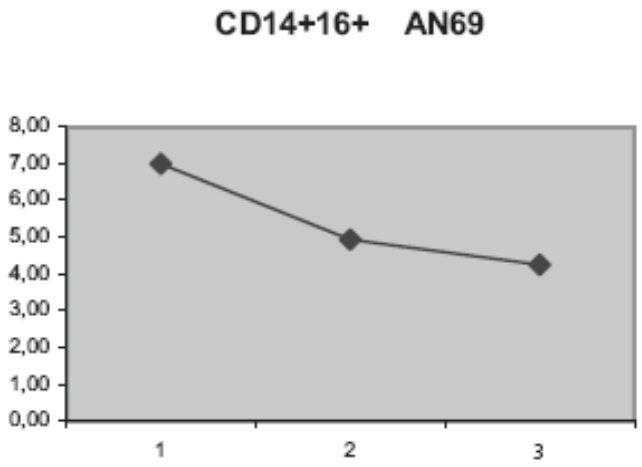


Abb 94: CD14+CD16+-Monozytenexpression zum Zeitpunkt 0 min (1), 30 min (2) und 240 min (3) bei Dialyse mit einer AN69-Dialysemembran (Natriummethallylsulfonat-Polymer).
Aus: Griveas I *et al*.: Biocompatibility study based on differential sequestration kinetics of CD 14+16+ blood monocyte subsets with different dialyzers. Renal Failure 2006.

Die Gesamtexpression der „jungen“ CD14++CD16neg.-Monozyten nahm im Verlauf bei uns um 17,9 % ab, die Expression von „reiferen“ CD14+CD16+-Monozyten um 28,2 % (signifikant). Damit ließ sich die Beobachtung, dass reifere (CD14+CD16+)-Monozyten eine vergleichsweise verbesserte Adhäsion aufweisen und nicht frei zirkulierend im Blut nachzuweisen sind, teilweise bestätigen [Sester 2001]. Allerdings kam es gleichzeitig zu einer deutlichen Steigerung der TLR4-Rezeptorendichte auf den zirkulierenden Monozyten, im Sinne einer Optimierung der zellulären Immunabwehr. Dies lässt sich nicht alleine durch die Adhäsion der Monozyten an die Gefäßmembran erklären, sondern muss eine weitere Ursache haben (z.B. Interaktion mit der Dialysemembran, Abbau von Zelldebris).

Die geschilderten Untersuchungen belegen die bisher eher noch relativ wenig beachtete Bedeutung des angeborenen Immunsystems zur Gewährung einer stabilen Gesundheit bzw. bei einer Krankheitsentwicklung. Hierbei sind Monozyten als antigenpräsentierende Zellen Hauptakteure der Immunregulation und Immuntoleranz.

11. Zusammenfassung

Expression der Membranantigene CD14, CD16, HLA-DR sowie der Toll-Like-Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 auf Blutmonozyten von Patienten mit Nierenerkrankungen

Durchflusszytometrische Analysen bei Gesunden, Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, Dialysepatienten und Patienten nach Nierentransplantation

Von Stefan Beeck, München 2010

Die antigene immunphaenotypische Ausstattung im peripheren Blut zirkulierender Monozyten ist uneinheitlich: Je nach Verteilungsprofil funktionell wichtiger immunregulatorischer Moleküle (z.B. Endotoxinrezeptor, Fc-Rezeptoren, Toll-like-Rezeptoren) lassen sich verschiedene Subpopulationen unterscheiden. Allen ist jedoch das Molekül CD14 gemeinsam, ein pleiotroper Endotoxinrezeptor. Eine klinisch bedeutsame Subpopulation CD14-positiver Zellen sind sogenannte „proinflammatorische“ Blutmonozyten, die beim Gesunden etwa 8 % aller CD14-positiven Monozyten ausmachen. Diese exprimieren zusätzlich einen niedrig affinen Fc-γ-III-Rezeptor (CD16), der unter anderem mit der Phagozytoseleistung und Zytokinsekretion der Zellen in Zusammenhang steht.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde ein Schwerpunkt auf die Verteilung verschiedener Subpopulationen peripherer Blutmonozyten bei Nierenkranken, Nierentransplantierten und Dialysepatienten gelegt. Diesen Patienten ist gemeinsam eine sog. „Mikroinflammation“ mit akzelerierter Arteriosklerose, erkenntlich an erhöhten humoralen und zellulären Inflammationsmarkern. Des Weiteren sollte geklärt werden, wie weitere wichtige immunregulatorische Moleküle wie HLA-DR und die Toll-Like-Rezeptoren (TLR2 und TLR4) unter normalen und klinisch-pathologischen Bedingungen bei Patienten mit Niereninsuffizienz (im Vergleich zu Gesunden) auf Blutmonozyten exprimiert sind. TLR sind integrale hochkonservierte Bestandteile des so angeborenen Immunsystems und unter anderem als sog. PRR (Pattern Recognition Receptors) an der Erkennung differenzierter mikrobieller Erregerstrukturen maßgeblich beteiligt.

Methodisch erfolgte die Analyse antigener Muster auf Blutmonozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie unter Anwendung fluorochrommarkierter monoklonaler Antikörper. Die Bestimmung von HLA-DR, TLR2, TLR3 und TLR4 erfolgte jeweils auf allen drei zellulären Subpopulationen des Immunphaenotyps CD14++CD16neg., CD14+CD16+ und CD14+CD16++. Untersucht wurden Gesunde, Patienten mit Niereninsuffizienz, Patienten unter chronischer Hämodialysebehandlung, Nierentransplantierte sowie Patienten unter Gluko-kortikoidmedikation. Ergänzend wurde der mögliche modulierende Effekt von Staphylokokken und E. coli in einem *in vitro*-Zellkulturmodell auf die Expression monozytärer Antigene untersucht.

Die statistische Auswertung (parameterfreie Tests) erfolgte mit Hilfe des SPSS-Programms.

Im Wesentlichen wurden folgende Daten erhalten:

1.) Der mittlere Anteil proinflammatorischer Blutmonozyten ist bei Dialysepatienten gegenüber Gesunden signifikant ($p = 0,0001$) erhöht. Dialysepatienten exprimieren signifikant mehr TLR4 auf CD14+CD16+-($p = 0,004$)- und CD14+CD16++-($p = 0,008$)-Monozyten im Vergleich zu Gesunden. Niereninsuffiziente exprimieren hingegen signifikant weniger HLA-DR auf den von uns bestimmten Monozytensubpopulationen als gesunde Probanden ($p = 0,005$ auf CD14+CD16neg.).

2.) Dialysepatienten mit Kunstgefäßshunt (PTFE-Shunt) müssen häufiger stationär aufgenommen werden ($p = 2,23x10^{-5}$) und haben eine erhöhte CRP-Serumkonzentration im Vergleich zu Patienten mit nativer AV-Fistel (Ciminoshunt; $p = 0,026$). Bei Dialysepatienten mit nativem Ciminoshunt ist die monozytäre Expression von TLR4 auf CD14+CD16+-($p = 0,012$)- und CD14+CD16++-($p = 0,001$)-Monozyten im Vergleich zu Patienten mit Kunstgefäßshunt erhöht. Niedrige TLR Expression ging mit einer erhöhten Komorbidität einher.

3.) Dialysepatienten einer Tagschicht (kürzere Behandlungszeiten im Vergleich zur Nachtschicht) exprimieren mehr TLR4 auf allen Monozytensubpopulationen im Vergleich zu Dialysepatienten einer Nachtschicht ($p = 0,029$ auf CD14++ CD16neg., $p < 0,00001$ auf CD14+CD16+, $p < 0,00001$ auf CD14+CD16++-Zellen).

4.) Mit dieser Arbeit ist es uns erstmals gelungen, eine intrazelluläre Komponente von TLR4 im menschlichen Blut folgender Patienten nachzuweisen: Patienten mit kompensierter chronischer Niereninsuffizienz ($n = 13$) und Dialysepatienten ($n = 28$) exprimieren intrazelluläres TLR4 in CD14++CD16neg.-Zellen stärker als CD14++CD16neg.-Monozyten, die extrazelluläres TLR4 exprimieren (bei Nierenkranken $p = 0,0002$; bei Dialysepatienten $p = 5x10^{-9}$). Bei chronisch niereninsuffizienten Patienten wird dagegen, im Vergleich zu Dialysepatienten, extrazelluläres TLR4 auf der Subpopulation CD14+CD16+ vermehrt exprimiert ($p = 0,074$). Bei Gesunden sowie immunsupprimierten Patienten findet sich kein Unterschied in der Expression zwischen intra- und extrazellulärer TLR4-Komponente. Die Daten weisen auf eine unterschiedliche Prozessierung der TLR möglicherweise auch auf geänderte TLR-vermittelte Signaltransduktionswege unter pathologischen Bedingungen hin.

5.) Wir konnten Hinweise dafür finden, dass TLR3 nicht nur als RNS-Virus-Rezeptor fungiert, sondern auch in der Abwehr einer HBV-Infektion (verursacht durch ein DNS-Virus) eine entscheidende Rolle spielt. Bei Dialysepatienten ohne Hepatitis ist die monozytäre Expression des extrazellulären TLR3 auf CD14++CD16neg.- und CD14+CD16++-Zellen niedriger als die des intrazellulär gemessenen TLR3. Dialysepatienten mit seropositiver Hepatitis B exprimieren TLR3 verstärkt in CD14++CD16neg.- und CD14+CD16++-Zellen.

6.) Während einer Dialysebehandlung fällt die HLA-DR-Expression auf CD14++CD16neg.- und CD14+CD16+-Monozyten sowie die TLR2-Expression auf allen drei Monozytensubpopulationen ab. Auch reduzierte sich der Anteil zirkulierender Blutmonozyten unter Hämodialysebehandlung ($p = 0,043$).

7.) Eine Behandlung von Patienten mit Glukokortikoiden vermindert tendenziell die Expression von HLA-DR auf CD14-positiven und CD14+CD16+-Zellen im Vergleich zum Gesunden. Die Abregulation von CD14 durch Glukokortikoide wurde von uns bereits früher beschrieben [Nockher und Scherberich: J. Immunol. 1997; Scherberich 1999].

8.) Nierentransplantierte mit normalen Serum-CRP Konzentrationen weisen erhöhte TLR2-Expression auf allen monozytären Subpopulationen auf (CD14++CD16neg.-Zellen: $p = 0,006$, CD14+CD16+-Zellen: $p = 0,002$ und CD14+CD16++-Zellen: $p = 0,005$)

9.) Eine Abstoßungsreaktion bei Nierentransplantierten geht mit einer erhöhten Zellzahl von CD14+CD16+-Monozyten im Blut einher. Unter Behandlung der Abstoßungsreaktion sind CD14-positive Blutmonozyten im Vergleich zu Dialysepatienten signifikant vermindert ($p = 0,0003$). TLR2 und TLR4 sind ebenfalls signifikant erniedrigt: TLR2 und TLR4 auf CD14+CD16+-Zellen ($p = 0,0001$, $p = 0,005$), TLR2 zusätzlich auf CD14+CD16++-Zellen ($p = 0,0001$).

10.) Im kasuistischen Verlauf eines Patienten mit Nierentransplantatversagen führte die Glukokortikoidgabe zur reaktiven Erhöhung der TLR2-Expression auf CD14+CD16+-Zellen. Ein drastischer Abfall der TLR2-Expression auf allen drei Monozytensubpopulation zeigte dagegen ein Versagen der Transplantatfunktion an. Nach Glukokortikoidmedikation (bei interstitieller Nephritis) kam es ebenfalls zum Anstieg von TLR2 und TLR4 auf CD14+CD16++-Zellen sowie zum Anstieg der HLA-DR-Expression. Eine Verminderung der GC-Dosis führte zu einem Abfall der TLR2.

11.) Unter In-vitro-Kulturbedingungen verändert sich das Expressionsprofil von Blutmonozyten in Gegenwart von Bakterien im Vergleich zu Kontrollen. Sowohl grampositive wie gramnegative Erreger erhöhen die TLR2-Expression auf CD16-positiven Zellen. Besonders stark steigt hier der intrazelluläre Anteil des TLR2 im Vergleich zur extrazellulär gemessenen TLR2-Expression. Staphylokokken vermindern im Gegensatz dazu TLR3 in allen Monozytensubpopulationen. Das Beimpfen mit 10.000 Kolonien E. coli induzierte in vitro insbesondere die Zunahme des extrazellulären TLR4 auf CD14+CD16+- und CD14+CD16++-Zellen.

Die Ergebnisse belegen eine chronische Aktivierung proinflammatorischer Blutmonozyten der Subpopulation CD14+CD16+ bei chronischer Niereninsuffizienz sowie andere signifikante Veränderungen im Immunphänotyp antigen-präsentierender Zellen.

Diese zellulär bedingte „Mikroinflammation“ unterhält mit hoher Wahrscheinlichkeit die akzelerierte Atheromatose (als Teil einer entzündlichen Grunderkrankung) und

ist für die erhöhte kardiovaskuläre Ereignisrate bei Nierenkranken verantwortlich; was durch jüngste Daten einer mit uns kooperierenden Arbeitsgruppe belegt ist.

Nach unseren Befunden war analog die Mortalität von Dialysepatienten im Vergleich zum Parameter CRP hochsignifikant ($p < 0.00001$) mit der Phänotypie peripherer Blutmonozyten assoziiert [Birk und Scherberich 2007].

Insgesamt belegen die Analysen, dass klinische Untersuchungen, die sich mit der möglichen pathophysiologischen Bedeutung peripherer Blutmonozyten beschäftigen, stets die verschiedenen immunphaenotypischen und funktionell unterschiedlichen Subpopulationen berücksichtigen müssen. Als antigen-präsentierende Zellen sind zirkulierende Monozyten wichtige Verbindungsglieder in der Kette der erworbenen und angeborenen Immunität, die, wie belegt, bei chronischen Nierenerkrankungen im Vergleich zu Gesunden erhebliche Abweichungen zeigt.

Literaturverzeichnis

- Akira, S and H.Hemmi: Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. Immunol Lett 85(2): 85-95, 2003

- Anders HJ, Schlöndorff D: Toll-like receptors: emerging concepts in kidney disease. Curr Opin Nephrol Hypertens 16(3): 177-83, 2007

- Ando M, Shibuya A, Tsuchiya K, Akiba T, Nitta K: Reduced expression of Toll-like receptor 4 contributes to impaired cytokine response of monocytes in uremic patients. Kidney Int. 70(2): 358-62, 2006

- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature 413(6857): 732-8, 2001

- Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sanchez ML, de Santiago M, Escribano L, Diaz-Agustin B, Vaquero JM, Laso FJ, San Miguel JF, Orfao A: Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage (-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD 14(+) monocytes and CD 16 (-) dendritic cells. Clin Immunol 100: 325-338, 2001

- Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackmann N, Godowski PJ, Ulevitch RJ, Knaus UG: Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. Nat Immunol. 1(6): 533-40, 2000

- Arroyo JC, Gabilondo F, Llorente L, Meraz-Rios MA, Sanchez-Torres C: Immune Response Induced in Vitro by CD16(-) and CD16(+) Monocyte-Derived Dendritic Cells in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Dendritic Cell Vaccines. J Clin Immunol., 24:86-96, 2004

- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. J Biol Chem. 277(17):15028-34, Epub 2002

- Ashida K, Miyazaki K, Takayama E, Tsujimoto H, Ayaori M, Yakushiji T, Iwamoto N, Yonemura A, Isoda K, Mochizuki H, Hiraide H, Kusuhara M, Ohsuzu F: Characterization of the Expression of TLR 2 (Toll-like Receptor 2) and TLR 4 on Circulating Monocytes in Coronary Artery Disease. J Atheroscler Thromb. 12(1):53-60, 2005

- Beeck S, Scherberich JE: Impact of dialysis shunt management (native AV-fistula versus arteriovenous graft) on humoral and cellular markers of inflammation including monocyte HLA-DR and TLR expression. Nieren- & Hochdruckkrankh 37, 449, 2008

- Beg AA: Endogenous ligands of Toll-like receptors: Implications for regulating inflammatory and immune response. Trends Immunol. 23(11):509-12, 2002

- Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, Larsson M, Gorelick RJ, Lifson JD, Bhardwaj N: Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions.J Clin Invest.115(11):3265-75. Epub 2005

- Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L: The proinflammatory CD14(+)CD16(+)DR(++) monocytes are a major source of TNF. J Immunol 168: 3536-42, 2002.

- Biondo C, Midiri A, Messina L, Tomasello F, Garufi G, Catania MR, Bombaci M, Beninati C, Teti G, Mancuso G: MyD88 and TLR2, but Not TLR4, are required for host defense against Cryptococcus neoformans. Eur J Immunol. 35(3):870-8, 2005

- Birk E, Scherberich JE: Komorbiditätsspektrum und Indikatoren der Sterblichkeit bei Hämodialysepatienten (abstr.) Nieren- und Hochdruckkrankh. 36, 400, 2007

- Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, Lewis A, Ray K, Tschopp J, Volpe F: Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. Nat Cell Biol. 2(6):346-51, 2000

- Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakawa AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ, Kwak LW: Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. Science 298(5595):1025-9, 2002

- Bornstein SR, Ziegler CG, Krug AW, Kanczkowski W, Rettori V, McCann SM, Wirth M, Zacharowski K: The role of toll-like receptors in the immune-adrenal crosstalk. Ann N Y Acad Sci. 1088:307-18, 2006

- Braudeau C, Ashton-Chess J, Giral M, Dugast E, Louis S, Pallier A, Braud C, Moreau A, Renaudin K, Soulillou JP, Brouard S: Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. Transplantation. 86(1):130-6, 2008

- Cernadas M R, Grandjean M, Tossi M A: Vascular Access Ptency and Complications: A Comparison of Brachiobasilic AV Fistulas and PTFE Brachioaxillary Bridge AV Fistulas in Hemodialysis Patients. Dialysis and Transplantation, 32 (11), 2003

- Cunningham PN, Wang Y, Guo R, He G, Quigg RJ: Role of Toll-like receptor 4 in endotoxin-induced acute renal failure. J Immunol. 172(4):2629-35, 2004

- Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Biek P, Lewis DB: Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune response: role of dendritic cells. J Immunol. 168(9):4524-30, 2002

- Dayyani F, Belge KU, Frankenberger M, Mack M, Berki T, Ziegler-Heitbrock L: Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD 14+ CD 16+ monocytes. J Leukoc Biol, 74(1):33-39, 2003

- Dayyani F, Joeining A, Ziegler-Heitbrock L, Schmidmaier R, Straka C, Emmerich B, Meinhardt G: Autologous stem-cell transplantation restores the functional properties of CD 14+CD 16+ monocytes in patients with myeloma and lymphoma. J Leukoc Biol. 75:207-13, 2004

- de Groot K, Kuklik K, Bröcker V, Schwarz A, Gwinner W, Kreipe H, Haller H, Fliser D, Mengel M: Toll-like receptor 2 and renal allograft function. Am J Nephrol 28(4):583-8, 2008

- Deng JF, Geng L, Qian YG, Li H, Wang Y, Xie HY, Feng XW, Zheng SS: The role of toll-like receptors 2 and 4 in acute allograft rejection after liver transplantation. Transplant Proc. 39(10):3222-4, 2007

- Descamps-Latscha B: The immune system in end-stage renal disease. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2(6):883-91, 1993.

- Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, Jungers P, Chatenoud L: Dysregulation of the immune system in chronic uremic and hemodialysed patients. Presse Med. 24(8):405-10, 1995

- Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC, Jialal I: Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. J Clin Endocrinol Metab. 93(2): 578-83, 2008

- Ding K, Shibui A, Wang Y, Takamoto M, Matsuguchi T, Sugane K: Impaired recognition by Toll-like Rezeptor 4 is responsible for exacerbated murine Pneumocystis pneumonia. Microbes Infect. 2005 7(2):195-203 [Epub ahead of print]

- Draude G, von Hundelshausen P, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HW, Weber C: Distinct scavenger receptor expression and function in the human CD14(+)/CD16(+) monocyte subset. Am J Physiol. 276(4 Pt 2):H1144-9, 1999

- Emonts, M., J.A. Hazelzet, et al.: Host genetic determinants of Neisseria meningitidis infections. Lancet Infect Dis 3(9):565-77, 2003

- Farmakiotis A, Scherberich JE: Toll-like receptor 2 (TLR2) expression of monocytes in kidney allograft dysfunction. Nieren- & Hochdruckkrankh 37, 522-523, 2008

- Feterowski C, Emmanuilidis K, Miethke T, Gerauer K, Rump M, Ulm K, Holzmann B, Weighardt H: Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis. Immunology 109(3):426-31, 2003

- Flo TH, Halaas O, Torp S, Ryan L, Lien E, Dybdahl B, Sundan A, Espevik T: Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. J Leukoc Biol. 69(3):474-81, 2001

- Flo TH, Halaas O, Lien E, Ryan L, Teti G, Golenbock DT, Sundan A, Espevik T: Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by Listeria monocytogenes, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. J Immunol. 164(4):2064-9, 2000

- Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HWL: Selective depletion of CD 14+CD 16+ monocytes by glucocorticoid therapy. Clin. Exp. Immunol. 112:501,1998

- Földes G, von Haehling S, Okonko DO, Jankowska EA, Poole-Wilson PA, Anker SD: Fluvastatin reduces increased blood monocyte Toll-like receptor 4 expression in whole blood from patients with chronic heart failure. Int J Cardiol. 124(1):80-5, 2008

- Forster-Waldl E, Sadeghi K, Tamandl D, Gerhold B, Hallwirth U, Rohrmeister K, Hayde M, Prusa AR, Herkner K, Boltz-Nitulescu G, Pollak A, Spittler A: Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging. Pediatr Res. 58(1):121-4, Epub 2005

- Frantz S, Kelly RA, Bourcier T: Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. J Biol Chem. 276(7):5197-203, 2001

- Girardin SE, Sansonetti PJ, Philpott DJ: Intracellular vs extracellular recognition of pathogens – common concepts in mammals and flies. Trends in Microbiology 4: 193-199, 2002

- Girlanda R, Kleiner DE, Duan Z, Ford EA, Wright EC, Mannon RB, Kirk AD: Monocyte infiltration and kidney allograft dysfunction during acute rejection. Am J Transplant. 8(3):600-7, 2008

- Griveas I, Visvardis G, Sakellariou G, Passadakis P, Thodis I, Vargemezis V, Pavlitou A, Fleva A: Biocompatibility study based on differential sequestration kinetics of CD 14+16+ blood monocyte subsets with different dialyzers. Ren Fail. 28(6):493-9, 2006

- Guangxun Meng, Mark Rutz, Matthias Schiemann, Jochen Metzger, Alina Grabiec, Ralf Schwandner, Peter B. Luppa, Frank Ebel, Dirk H. Busch, Stefan Bauer, Hermann Wagner and Carsten J. Kirschning: Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. J. Clin. Invest 113:1473-1481, 2004

- Haruta Y, Koarada S, Tada Y, Mitamura M, Ohta A, Fukuoka M, Hayashi S, Nagasawa K: High expression of Toll-like receptor 4 on CD14+ monocytes in acute infectious diseases. Scand J Infect Dis. 39(6-7):577-83, 2007

- Heine G, Sester U, Sester M, Scherberich JE, Girndt M, Köhler H: A shift in the Th1/Th2 ratio accompanies the clinical remission of systemic lupus erythematosus in patients with endstage renal disease. Nephrol Dial Transplant 17, 1790-1794. 2002

- Heine GH, Ulrich C, Seibert E, Seiler S, Marell J, Reichart B, Krause M, Schlitt A, Köhler H, Girndt M: CD14++CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. Kidney Int. 73(5):622-9. 2008

- Hoebe K, Du X, Georgl P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B: Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. Nature 424(6950):736-7, 2003

- Horng T, Barton GM, Medzhitov R: TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. Nat Immunol. 2(9):835-41, 2001

- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G: Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. J Immunol 168(9):4531-7, 2002

- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol. 162(7):3749-52, 1999

- Huang ZS, Chiang BL: Correlation between serum lipid profiles and the ratio and count of the CD 16+ monocyte subset in peripheral blood of apparently healthy adults. J Formos Med Assoc 101: 11-17, 2002

- Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, Okamoto A, Ueno A, Ogawa N, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Makino H: Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 50(5):1457-1467, 2004

- Kaisho, T. and S. Akira: Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. Curr Mol Med. 3(8):759-71, 2003

- Kellermeyer M, Ried C, Hartinger A, Scherberich JE: Modulation of Monocyte Receptor antigens and Toll-like receptors 2 and 4 by alpha-Calcidol (abstr). Kongress Ges. Nephrol. Basel 2004, Kidney Blood Press Res 27, 370, 2004

- Kiech, S, CJ Wiedermann: Toll-like receptor 4 and atherogenesis. Ann Med 35(3):164-71, 2003

- Kigerl KA, Lai W, Rivest S, Hart RP, Satoskar AR, Popovich PG: Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury. J Neurochem. 102(1):37-50, 2007

- Kirschning CJ, Schumann RR. TLR2: Cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. Curr Top Microbiol Immunol. 270:121-44, 2002

- Kirschning CJ laboratory: Roles of Toll-like receptors (TLRs) in Cellular Activation upon infection and its Relation to the Roles of other Pattern Recognition Receptors (PRRs). http://www.mikrobio.med.tu-muenchen.de/forschung/tlrs.html, 13.01.2004

- Knotek M, Rogachev B, Wang W, Ecder T, Melnikov V, Gengaro PE, Esson M, Edelstein CL, Dinarello CA, Schrier RW: Endotoxemic renal failure in mice: Role of tumor necrosis factor independent of inducible nitric oxide synthase. Kidney Int. 59(6):2243-9, 2001

- Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA: Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. J Immunol. 164(1):13-7, 2000

- Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL: Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. Nat Med. 9(5):525-32, Epub 2003

- Kuroki Y, Tsuchida K, Go I, Aoyama M, Naganuma T, Takemoto Y, Nakatani T: A study of innate immunity in patients with end-stage renal disease: special reference to toll-like receptor-2 and -4 expression in peripheral blood monocytes of hemodialysis patients. Int J Mol Med.19(5):783-90, 2007

- Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW: Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. Nat Immunol. 1(5):398-401, 2000

- Lambert K, Liebstein B, Eggerer P, Frank H, Hartinger A, Scherberich JE: Functional antigens (CD14, HLADR, TLR2, TLR4) of peripheral blood monocytes during peritoneal dialysis (CAPD) compared to healthy controls. Nieren- & Hochdruckkrankh 37, 457-458, 2008

- Lendemans S, Kreuzfelder E, Rani M, Bayeeh E, Schade FU, Flohé SB, Waydhas C, Flohé S: Toll-like receptor 2 and 4 expression after severe injury is not involved in the dysregulation of the innate immune system. J Trauma. 63(4):740-6, 2007

- Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M Jr, Lemon SM: Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4a protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. Proc Natl Acad Sci USA 102(8):2992-7, Epub 2005

- Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouazz F, Medzhitov RM, Beg AA: An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. J Immunol. 166(12):7128-35, 2001

- Lonnemann G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA: Interleukin-18, interleukin-18 binding protein and impaired production of interferon-gamma in chronic renal failure. Clin Nephrol 60(5):327-34, 2003

- Manukyan M, Triantafilou K, Triantafilou M, Mackie A, Nilsen N, Espevik T, Wiesmüller KH, Ulmer AJ, Heine H: Binding of lipopeptide to CD 14 induces physical proximity of CD 14, TLR 2 and TLR 1. Eur J Immunol. 35(3):911-21, 2005

- Mantovani A, Locati M, Polentarutti N, Vecchi A, Garlanda C: Extracellular and intracellular decoys in the tuning of inflammatory cytokines and Toll-like Receptors: the new entry TIR8/SIGIRR. J Leukoc Biol 75:738-742, 2004

- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA Jr.: MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. Mol Cell. 2(2):253-8, 1998

- Meylan E, Tschopp J, Karin M: Intracellular pattern recognition receptors in the host response. Nature 442: 39-44, 2006

- Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Butler S, Witztum JL: Toll-like Receptor 4-Dependent and Independent Cytokine Secretion Induced by Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein in Macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 25(6): 1213-9 [Epub ahead of print]

- Miyake, K.: Innate recognition of lipopolysaccharide by CD 14 and toll-like receptor4-MD-2: unique roles for MD-2. Int Immunopharmacol 31,19-28, 2000

- Nassar GM, Ayus JC: Infectious complications of old non-functioning arteriovenous grafts in renal transplant recipients:a case series. Am J Kidney Dis. 40(4): 832-6, 2002

- Neuman MG, Benhamou JP, Malkiewicz IM, Akremi R, Shear NH, Asselah T, Ibrahim A, Boyer N, Martinot-Peignoux M, Jacobson-Brown P, Katz GG, Le Breton V, Le Guludec G, Suneja A, Marcellin P: Cytokines as predictors for sustained response and as markers for immunomodulation in patients with chronic hepatitis C. Clin Biochem 34(3):173-82, 2001

- Nockher WA, Scherberich JE: Monocyte cell-surface CD14 expression and soluble CD14 antigen in hemodialysis: evidence for chronic exposure to LPS. Kidney Int. 48(5):1469-76, 1995

- Nockher WA, Scherberich JE: Expression and release of the monocyte lipopolysaccharide receptor antigen CD14 are suppressed by glucocorticoids in vivo and in vitro. J Immunol. 158(3):1345-52, 1997

- Nockher WA, Scherberich JE: Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. Infect Immun. 66(6):2782-90, 1998

- Ochoa MT, Legaspi AJ, Hatziris Z, Godowski PJ, Modlin RL, Sieling PA: Distribution of Toll-like receptor 1 and Toll-like receptor 2 in human lymphoid tissue. Immunology. 108(1):10-5, 2003

- Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H: Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. J Immunol. 164(2):558-61, 2000

- Okamoto H, Mizuno K, Horio T: Circulating CD 14+ CD 16+ Monocytes are expanded in Sarcoidosis Patients. J Dermatol., 30(7):503-9, 2003

- O' Neill LA, KA Fitzgerald: The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. Trends Immunol 24(6):286-90, 2003

- O' Neill LA, A Dunne: Mal and MyD88: adaptor proteins involved in signal transduction by Toll-like receptors. J Endotoxin Res 9 (1):55-9, 2003

- Palmer SM, Burch LH, Mir S, Smith SR, Kuo PC, Herczyk WF, Reinsmoen NL, Schwartz DA: Donor polymorphisms in Toll-Like receptor4 influence the development of rejection after renal transplantation. Clin Transplant 20(1):30-6, 2006

- Pedroso S, Martins L, Fonseca I, Dias L, Henriques AC, Sarmento AM, Cabrita A: Impact of hepatitis C virus on renal transplantation: association with poor survival. Transplant Proc. 38(6):1890-4, 2006

- Perrin-Cocon L, Agaugué S, Diaz O, Vanbervliet B, Dollet S, Guironnet-Paquet A, André P, Lotteau V: Th1 disabled function in response to TLR4 stimulation of monocyte-derived DC from patients chronically-infected by hepatitis C virus. PLoS ONE. 3(5):e2260, 2008

- Poltorak A, P Ricciardi-Castagnoli, S Citterio and B Beutler: Physical contact Betwehen lipopolysaccharide and Toll-like Rezeptor 4 revealed by Genetik complementation. Proc Natl. Acad Sci USA 97(5):2163-7, 2000

- Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo: Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). J Exp Med. 1999 Feb 15,189(4):615-25. Erratum in: J Exp Med 189(9):following 1518, 1999

- Re F, Strominger JL: Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR 4 differentially activate human dendritic cells. J Biol Chem. 276(40):37692-9, Epub 2001

- Ridker PM: On Evolutionary Biology, Inflammation, Infection, and the Causes of Atherosclerosis. AHA Circulation (105): 2-4, 2002

- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N: C-reactive protein and other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women. N Engl J Med 342 (12):836-43, 2000

- Rowland TL, McHugh SM, Deighton J, Dearman RJ, Ewan PW, Kimber I: Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. Immunopharmacology. 40(1):11-20, 1998

- Rozkova D, Horvath R, Bartunkova J, Spisek R: Glucocorticoids severly impair differentiaton and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. Clin Immunol. 120(3):260-71, Epub 2006

- Sabroe I, Parker LC, Dower SK, Whyte MK: The role of TLR activation in inflammation. J Pathol. 214(2):126-35, 2008

- Sanchez-Torres C, Garcia-Romo GS, Cornejo-Cortes MA, Rivas-Carvalho A, Sanchez-Schmitz G: CD 16(+) and CD 16(-) human blood monoytes subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD 4 (+) T cells. Int Immunol 13:1571-1581, 2001

- Sarnak MJ, Coronado BE, Greene T, Wang SR, Kusek JW, Beck GJ, Levey AS: Cardiovascular disease risk factors in chronic renal insufficiency. Clin Nephrol 57(5):327-35, 2002

- Sato K, Ishikawa T, Okumura A, Yamauchi T, Sato S, Ayada M, Matsumoto E, Hotta N, Oohashi T, Fukuzawa Y, Kakumu S: Expression of Toll-like receptors in chronic hepatitis C virus infection. J Gastroenterol Hepatol. 22(10):1627-32, 2007

- 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

- Scherberich JE, Nockher WA, Baer PC: Cross-talk between activated tubular epithelia of human kidney and monocytes: a basis for target cell-specific pharmacotherapy? Nephrol Dial Transplant 14 (Suppl.), 8-10, 1999

- Scherberich, J.E.: Proinflammatory blood monocytes: main effector and target cells in systemic and renal disease - Background and therapeutic implications. Int J Clin Pharmacol Ther. 41(10):459-64, 2003

- Scherberich JE: Mayor changes of monocyte surface antigens in early chronic renal failure are not or only partly corrected by dialysis treatment of uremia (abstr) Nephrol Dialysis Transplant 18 Suppl 4, p 200, 2003

- Scherberich JE, Nockher W: Impaired basal expression of LPS-induced upregulation of the monocyte LPS receptor CD14 in hemodialysis patients (abstr). Nephrol Dial Transplant 18 Suppl 4, p 452, 2003

- Scherberich JE, Estner H, Segerer W: Impact of different immunosuppressive regimens on antigen-presenting blood cells in kidney transplant patients. Kidney & Blood Press Res 27, 177-180, 2004

- Scherberich JE, Rosskopf S, Estner H, Farmaciotis A, Segerer W, Strack T, Hofmann WE, Guder W: Association between activated blood monocyte subsets and pattern of proteinuria in kidney transplant patients (abstr.) Kidney & Blood Press Res 27, 325-326, 2004

- Scherberich JE, Kellermeyer M, Hartinger A: Effect of alpha-Calcidol on major monocyte antigens and toll- like receptors TLR2 and TLR4. Eur J Med Res 10, 179-182, 2005

- Scherberich JE, Kellermeyer M, Hartinger A: Recombinant human Erythropoietin (rHuEPO): Evidence of an immunomodulatory and antiinflammatory effect on peripheral blood monocytes. J Clin Pharmacol Ther, 2006

- Scherberich JE: Toll-like-receptor signalling influence the severity of urinary tract infection. (Abstr.) Sympos. Band p 45 (2006), Internat. Symposium. Urinary Tract Infection Weimar 22-24.06.2006; http://www.conventus.de/uti; 2006

- Scherberich JE, Kellermeyer M, Hartinger A: Calcitriol and 1-alpha-Calcidol modulate monocyte CD14, CD16, HLA-DR and toll-like-receptors 2 and 4 (TLR2,TLR4) (abstr.), Nephrol Dial Transplant 21 (Suppl. 4) iv312 (MMP044), 2006

- Scherberich JE, Hartinger A: Impact of toll-like receptor signalling on urinary tract infection. Int J Antimicrob Agents 31 Suppl 1:S9-14, 2008

- Scherberich JE: Die Bedeutung von Toll-like-Rezeptoren bei Harnwegsinfekten. Nieren.u Hochdruckkrankh., 37(1): 9-17, 2008

- Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, Lackner KJ, Iz M, Meyer J, Darius H, Rupprecht HJ: CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. Thromb Haemost., 92(2):419-424, 2004

- Schroeder NW, Opitz B, Lamping N, Michelsen KS, Zahringer U, Gobel UB, Schumann RR: Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD 14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by Treponema glycolipids. J Immunol. 165(5):2683-93, 2000

- Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, Xia Y, Satriano J, Wilson CB, Blantz RC: Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. J Clin Invest.100(2):439-48, 1997

- Schwarz K, T Storni: Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. Eur J Immunol 33 (6):1465-70, 2003

- Sester U, Sester M, Heine G, Kaul H, Girndt M, Kohler H: Strong depletion of CD 14(+)CD16(+) monocytes during haemodialysis treatment. Nephrol Dial Transplant 16:1402-1408, 2001

- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M: MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J Exp Med. 189(11):1777-82, 1999

- Shlipak MG, Fried LF, Cushman M, Manolio TA, Peterson D, Stehman-Breen C, Bleyer A, Newman A, Siscovick D, Psaty B: Cardiovascular mortality risk in chronic kidney disease: comparison of traditional and novel risk factors. JAMA 293(14):1737-45. 2005

- Silverstein, R. and D.C. Johnson: Endogenous versus exogenous glucocorticoid responses to experimental bacterial sepsis. J Leukoc Biol 73 (4): 417-27, 2003

- Stetson DB, Medzhitov R: Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. Immunity 24(1):93-103, 2006

- Stoy N: Macrophage biology and pathobiology in the evolution of immune responses: a functional analysis. Pathobiology. 69(4):179-211, 2001

- Stuart LM, Lucas M, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hul: Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxine- driven myeloid dendritic cell maturation. J Immunol. 168(4):1627-35, 2002

- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. Immunity.11(4):443-51, 1999

- Toshchakov V, Jones B, Perera P, Thomas K, Cody J, Zhang S, Williams B, Major J, Hamilton T, Fenton M & Vogel S: TLR 4, but not TLR2, mediates IFN-β-induced STAT1α/β-dependent gene expression in macrophages. Nat Immunol. 3(4):392-8 , 2002

- Uematsu S, Akira S: Innate immune recognition of viral infection. Uirusu. 56(1):1-8, 2006

- Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R, Czura CJ, Fink MP, Tracey KJ: Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. Proc Natl Acad Sci USA 99(19):12351-6, Epub 2002

- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H: HSP 70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. J Biol Chem. 277(17):15107-12, Epub 2002

- Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, Singh-Jasuja H, Herter S, Ahmad-Nejad P, Kirschning CJ, Da Costa C, Rammensee HG, Wagner H, Schild H: The endoplasmatic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. J Biol Chem. 277(23):20847-53, Epub 2002

- Villacres MC, Literat O, DeGiacomo M, Du W, Frederick T, Kovacs A: Defective response to Toll-like receptor 3 and 4 ligands by activated monocytes in chronic hepatitis C virus infection. J Viral Hepat. 15(2):137-44, 2008

- Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, Kirkland TN: MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. J Biol Chem. 276(41):38044-51, Epub 2001

- Wagner C, Hänsch GM: Genetic deficiency of CD 16, the low-affinity receptor for immunoglobulin G, has no impact on the functional capacity of polymorphonuclear neutrophils. Eur J Clin Invest. 34:149-155, 2004

- Weiner LM, Li W, Holmes M, Catalano RB, Dovnarsky M, Padavic K, Alpaugh RK: Phase I trial of recombinant macrophage colony-stimulating factor and recombinant gamma-interferon: toxicity, monocytosis, and clinical effects. Cancer Res 54: 4084-90, 1994

- Weiss DS. Raupach B. Takeda K. Akira S. Zychlinsky A: Toll-like receptors are temporally involved in host defense. J Immunol 172(7):4463-4469, 2004

- Werling, D. and T. W. Jungi: TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. Vet Immunol Immunopathol 91(1):1-12, 2003

- Wörnle M, Banas B, Schmid H, Merkle M, Henger A, Kretzler M, Gröne HJ, Schlöndorff D: Expression des Toll-like Rezeptor 3 auf humanen Mesangialzellen und dessen Bedeutung für entzündliche Nierenerkrankungen. Abstract Nephrologisches Forum München, 2005

- Wu JM, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE, P. KR: A novel polymorphism of Fc gamma RIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. J. Clin. Invest. 100: 1059-1070, 1997.

- Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussouf S, Segal DM, Duff GW, Dower SK: Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. J Immunol. 165(12):7125-32, 2000

- Zarember KA, Godowski PJ: Tissue expression of human Toll-like recpetors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. J Immunol 168(2):554-61, 2002

- Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, Schraut W, Stelter F, Schutt C, Passlick B, Pforte A: The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. Eur J Immunol. 23(9):2053-8, 1993

- Ziegler-Heitbrock L: The CD14+CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. J Leukoc Biol. 81(3):584-92. 2007

- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe, S, Dalod M, Grau V, Hart D, Jung S, Leenen PJM, Liu YJ, Manz M, MacPherson G, Randolph G, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Steinman RM, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB: Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. In print 2009

- Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C: Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. Kidney Int. 55(2):648-58, 1999

Anhang

7.1

7.1. 4 HLA-DR CD16++

	Median	MW	SD	Max	Min
Normalpersonen (13)	2382,06	2583,87	941,38	5025,41	1618,02
Nierenkranke (19)	2007,86	1994,59	1102,07	3635,36	2,81
Nierentransplantierte (28)	1835,17	2336,76	1444,74	5725,49	12,41
Hämodialysierte (29)	2350,14	2315,10	867,77	4782,86	673,17

7.1. 5 TLR2 CD14++

	Median	MW	SD	Max	Min
Normalpersonen (13)	36,52	42,13	13,96	79,15	24,80
Nierenkranke (19)	34,91	44,82	32,04	143,30	16,85
Nierentransplantierte (28)	41,99	49,53	24,79	104,6	20,54
Hämodialysierte (29)	38,2	40,77	26	165,48	15

7.1. 6 TLR2 CD14+CD16+

	Median	MW	SD	Max	Min
Normalpersonen (13)	96,47	106,73	23,26	147,22	67,32
Nierenkranke (19)	88,17	111,46	83,59	404,97	42,36
Nierentransplantierte (28)	105,65	105,70	30,24	168,5	62,64
Hämodialysierte (29)	95,6	105,78	29,88	182,7	69,16

7.1.7 TLR2 CD14+CD16++

	Median	MW	SD	Max	Min
Normalpersonen (13)	64,65	69,34	17,36	104,60	32,20
Nierenkranke (19)	63,78	75,59	65,04	317,65	7,23
Nierentransplantierte (28)	68,23	73,10	20,64	134,56	35,55
Hämodialysierte (29)	77,74	83,19	22,35	129,80	49,58

7.1.8 TLR4 CD14++

	Median	MW	SD	Max	Min
Normalpersonen (13)	20,54	21,72	8,34	45,32	12,63
Nierenkranke (19)	19,81	21,78	8,17	42,17	7,91
Nierentransplantierte (28)	25,63	28,09	16,2	67,32	2,74
Hämodialysierte (29)	27,63	28,47	12,28	59,89	12,41

7.2

Total CD14 Expression	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Kunstgefäße (21)	446,57	417,92	88,52	307,81	609,76	1,000
Ciminoshunt (16)	454,81	416,08	111,86	352,27	798,63	

HLA-DR CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Kunstgefäße (21)	669,39	729,93	342,59	91,81	1298,02	0,797
Ciminoshunt (16)	637,02	637,08	225,15	245,82	1009,04	

HLA-DR CD 14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Kunstgefäße (21)	4814,2	5186,13	1660,55	835,36	6978,31	0,404
Ciminoshunt (16)	5507,39	5474,59	1297,67	3105,9	7635,06	

HLA-DR CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Kunstgefäße (21)	2149,06	2186,97	715,60	194,56	3684,73	0,195
Ciminoshunt (16)	2458,91	2480,45	725,04	982,17	3459,89	

TLR2 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Kunstgefäße (21)	35,79	34,6	18,56	15,4	100,9	0,705
Ciminoshunt (16)	42,31	32,8	34,45	14,99	165,48	

TLR2 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Kunstgefäße (21)	94,68	99,55	35,39	41,6	194,56	0,195
Ciminoshunt (16)	108,66	91,82	35,63	70,41	182,69	

TLR4 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Kunstgefäße (21)	32,3	21,1	25,21	11,55	100,9	0,208
Ciminoshunt (16)	32,63	30,1	14,11	12,41	59,89	

Mittelwert CD 1416 Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Kunstgefäße (21)	14,57	14,14	4,52	7,4	23,52	1,000
Ciminoshunt (16)	14,04	15,24	5,42	3,98	21,74	

Hämatokrit	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Kunstgefäße (21)	35,56	35,32	3,01	29,1	42,4	0,107
Ciminoshunt (16)	34,56	34,3	2,69	30,6	41	

EPO-Wochendosis	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Kunstgefäße (21)	4812,5	3500	3868,14	1000	16000	0,452
Ciminoshunt (16)	5055,55	6000	2530,37	500	90000	

7.3

Total CD14 Expression	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Nachtdialyse (13)	444,73	445,08	64,34	358,66	577,72	0,840
Tagesdialyse (13)	467,54	437,14	121,18	352,27	798,63	

HLA-DR CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Nachtdialyse (13)	611,61	655,25	217,42	210,02	938,98	0,650
Tagesdialyse (13)	642,24	667,14	240,46	245,82	1009,04	

HLA-DR CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Nachtdialyse (13)	4518,09	3959,64	2409,54	1394,86	9646,52	0,125
Tagesdialyse (13)	5546,42	5573,06	1131,12	3854,23	7635,06	

HLA-DR CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Nachtdialyse (13)	2138,11	2246,79	1019,04	673,17	4782,86	0,153
Tagesdialyse (13)	2518,92	2480,45	658,37	1382,37	3459,89	

TLR2 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Nachtdialyse (13)	38,87	38,54	9,27	25,95	56,74	0,113
Tagesdialyse (13)	31,99	31,62	9,28	14,99	45,73	

TLR2 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Nachtdialyse (13)	102,23	100	21,71	69,16	140,75	0,614
Tagesdialyse (13)	99,05	86,6	25,46	70,41	135,77	

TLR2 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Nachtdialyse (13)	79,12	77,74	18,57	57,25	121,88	0,511
Tagesdialyse (13)	85,82	72,99	25,48	49,58	129,8	

Mittelwert CD 1416 Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz
Nachtdialyse (13)	12,08	12,04	5,71	2,23	21,15	0,204
Tagesdialyse (13)	15,17	15,47	4,81	4,11	21,74	

CRP	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Nachtdialyse (6)	0,9	0,65	0,53	0,5	1,9	0,209
Tagesdialyse (13)	0,64	0,5	0,39	0,3	1,4	

Kreatinin	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Nachtdialyse (6)	8,61	8,2	3,03	5,5	12,82	0,744
Tagesdialyse (13)	9,36	7,83	2,92	6,32	15,26	

Hämoglobin	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p =
Nachtdialyse (9)	11,1	10,8	1,1	9,7	13,1	0,431
Tagesdialyse (13)	11,46	11,3	1,11	9,8	13,6	

Hämatokrit	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Nachtdialyse (9)	34,77	34	4,32	30	44	1,000
Tagesdialyse (13)	34,21	34,1	3,26	29,5	38,6	

Erythropoetin Wochendosis	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Nachtdialyse (11)	4454,54	3000	3165,87	500	12000	0,152
Tagesdialyse (13)	5055,55	6000	2530,37	500	9000	

7.4

7.4.2 Normalpersonen

	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
TLR4 CD14++ intrazellulär (13)	21,72	20,54	8,34	12,63	45,32	0,400
TLR4 CD14++ extrazellulär (19)	14,81	12,98	6,43	7,23	31,62	
TLR4 CD14+CD16+ intrazellulär (13)	18,78	15,26	11,89	6,74	53,76	0,100
TLR4 CD14+CD16+ extrazellulär (19)	23,22	23,08	5,43	14,66	32,78	

TLR4 CD16++ intrazellulär (13)	15,14	10,18	14,12	2,57	54,25	0,200
TLR4 CD16++ extrazellulär (19)	9,64	10,0	3,5	1,35	15,61	

7.4.5 Nierentransplantierte

	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
TLR4 CD14++ intrazellulär (28)	28,09	25,63	16,2	2,74	67,32	0,072
TLR4 CD14++ extrazellulär (26)	20,96	15,34	14,01	6,85	52,33	
TLR4 CD14+CD16+ intrazellulär (28)	27,40	23,99	18,32	1,6	73,65	0,08
TLR4 CD14+CD16+ extrazellulär (26)	33,02	29,56	13,59	8,58	62,08	
TLR4 CD16+ intrazellulär (28)	23,61	22,02	16,5	1,0	63,78	0,076
TLR4 CD16++ extrazellulär (26)	15,55	14,69	7,31	3,49	31,91	

7.5

7.5.1 Normalpersonen

TLR3 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Extrazellulär (5)	14,19	12,75	10,88	3,15	27,50	0,841
Intrazellulär (5)	17,76	19,11	4,88	9,22	21,38	

7.5.3 Hämodialysepatienten mit Hepatitis B

TLR3 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Extrazellulär (4)	21,04	21,85	7,0	12,08	28,39	0,114
Intrazellulär (4)	37,09	35,04	12,45	26,42	51,86	

7.5.4 Hämodialysepatienten mit Hepatitis C

TLR3 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Extrazellulär (4)	12,56	11,57	7,25	5,42	21,67	0,343
Intrazellulär (4)	23,47	19,34	14,65	11,86	43,32	

TLR3 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Extrazellulär (4)	31,08	31,11	17,95	12,52	49,58	0,886
Intrazellulär (4)	29,95	28,3	19,04	11,34	51,86	

TLR3 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Extrazellulär (4)	14,65	14,04	8,57	6,92	23,61	0,343
Intrazellulär (4)	31,58	33,32	19,21	10,55	49,14	

7.5.5 Hämodialysepatienten mit Hepatitis B und C

TLR3 CD14++	MW	Median	SD	Min	*Max*	*Zweiseitige Signifikanz p=*
Extrazellulär (2)	4,5	4,5	1,24	3,62	5,38	0,121
Intrazellulär (2)	18,75	18,75	10,18	11,55	25,95	

TLR3 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Extrazellulär (2)	13,56	13,56	7,37	8,35	18,77	0,667
Intrazellulär (2)	26,55	26,55	18,69	13,34	39,77	

TLR3 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Extrazellulär (2)	12,79	12,79	7,86	7,23	18,35	0,667
Intrazellulär (2)	28,76	28,76	20,05	14,59	42,94	

Totale CD14 Expression	MW	Median	SD	Min	Max
Normalpersonen (13)	458,43	453,16	59,06	378,55	577,72
HD (7)	300,83	310,59	46,49	237,14	368,47
HD und HBV (4)	421,18	429,09	41,49	365,17	461,38
HD und HCV (4)	432,03	389,29	179,48	264,16	685,39
HD und HBV und HCV (2)	407,06	407,06	20,70	392,42	421,7

HLA-DR CD14++CD16neg.	MW	Median	SD	Min	Max
Normalpersonen (13)	843,81	820,47	317,33	399,54	1526,14
HD (7)	333,55	342,89	103,60	140,75	453,16
HD und HBV (4)	448,0	360,37	318,79	165,48	905,8
HD und HCV (4)	480,14	493,84	232,47	228,76	704,14
HD und HBV und HCV (2)	287,48	287,48	294,62	79,15	495,81

HLA-DR CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max
Normalpersonen (13)	5689,43	5376,12	1356,13	3924,19	9181,01
HD (7)	3058,37	2864,38	838,15	2246,79	4782,86
HD und HBV (4)	3189,68	3726,29	1983,19	523,30	4782,86
HD und HCV (4)	3350,93	3455,75	1244,83	1980,96	4511,25
HD und HBV und HCV (2)	1487,48	1487,48	300,66	1274,88	1700,08

HLA-DR CD14+CD16++	MW	Median	SD	Min	Max
Normalpersonen (13)	2583,87	2382,06	941,38	1618,02	5025,41
HD (7)	1238,78	1144,44	388,31	697,83	1778,28
HD und HBV (4)	1452,07	1876,88	970,96	1,00	2053,53
HD und HCV (4)	1389,67	1297,78	438,36	982,17	1980,96
HD und HBV und HCV (2)	920,33	920,33	391,40	643,57	1197,09

Anteil der CD14+CD16+ Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max
Normalpersonen (13)	6,51	6,55	1,55	3,6	8,84
HD (7)	11,49	9,24	5,68	7,33	21,52
HD und HBV (4)	10,51	13,26	6,13	1,35	14,19
HD und HCV (4)	16,49	16,19	2,97	13,18	20,40
HD und HBV und HCV (2)	24,27	24,27	6,76	19,49	29,05

TLR3 extrazellulär CD14++CD16neg.	MW	Median	SD	Min	Max
HD (7)	8,98	7,5	3,44	6,1	15,54
HD und HBV (4)	8,58	8,66	0,6	7,84	9,14
HD und HCV (4)	12,56	11,57	7,25	5,42	21,67
HD und HBV und HCV (2)	4,5	4,5	1,24	3,62	5,38

TLR3 extrazellulär CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max
HD (7)	23,65	23,71	5,25	13,1	29,43
HD und HBV (4)	21,04	21,85	7,0	12,08	28,39
HD und HCV (4)	31,08	31,11	17,95	12,52	49,58
HD und HBV und HCV (2)	13,56	13,56	7,37	8,35	18,77

TLR3 extrazellulär CD16++	MW	Median	SD	Min	Max
HD (7)	9,04	8,24	3,03	5,09	13,95
HD und HBV (4)	8,96	8,94	7,3	2,29	15,68
HD und HCV (4)	14,65	14,04	8,57	6,92	23,61
HD und HBV und HCV (2)	12,79	12,79	7,86	7,23	18,35

TLR3 intrazellulär CD14++CD16neg.	MW	Median	SD	Min	Max
HD (7)	16,17	17,15	2,44	12,86	19,28
HD und HBV (4)	29,52	26,73	9,63	21,67	42,94
HD und HCV (4)	23,47	19,34	14,65	11,86	43,32
HD und HBV und HCV (2)	18,75	18,75	10,18	11,55	25,95

TLR3 intrazellulär CD 14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max
HD (7)	18,03	18,77	3,13	11,76	20,91
HD und HBV (4)	37,09	35,04	12,45	26,42	51,86
HD und HCV (4)	29,95	28,3	19,04	11,34	51,86
HD und HBV und HCV (2)	26,55	26,55	18,69	13,34	39,77

TLR3 intrazellulär CD16++	MW	Median	SD	Min	Max
HD (7)	18,65	20,54	4,61	10,94	23,5
HD und HBV (4)	30,67	27,03	13,52	18,60	50,03
HD und HCV (4)	31,58	33,32	19,21	10,55	49,14
HD und HBV und HCV (2)	28,76	28,76	20,05	14,59	42,94

7.6

Totale CD14 Expression	MW	Median	SD	Min	Max
Gesunde (13)	458,44	453,16	59,06	378,55	577,72
Patienten mit Glukokortikoidtherapie (8)	361,13	337,65	87,44	248,05	478,29
Patienten ohne Glukokortikoidtherapie (13)	452,96	365,17	212,68	257,13	1064,99
Hämodialysepatienten (29)	450,29	433,23	92,21	352,27	798,63

HLA-DR CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max
Gesunde (13)	5689,43	5376,12	1356,13	3924,19	9181,01
Patienten mit Glukokortikoidtherapie (8)	3723,45	3822,94	1779,21	1333,52	6671,43
Patienten ohne Glukokortikoidtherapie (13)	4520,41	4782,86	2455,33	784,39	8353,63
Hämodialysepatienten (29)	5063,91	5186,13	1908,16	1394,86	9646,62

HLA-DR CD16++	MW	Median	SD	Min	Max
Gesunde (13)	2583,87	2382,06	941,38	1618,02	5025,41
Patienten mit Steroidtherapie (8)	1706,91	1670,69	1150,34	385,42	3491,15
Patienten ohne Steroidtherapie (13)	2124,68	2246,79	1064,09	2,81	3522,69
Hämodialysepatienten (29)	2315,1	2350,14	867,77	673,17	4782,86

TLR2 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max
Gesunde (13)	42,13	36,52	13,96	24,8	79,15
Patienten mit Steroidtherapie (8)	35,02	31,05	14,80	18,77	64,36
Patienten ohne Steroidtherapie (13)	49,44	37,86	36,57	16,85	143,3
Hämodialysepatienten (29)	40,77	38,2	25,99	14,99	165,48

TLR2 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max
Gesunde (13)	106,73	96,47	23,26	67,32	147,22
Patienten mit Steroidtherapie (8)	87,33	88,17	40,53	49,58	173,87
Patienten ohne Steroidtherapie (13)	120,80	97,34	96,15	42,36	404,97
Hämodialysepatienten (29)	105,77	95,6	29,88	69,16	182,69

TLR4 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max
Gesunde (13)	21,72	20,54	8,34	12,63	45,32
Patienten mit Steroidtherapie (8)	19,8	18,62	4,90	15,82	30,51
Patienten ohne Steroidtherapie (13)	24,31	20,91	8,95	12,52	42,17
Hämodialysepatienten (29)	28,47	27,63	12,27	12,41	59,89

7.7

7.7.1 Grundgesamtheit

Totale CD14 Expression	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP < 0,5 (58)	418,01	399,54	99,63	257,13	791,48	0,521
CRP > 1,0 (22)	403,44	383,79	113,95	226,71	798,63	

HLA-DR CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP < 0,5 (58)	649,07	601,59	289,8	89,77	1526,14	0,144
CRP > 1,0 (22)	556,45	575,13	285,9	130,97	1498,93	

HLA-DR CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP < 0,5 (58)	4709,89	4914,46	1999,64	685,39	9646,62	0,202
CRP > 1,0 (22)	4168,43	3718,03	1901,25	784,39	7986,27	

HLA-DR CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP < 0,5 (58)	2583,2	2318,67	1496,15	12,41	8737,88	0,141
CRP > 1,0 (22)	1987,42	1976,63	894,11	2,81	3635,36	

TLR2 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP < 0,5 (58)	45,85	38,89	25,74	16,85	165,48	0,064
CRP > 1,0 (22)	35,36	32,64	15,06	14,99	80,58	

TLR2 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP < 0,5 (58)	71,64	69,0	23,16	21,10	134,56	0,521
CRP > 1,0 (22)	68,14	63,93	26,08	7,23	122,98	

TLR4 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP < 0,5 (58)	25,34	20,44	13,61	7,57	67,32	0,316
CRP > 1,0 (22)	27,65	23,71	12,89	8,74	57,25	

TLR 4 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP < 0,5 (58)	25,52	18,90	19,30	5,33	108,43	0,655
CRP > 1,0 (22)	28,42	21,45	24,34	4,61	112,4	

TLR4 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP < 0,5 (58)	23,46	18,81	21,18	1,75	119,71	0,755
CRP > 1,0 (22)	26,15	14,30	32,10	1,00	118,64	

Mittelwert CD 1416 Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP < 0,5 (58)	10,62	7,71	6,43	2,4	29,11	0,131
CRP > 1,0 (22)	11,89	10,20	5,08	4,13	22,18	

7.7.2 Hämodialysepatienten

Totale CD14 Expression	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (18)	441,23	416,08	103,20	352,27	798,63	0,633
CRP>1,0 (8)	462,40	427,46	139,53	368,47	798,63	

HLA-DR CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (18)	605,13	596,43	240,94	245,82	1009,04	0,897
CRP>1,0 (8)	601,62	597,61	211,99	210,02	922,24	

HLA-DR CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (18)	5403,23	5438,56	2187,2	1928,22	9646,62	0,515
CRP>1,0 (8)	4637,71	4858,85	1823,35	1539,93	7635,06	

HLA-DR CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (18)	2497,0	2438,29	1142,93	982,17	4782,86	0,515
CRP>1,0 (8)	2073,09	2363,62	887,2	673,17	3428,91	

TLR2 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (18)	47,47	33,98	41,85	24,14	165,48	0,460
CRP>1,0 (8)	33,99	31,21	12,74	14,99	56,74	

TLR2 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (18)	110,5	96,74	31,91	79,86	182,69	0,408
CRP>1,0 (8)	104,25	92,39	34,76	74,99	174,66	

TLR2 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (18)	89,1	89,26	22,97	56,74	129,8	0,573
CRP>1,0 (8)	83,60	79,16	22,09	61,53	122,98	

TLR4 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (18)	28,71	29,43	14,4	12,41	59,89	0,573
CRP>1,0 (8)	32,66	26,83	13,82	18,77	57,25	

TLR4 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (18)	39,43	36,38	27,02	15,54	108,43	0,762
CRP>1,0 (8)	41,36	26,9	35,48	10,65	112,40	

TLR4 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (18)	44,58	40,32	31,05	18,68	119,71	0,696
CRP>1,0 (8)	47,49	31,17	46,53	3,00	118,64	

Mittelwert CD 1416 Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (18)	13,16	15,08	6,94	3,98	21,74	0,460
CRP>1,0 (8)	15,37	15,80	4,44	8,43	21,15	

Kreatinin in mg/dl	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (10)	7,59	7,64	4,29	0,94	14,64	0,669
CRP>1,0 (7)	8,54	8,36	1,59	5,92	10,31	

7.7.3 chronisch Niereninsuffiziente

Totale CD14 Expression	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (14)	371,09	339,82	95,56	257,13	542,47	0,524
CRP>1,0 (8)	385,75	365,17	104,33	266,55	552,32	

HLA-DR CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (14)	521,06	432,76	304,76	145,9	1000,0	0,724
CRP>1,0 (8)	436,58	449,1	213,9	130,97	667,14	

HLA-DR CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (14)	3753,35	4023,69	2452,58	889,65	7566,7	0,943
CRP>1,0 (8)	3870,85	3718,03	2687,97	784,39	7498,94	

HLA-DR CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (14)	2419,66	2393,18	1338,98	425,51	4491,01	0,435
CRP>1,0 (8)	1987,94	2287,57	1318,40	2,81	3635,36	

TLR2 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (14)	29,93	26,45	12,55	16,85	55,73	0,943
CRP>1,0 (8)	30,23	25,48	13,26	16,85	50,48	

TLR2 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (14)	74,99	73,78	27,46	42,36	127,49	0,943
CRP>1,0 (8)	77,55	64,94	31,21	46,98	122,98	

TLR2 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (14)	51,24	52,59	16,98	21,1	77,04	0,833
CRP>1,0 (8)	52,09	57,77	32,51	7,23	86,21	

TLR4 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (14)	18,02	18,02	5,67	11,44	29,69	0,354
CRP>1,0 (8)	24,29	18,77	10,49	17,15	42,17	

TLR4 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (14)	16,12	12,52	8,77	9,22	34,6	0,093
CRP>1,0 (8)	23,15	18,02	11,41	13,58	40,32	

TLR4 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (14)	12,55	7,86	10,44	5,05	35,87	0,222
CRP>1,0 (8)	13,51	10,51	6,27	8,2	23,93	

Mittelwert CD1416 Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (13)	11,95	11,88	6,12	3,3	19,05	0,343
CRP>1,0 (8)	8,6	7,37	3,65	4,13	13,79	

Kreatinin in mg/dl	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (14)	4,78	4,87	2,54	1,42	8,8	0,943
CRP>1,0 (8)	5,06	4,62	2,61	1,78	8,5	

7.7.4 Nierentransplantierte

Totale CD14 Expression	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (21)	396,86	381,97	97,06	296,93	685,39	0,569
CRP>1,0 (5)	353,82	349,12	89,89	226,71	478,29	

HLA-DR CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (21)	4584,12	4826,07	1786,19	1280,62	7498,94	0,121
CRP>1,0 (5)	3128,1	3205,23	325,79	2738,42	3459,89	

HLA-DR CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (21)	2517,35	2016,91	1591,10	12,41	5725,49	0,278
CRP>1,0 (5)	1691,51	1345,57	827,52	1094,11	3105,9	

TLR4 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (21)	30,62	28,9	16,74	7,57	67,32	0,278
CRP>1,0 (5)	21,93	23,08	13,11	8,74	42,17	

TLR4 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (21)	30,06	26,69	19,43	6,49	73,65	0,224
CRP>1,0 (5)	19,47	20,44	14,2	4,61	40,86	

TLR4 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (21)	25,90	23,71	17,73	2,93	63,78	0,200
CRP>1,0 (5)	14,67	13,95	10,92	1,0	30,23	

Mittelwert CD1416 Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (21)	11,76	9,63	7,43	3,03	29,11	0,659
CRP>1,0 (5)	8,5	9,7	2,02	5,66	10,32	

Kreatinin in mg/dl	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
CRP <0,5 (21)	1,76	1,64	0,73	0,85	3,55	0,121
CRP>1,0 (5)	2,40	2,58	0,90	1,36	3,47	

7.8

7.8.1 Grundgesamtheit

Totale CD14 Expression	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (22)	422,29	378,56	168,43	257,13	1064,99	0,764
Kreatinin >3 mg/dl (20)	410,83	366,82	106,05	254,83	637,8	

HLA-DR CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (22)	610,52	549,16	283,6	214,8	1274,88	0,824
Kreatinin >3 mg/dl (20)	612,13	567,51	291,07	130,97	1186,37	

HLA-DR CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (22)	4770,2	4959,87	1983,21	1730,94	8353,63	0,958
Kreatinin >3 mg/dl (20)	4772,40	5003,07	1978,36	784,39	7566,7	

HLA-DR CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (22)	2544,78	2063,58	1358,26	763,51	5725,49	0,565
Kreatinin >3 mg/dl (20)	2359,77	2363,62	1130,07	2,81	4826,07	

TLR2 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (22)	47,59	39,97	29,58	16,85	143,30	0,834
Kreatinin >3 mg/dl (20)	40,4	38,37	19,65	14,99	102,74	

TLR2 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (22)	110,7	97,82	72,55	42,36	404,97	0,418
Kreatinin >3 mg/dl (20)	104,83	104,87	38,43	37,86	204,43	

TLR2 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (22)	78,4	64,39	58,73	21,1	317,65	0,129
Kreatinin >3 mg/dl (20)	78,78	79,16	31,75	7,23	129,8	

TLR4 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (22)	28,81	25,75	15,53	7,57	67,32	0,814
Kreatinin >3 mg/dl (20)	29,21	28,64	12,47	2,74	59,89	

TLR4 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (22)	27,14	23,61	17,5	6,49	73,65	0,601
Kreatinin >3 mg/dl (20)	30,98	22,98	22,37	1,6	108,43	

TLR4 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (22)	22,47	20,6	15,59	2,93	63,78	0,865
Kreatinin >3 mg/dl (20)	27,51	17,74	27,57	1,0	119,71	

Mittelwert CD1416 Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (22)	9,92	7,55	5,66	3,2	20,59	0,427
Kreatinin >3 mg/dl (20)	11,24	11,06	5,43	3,66	22,14	

7.8.2 Chronisch Niereninsuffiziente

Totale CD14 Expression	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (6)	498,64	427,94	288,94	257,13	1064,99	1,000
Kreatinin >3 mg/dl (8)	437,32	407,13	105,1	330,77	572,55	

HLA-DR CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (6)	580,57	491,45	301,0	339,82	1144,44	0,491
Kreatinin >3 mg/dl (8)	704,09	601,64	359,7	218,7	1186,37	

HLA-DR CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (6)	5218,11	5193,77	2569,97	1730,94	8353,63	0,950
Kreatinin >3 mg/dl (8)	5079,9	5003,07	1952,54	1439,47	7566,7	

HLA-DR CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (6)	2280,47	2262,8	1117,09	1069,79	3635,36	0,662
Kreatinin >3 mg/dl (8)	2749,28	2777,89	1185,98	873,79	4826,07	

TLR2 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (6)	48,99	30,23	47,60	16,85	143,3	0,491
Kreatinin >3 mg/dl (8)	48,13	43,06	26,18	19,63	102,74	

TLR2 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (6)	132,52	85,03	137,29	42,36	404,97	0,662
Kreatinin >3 mg/dl (8)	110,78	109,33	48,65	37,86	204,43	

TLR2 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (6)	95,69	54,51	110,86	21,10	317,65	0,491
Kreatinin >3 mg/dl (8)	71,31	69,16	24,93	26,66	109,41	

TLR4 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (6)	22,09	20,26	8,01	12,52	35,23	0,662
Kreatinin >3 mg/dl (8)	24,58	22,63	7,56	14,99	34,29	

TLR4 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (6)	18,64	16,71	7,96	9,82	31,48	0,662
Kreatinin >3 mg/dl (8)	19,88	20,45	4,41	14,07	27,38	

TLR4 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (6)	13,67	13,7	6,66	5,35	22,27	0,662
Kreatinin >3 mg/dl (8)	14,44	15,2	3,99	8,43	20,54	

Mittelwert CD1416 Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (6)	9,07	6,54	5,38	5,05	18,81	0,836
Kreatinin >3 mg/dl (7)	9,27	8,28	4,54	3,66	14,85	

CRP in mg/dl	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (6)	0,75	0,75	0,25	0,5	1,1	0,755
Kreatinin >3 mg/dl (8)	0,66	0,6	0,17	0,4	0,9	

7.8.3 Nierentransplantierte

Totale CD14 Expression	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (16)	393,65	370,16	93,17	307,81	685,39	0,064
Kreatinin >3 mg/dl (3)	300,29	296,93	47,23	254,83	349,12	

HLA-DR CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (16)	621,76	598,91	286,19	214,8	1274,88	0,793
Kreatinin >3 mg/dl (3)	551,21	557,31	30,02	518,61	577,72	

HLA-DR CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (16)	4602,23	4959,87	1787,3	2100,22	7498,94	0,559
Kreatinin >3 mg/dl (3)	3686,05	3459,89	878,51	2942,73	4655,53	

HLA-DR CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (16)	2643,9	2055,25	1458,91	763,51	5725,49	0,211
Kreatinin >3 mg/dl (3)	1745,73	1094,11	1153,95	1064,99	3078,09	

TLR2 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (16)	47,06	41,99	21,65	20,54	96,47	0,171
Kreatinin >3 mg/dl (3)	29,96	26,18	7,77	24,8	38,89	

TLR2 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (16)	102,52	97,82	28,69	62,64	168,49	0,421
Kreatinin >3 mg/dl (3)	90,48	74,32	34,23	67,32	129,8	

TLR2 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (16)	71,92	67,32	23,82	35,55	134,56	0,875
Kreatinin >3 mg/dl (3)	72,88	66,71	28,21	48,26	103,66	

TLR4 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (16)	31,33	31,39	17,07	7,57	67,32	0,303
Kreatinin >3 mg/dl (3)	19,26	23,71	14,81	2,74	31,34	

TLR4 CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (16)	30,32	25,2	19,18	6,49	73,65	0,359
Kreatinin >3 mg/dl (3)	17,06	22,88	13,52	1,6	26,69	

TLR4 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (16)	25,77	23,8	16,82	2,93	63,78	0,211
Kreatinin >3 mg/dl (3)	12,96	18,94	10,36	1,0	18,94	

Mittelwert CD1416 Monozyten	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (16)	10,24	7,69	5,9	3,2	20,59	0,109
Kreatinin >3 mg/dl (3)	15,11	12,88	6,22	10,32	22,14	

CRP in mg/dl	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Kreatinin 1,3-2,99 mg/dl (16)	0,48	0,3	0,35	0,3	1,4	0,421
Kreatinin >3 mg/dl (3)	0,73	0,9	0,38	0,3	1,0	

7.9

HLA-DR CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max
Hämodialysepatienten (29)	5063,91	5186,13	1908,16	1394,86	9646,62
Nierentransplantierte und nach Abstoßung wieder Dialysierte (6)	3675,01	3640,14	751,86	2617,99	4531,58
Nierentransplantierte (28)	4300,93	3928,16	1641,68	1280,62	7498,94

TLR2 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max
Hämodialysepatienten (29)	40,77	38,2	25,99	14,99	165,48
Nierentransplantierte und nach Abstoßung wieder Dialysierte (6)	40,03	28,89	23,37	20,54	70,41
Nierentransplantierte (28)	49,53	41,99	24,79	20,54	104,6

Mittelwert CD1416 Zellen	MW	Median	SD	Min	Max
Hämodialysepatienten (29)	13,16	14,69	5,54	2,23	21,74
Nierentransplantierte und nach Abstoßung wieder Dialysierte (6)	13,86	14,47	6,25	4,89	20,98
Nierentransplantierte (28)	10,88	8,72	6,71	3,03	29,11

HLA-DR CD14++CD16neg.	MW	Median	SD	Min	Max
Hämodialysepatienten (29)	625,63	655,25	218,13	210,02	1009,04
Nierentransplantierte und nach Abstoßung wieder Dialysierte (6)	384,58	336,03	228,30	184,34	798,63
Nierentransplantierte (28)	607,33	577,72	246,61	214,80	1274,88

HLA-DR CD14+CD16++	MW	Median	SD	Min	Max
Hämodialysepatienten (29)	2315,10	2350,14	867,77	673,17	4782,86
Nierentransplantierte und nach Abstoßung wieder Dialysierte (6)	1565,80	1589,19	390,24	905,80	2109,69
Nierentransplantierte (28)	2336,76	1835,17	1444,74	12,41	5725,49

TLR4 intrazellulär CD14++CD16neg.	MW	Median	SD	Min	Max
Hämodialysepatienten (29)	28,47	27,63	12,27	12,41	59,89
Nierentransplantierte und nach Abstoßung wieder Dialysierte (6)	16,17	11,73	9,83	7,91	29,43
Nierentransplantierte (28)	28,09	25,63	16,20	2,74	67,32

7.12

HLA-DR CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Vor HD (5)	814,84	820,47	481,8	339,82	1512,47	0,068
Nach HD (5)	367,78	358,66	136,12	162,53	518,61	

HLA-DR CD14+CD16+	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Vor HD (5)	5063,36	5232,99	1597,82	2750,76	6792,53	0,80
Nach HD (5)	4395,28	4255,07	1703,15	2713,90	6493,82	

HLA-DR CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Vor HD (5)	1870,99	1610,76	850,34	930,57	2813,32	0,893
Nach HD (5)	2029,78	2196,83	526,08	1394,86	2617,99	

TLR2 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Vor HD (5)	44,34	44,11	19,36	23,08	66,71	0,225
Nach HD (5)	30,16	27,14	7,21	22,67	38,2	

TLR2 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Vor HD (5)	65,44	77,04	36,22	20,54	107,95	0,686
Nach HD (5)	71,66	54,25	40,71	34,6	133,95	

TLR4 CD14++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Vor HD (5)	43,78	26,66	31,82	23,93	98,22	0,50
Nach HD (5)	58,94	43,71	49,79	14,99	139,49	

TLR4 CD16++	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Vor HD (5)	14,37	5,0	17,68	3,05	44,91	0,345
Nach HD (5)	23,83	10,5	31,99	1,82	79,86	

Totale CD14 Expression	MW	Median	SD	Min	Max	Zweiseitige Signifikanz p=
Vor HD (5)	536,17	593,52	89,13	425,51	609,76	0,50
Nach HD (5)	475,68	486,97	89,88	371,80	598,89	

Lebenslauf

Stefan Beeck

Geburtsdatum: 09.03.1980
Geburtsort: Konstanz
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulausbildung

Sept. 1986 – Juli 1998	Europäische Schule München (ESM)
1986 - 1991	Grundschule der ESM
1991 - 1998	Gymnasium der ESM
Juli 1998	Europäische Reifeprüfung (Abitur)

Wehrersatzdienst

Sept. 1998 – Okt. 1999	Zivildienst an der Blindeninstitutsstiftung München

Berufspraxis vor dem Studium

Jan. 2000 – Apr. 2000	Pflegekraft an der Blindeninstitutsstiftung München

Studium

SS 2000 – SS 2002	Studium der Humanmedizin (Vorklinik), Ludwig-Maximilians Universität München
WS 2002 – SS 2006	Studium der Humanmedizin (Klinik), Ludwig-Maximilians Universität München
Aug. 2002	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
Aug. 2003	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Aug 2005	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Nov. 2006	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Dez. 2006	Approbation als Arzt

Praktisches Jahr

Okt. 2005 – Dez. 2005	Chirurgie, Wellington Hospital, Wellington, Neuseeland
Dez. 2005 – Febr. 2006	Chirurgie, Krankenhaus München Schwabing
Febr. 2006 – Apr. 2006	Innere Medizin, Klinikum Ingolstadt
Apr. 2006 – Mai 2006	Innere Medizin, Yale New Haven Hospital, New Haven, USA
Mai 2006 – Sept. 2006	Radiologie, Universitätsspital Basel, Basel, Schweiz

Anstellungen

Seit Mai 2007	Clinical Research Associate, Klinische Forschung, MSD SHARP & DOHME GmbH

Promotion

Seit 2004	„Expression der Membranantigene CD14, CD16, HLA-DR sowie der Toll-Like-Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 auf Blutmonozyten von Patienten mit Nierenerkrankungen. Durchflusszytometrische Analysen bei Gesunden, Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, Dialysepatienten und Patienten nach Nierentransplantation“

Veröffentlichung/Vortrag

2008	"Impact of dialysis shunt management (native AV-fistula versus arteriovenous graft) on humoral and cellular markers of Inflammation including monocyte HLA-DR and TLR expression" Abstract A04-08/1152 für 41. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie (DAGKN).

Engagement

Juli 2004	Organisation einer Medikamentenspende an das Vaiola Hospital, Tonga
Juli 1998 – Mai 2002	Fußballtrainer in der Jugendabteilung beim SV Pullach
Juli 1997	Teilnahme am bilingualen internationalen Betriebswirtschaftlichem Fernplanspiel „Economic Summit“ des Bildungswerkes der bayerischen Wirtschaft e.V.

Sprachkenntnisse

Deutsch: Muttersprache
Englisch: Fließend in Wort und Schrift
Spanisch: Grundkenntnisse

EDV-Kenntnisse

Microsoft Office-Paket, SPSS, InForm 4.5 und CTMS