

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

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K.-W. Jauch

**Untersuchung des zytotoxischen Arsenals lymphozytärer
Subpopulationen nach massivem Verbrennungstrauma oder schwerer
Mehrfachverletzung**

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

Vorgelegt von
Daniel Johannes Noss
aus
Freiburg im Breisgau

2010

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Faist

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. K.-G. Kanz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. S. Zedler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,FACR,FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1. Einführung
- 1.2. Verlauf der systemischen Entzündungsantwort
- 1.3. Grundbegriffe der Immunologie
 - 1.3.1. Unspezifische Immunantwort
 - 1.3.1.1. Das Komplementsystem
 - 1.3.1.2. Phagozytäre Zellen
 - 1.3.1.3. Natürliche Killerzellen
 - 1.3.2. Spezifische Immunantwort
 - 1.3.2.1. T-Lymphozyten
 - 1.3.2.2. T-Helferzellen
 - 1.3.2.3. Zytotoxische T-Lymphozyten
 - 1.3.3. Untersuchte humane Zelloberflächenmoleküle
 - 1.3.4. Die Apoptose
 - 1.3.4.1. Rezeptor vermittelte Apoptose
 - 1.3.4.2. Perforin vermittelte Apoptose
 - 1.4. Fragestellung

2. Material und Methoden

- 2.1. Patientenauswahl
- 2.2. Einschlusskriterien
 - 2.2.1. Schwerbrandverletzung
 - 2.2.2. Polytrauma
- 2.3. Dokumentation und demographische Daten
- 2.4. Probenentnahme
- 2.5. Probenaufbereitung
- 2.5.1. Messung der intrazellulären Proteine Perforin und Granzym-B
- 2.5.2. Messung der Zelloberflächenantigene
- 2.6. Geräte und Materialien
 - 2.6.1. Geräte
 - 2.6.2. Puffer und Lösungen
 - 2.6.3. Verwendete Antikörper
 - 2.6.4. Multiparameter Durchflusszytometrie
- 2.7. Datenaquisition
- 2.8. Statistische Auswertung

3. Ergebnisse

- 3.1. Messungen zur Differenzierung von Lymphozytensubpopulationen
 - 3.1.1. CD4+ Lymphozyten
 - 3.1.2. CD8+ Lymphozyten
 - 3.1.3. Ratio CD4+/CD8+ Lymphozyten
 - 3.1.4. CD4+ CD8+ Lymphozyten
 - 3.1.5. CD56+ Lymphozyten
 - 3.1.6. CD4+ CD56+ Lymphozyten
 - 3.1.7. CD8+ CD56+ Lymphozyten
- 3.2. Intrazelluläre Messungen zur Bestimmung des zytotoxischen Arsenals verschiedener Lymphozytensubpopulationen

| | |
|--------|--|
| 3.2.1 | CD4+ Perforin-FITC+ Lymphozyten |
| 3.2.2 | CD4+ Perforin-PE+ Lymphozyten |
| 3.2.3 | CD4+ Granzym-B+ Lymphozyten |
| 3.2.4 | CD4+ Perforin+ Granzym-B+ Lymphozyten |
| 3.2.5 | CD8+ Perforin+ Lymphozyten |
| 3.2.6 | CD8+ Granzym-B+ Lymphozyten |
| 3.2.7 | CD4+ CD8+ Perforin+ Lymphozyten |
| 3.2.8 | CD4+ CD56+ Perforin+ Lymphozyten |
| 3.2.9 | CD56+ Perforin+ Lymphozyten |
| 3.2.10 | CD56+ Granzym-B+ Lymphozyten |
| 3.3 | Oberflächenantigen Differenzierung von Lymphozyten und Monozyten |
| 3.3.1 | CD3+ HLA-DR+ Lymphozyten |
| 3.3.2 | CD14+ HLA-DR+ Monozyten |
| 3.3.3 | CD14+ CD40+ Monozyten |
| 3.3.4 | CD14+ CD16+ Monozyten |

4. Diskussion

5. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

6. Literaturverzeichnis

7. Abkürzungen

8. Danksagung

9. Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 Einführung

Aktuellen Zahlen zufolge muss in Deutschland jährlich mit etwa 50.000 Brandverletzten, darunter etwa 600 Todesfällen, und etwa 500.000 Verkehrstoten, bei 10.000 Fällen mit letalem Ausgang, gerechnet (Statistisches Bundesamt 2006). Im klinischen Alltag können diese Traumata zu weitreichenden Komplikationen führen.

Ein schweres Trauma induziert zahlreiche immunologische Veränderungen, die sich klinisch häufig als septische Komplikationen manifestieren und über Organfunktionsstörungen zum Versagen einzelner oder mehrerer Organe (Multiorganversagen [MOV]) führen können. Das Ausmaß der Immunalterationen korreliert dabei mit der Qualität und dem Schweregrad der Verletzung (Faist et al., 1997). Immunkompetente Zellen reagieren auf ein schweres Trauma mit der Ausschüttung von Mediatoren. Initial werden insbesondere inflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α sezerniert. Dieses Stadium mit seiner klinischen Ausprägung entspricht dem „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS). Das SIRS ist laut Konsensus-Konferenz des „American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine“ (Bone et al., 1992), als eine systemische Entzündungsreaktion ohne Nachweis einer infektiösen Ursache definiert. Die Prävalenz des SIRS wird auf 33 % aller stationären und über 50 % der Intensivpatienten geschätzt (Brun-Buisson et al., 2000).

Eine Sepsis wird dagegen diagnostiziert, wenn eine mikrobiologisch nachgewiesene oder klinisch vermutete Infektion die Ursache einer systemischen Entzündungsreaktion darstellt. Während Ende der 60iger Jahre des vergangenen Jahrhunderts noch gramnegative Infektionen prädominant waren, änderte sich das Erregerspektrum in den letzten drei Dekaden zugunsten der grampositiven Erreger, die inzwischen für die Hälfte aller Sepsisfälle verantwortlich gemacht werden können (Bochud et al., 2001). In den USA werden jährlich ca. 750000 Fälle schwerer Sepsis registriert, davon über 210000 mit letalem Ausgang. Dies entspricht mit 175,9 Fällen pro 100000 Einwohner im Jahre 1987 einer höheren Inzidenzrate verglichen mit 73,6 Fällen pro 100000 Einwohnern im Jahre 1979 (Angus et al., 2001). In Deutschland erkranken jährlich ca. 154000 Patienten an einer Sepsis (Brunkhorst et al., 2006). Die Letalität der Sepsis ist auch heutzutage, trotz moderner Intensivmedizin und verbesserter antibiotischer Therapie, nahezu unverändert hoch (40-70%).

Die Symptome des „SIRS“ sind denen der „Sepsis“ identisch. Die Ursachen des „SIRS“ liegen demnach nicht in einer Erreger induzierten Reaktion, sondern vielmehr in einer endogenen Antwort auf äußere Reize, wie etwa schweren Traumata oder Verbrennungen und deren Folgen wie beispielsweise Hämorrhagie, Ischämie und schwere Gewebsschäden. Diese systemische Entzündungsantwort äußert sich klinisch unspezifisch in Form von Fieber, Tachykardie und Tachypnoe und kann von einer veränderten Leukozytenzahl begleitet sein (Abb. 1)

Das klinische Bild einer schweren Ganzkörperentzündung ist sehr variabel, und zeigt Verläufe der unkomplizierten „restitutio ad integrum“ bis zum irreversiblen Organversagen (MOV) mit letalem Ausgang.

Im Verlauf einer systemischen Entzündungsreaktion post Trauma steht dem SIRS eine gegenregulatorische und damit vorwiegend antiinflammatorische Immunantwort mit Sekretion von Mediatoren wie z.B. IL-10, „tumor growth factor“ (TGF)- β und IL-13 gegenüber. Dieser Mechanismus, als „compensatory antiinflammatory response syndrome (CARS)“, beschrieben, kann zur Immunsuppression und erhöhter Empfänglichkeit gegenüber Infektionen führen. Das CARS ist vielfach zeitlich nicht von einem SIRS abzugrenzen, so dass oftmals ein simultanes Auftreten beider Formen beobachtet werden kann. Für diese Situation ist der Begriff „mixed antiinflammatory response syndrome“ (MARS) geprägt worden (Bone et al., 1996).

In der Vergangenheit wurde dem SIRS ursächlich vor allem eine Hyperaktivität des angeborenen Immunsystems, sowie dem CARS eine Dysfunktion des adaptiven Immunsystems zugeschrieben. Nach gegenwärtigem Wissensstand ist jedoch eher von einer Interaktion von angeborenem und adaptivem Immunsystem, sowohl bei der Pathogenese des SIRS, als auch des CARS, auszugehen (Bone et al., 1996).

Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)

Ein SIRS ist durch mindestens zwei der nachfolgenden Symptome definiert

- Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz > 90 Schläge/min.
- Atemfrequenz $> 20/\text{min.}$ oder $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$ oder $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$
- Leukozytenzahl $> 12.000/\text{mm}^3$ oder $< 4.000/\text{mm}^3$ oder $> 10\%$ unreife L.

Sepsis

Eine Sepsis liegt vor, wenn eine mikrobiologisch nachgewiesene oder klinisch vermutete Infektion die Ursache eines SIRS ist.

Schwere Sepsis

Eine schwere Sepsis zeigt Zeichen der Organdysfunktion und Hypoperfusion mit

- Laktatazidose
- Oligurie
- Akuter Verwirrtheit und Bewusstseinsstörung ohne andere Ursache

Septischer Schock

Der septische Schock ist eine schwere Sepsis mit ausgeprägter Hypotension

- Systolischer Blutdruck $< 90 \text{ mmHg}$
- Blutdruckabfall von $> 40 \text{ mmHg}$ vom Ausgangswert ohne andere Ursache
- Benötigter Einsatz von Vasopressoren

Abb. 1 Symptome des „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS)
(nach Bone et al., 1992, Nyström et al., 1998)

1.2 Verlauf der systemischen Entzündungsantwort

Zu Beginn der systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) steht eine Überaktivierung des nicht-spezifischen Immunsystems im Vordergrund. Initiatoren dieser Reaktion können im Falle eines schweren Traumas sowohl exogene wie auch endogene Moleküle darstellen. So sind die Zellen des angeborenen Immunsystems in der Lage nicht nur Gefahrensignale, die von Pathogenen ausgehen, zu erkennen, sondern auch über sogenannte „pattern recognition receptors (PRRs)“ endogene Strukturen, die im Rahmen des traumatischen Gewebeuntergangs den Immunzellen zugänglich werden. Durch zelluläre Nekrosen oder Pathogeneinfluss werden Proteine wie Defensin, Cathelicidin, „eosinophil-derived neurotoxin“ und „high-mobility group box 1 protein“ (HMBG1) freigesetzt, die sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem aktivieren (Zedler et al., 2006). Über diese Signale wird eine Kaskade initiiert, die schließlich NF-κB vermittelt zur Sekretion von proinflammatorischen Molekülen führt (Bohrer et al., 1997). Hauptmediatoren dieser Frühphase sind hierbei die proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 und IL-12. All diese Zytokine haben eine Vielzahl von wichtigen lokalen und systemischen Effekten. In Verbindung mit weiteren ebenfalls von aktivierte Phagozyten sezernierten Molekülen, wie reaktiven Sauerstoffmetaboliten, Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandinen und Leukotrienen, kommt es zu einer weiteren Zellaktivierung, einer Komplementaktivierung und zu Änderungen der Gefäßwandpermeabilität mit Leukozytendiapedese. Als Folgen können Plasmaverlust, Vasodilatation, disseminierte intravasale Gerinnung, sowie letztendlich ein Schockgeschehen auftreten. Die Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-1RA (Rezeptorantagonist), TGF-β, Kortison und Adenosin (Madden et al., 1995) resultiert in kompensatorischen Gegenreaktionen, die man unter dem bereits oben erläuterten Begriff „CARS“ subsummiert (Lederer et al., 1999). Neben löslichen TNF-Rezeptoren, die proinflammatorisches TNF-α binden und inaktivieren können (Lantz, Gullberg, Nilsson, & Olsson, 1990), sind auch neuronale Strukturen an der antiinflammatorischen Antwort beteiligt. So hemmt Acetylcholin, freigesetzt aus vagalen Efferenzen in Organen des retikuloendothelialen Systems, die Synthese von TNF-α, IL-1 und IL-18 (Bernik et al., 2002). Während der antiinflammatorischen Phase zeigen sich häufig eine Lymphopenie, gestörte Lymphozyten-Monozyten Interaktionen, eine Hemmung der Immunglobulinsynthese, sowie eine Dominanz der T-Helfer (Th)2-Antwort (Markewitz et al., 1996). Gerade die funktionelle Verschiebung innerhalb der T-Lymphozytenpopulation in Richtung einer zytotoxisch dominierten Th2-Immunantwort nach Trauma, spielt

anscheinend eine Schlüsselrolle in der Genese der posttraumatischen Immunsuppression. Noch konnte allerdings nicht gezeigt werden, ob steigendes IL-4 (Leitzytokin der Th2-Antwort) (Heidecke *et al.*, 1999, Zedler *et al.*, 1997), oder die sinkende IL-12 Produktion (O'Sullivan *et al.*, 1995), einem Th1-Produkt, hauptverantwortlich für eine dominierende Th2-Immunantwort ist. Die Theorie des zeitlichen Alterierens von pro- und antiinflammatorischen Zuständen im Sepsisverlauf kann nach neueren Erkenntnissen nicht aufrecht erhalten werden, Zutreffender erscheint das Konzept des zeitlich parallelen Auftretens von Inflammation und Gegenregulation (Vincent & Mercan, 2000). So zeigen einige Patienten bereits initial Anzeichen der immunologischen Anergie. Diese äußert sich in einem generellen Mindervermögen der Immunzellen auf Antigene adäquat zu reagieren. Heidecke und Kollegen wiesen beispielsweise bei Patienten mit Peritonitis eine verminderte Funktion der Th1 Zellen nach, ohne dabei gleichzeitig eine erhöhte Th2 Zytokinproduktion festzustellen (Heidecke *et al.*, 1999).

Auch die absolute Zahl der T-Zellen ist in der Sepsis bei funktionaler Anergie häufig reduziert. Die Anzeichen mehren sich, dass eine hauptsächliche Ursache dieser sepsisinduzierten immunologischen Anergie die gesteigerte Apoptose, also der programmierte Zelltod von Immunzellen sein könnte. Hotchkiss und Kollegen zeigten, dass eine große Anzahl an Lymphozyten und gastrointestinalen Epithelzellen im septischen Geschehen durch Apoptose zugrunde gehen (Hotchkiss *et al.*, 1999). Verantwortlich für diesen Zelluntergang sind anscheinend endogene Glukokortikoide, die im Rahmen einer Stressreaktion, wie etwa nach schwerer Verbrennungsverletzung, ausgeschüttet werden (Fukuzuka *et al.*, 2000). Neutrophile Granulozyten dagegen, die zu den ersten Immunzellen gehören, die an den Ort der Entzündung migrieren und dort nach apoptotischem Zelltod von phagozytierenden Zellen eliminiert werden, zeigen im septischen Geschehen eine verzögerte Apoptose (Ertel *et al.*, 1998). Ebenso auffällig ist der Befund, dass Endothelzellen, deren Dysfunktion maßgeblich an der Entwicklung eines MOV während der Sepsis beteiligt ist, durch erhöhte Plasmakonzentrationen von TNF α oder zirkulierendem LPS vermehrt durch Apoptose zugrunde gehen (Friedman *et al.*, 1996). Die apoptotischen Zellen können aber auch selbst Einfluss auf nachfolgende Immunreaktionen nehmen. Voll *et al.* wiesen nach, dass apoptotische Lymphozyten eine Anergie des Immunsystems oder eine antiinflammatorische Zytokinsekretion induzieren, während Zellen, die einem nekrotischen Zelluntergang unterworfen waren, eine Immunstimulation mit gesteigerter antimikrobieller Abwehr förderten (Voll *et al.*, 1997). Entscheidend für den klinischen Verlauf des Patienten ist letztendlich das Erreichen der

immunologischen Homöostase ohne Dominanz von pro- oder antiinflammatorischen Kräften. (Munford & Pugin, 2001).

Heute herrscht Einvernehmen, dass eine inadäquate Regulation des Immunsystems nach Trauma ursächlich an der Entwicklung der Sepsis und dem möglicherweise konsekutiv resultierenden Multiorganversagen beteiligt ist. Hierbei hat das Ausmaß der Dysregulation prognostischen Wert und ist korrelierbar mit dem Anergiegrad, dem Patientenalter und dem Ausmaß der Gewebsverletzung (DeCamp & Demling, 1988; Green et al., 1988). Träger dieser gestörten Immunantwort sind zellvermittelte Vorgänge, die hauptsächlich durch die Aktivierung monozytärer Zellen initiiert werden. Posttraumatisch zeigt sich häufig eine Monozytose (CD14+) bei gleichzeitiger absoluter Lymphopenie (CD3+). Faist et al. demonstrierten bei 11 Patienten nach größerem Trauma eine um mehr als 70% gehemmte Lymphoblastogenese, wobei 8 dieser Patienten gleichzeitig eine signifikante infektiöse Komplikation entwickelten (Faist et al., 1986). Einzelne lymphozytäre Subpopulationen reagierten hierbei sehr unterschiedlich, so kam es beispielsweise zu einer ausgeprägten Depletion der CD4+ T-Helferzellen mit ebenfalls verringelter IL-2 Rezeptorexpression auf deren Oberfläche (Faist et al., 1986, Faist et al., 1996). Aufgrund der starken Abnahme der CD4+ Zellen und leicht erhöhter Zahl der CD8+ Lymphozyten nach Trauma, verringerte sich das CD4/CD8-Verhältnis, ausgehend vom Referenzbereich 1,0-3,0, auf negative Werte (< 1) (Faist et al., 1986). Auch eine reduzierte absolute Zahl der NK-Zellen mit supprimierter Aktivität konnte nachgewiesen werden, die offensichtlich von Prostaglandinen moduliert wird (Brunda et al., 1980).

Neben der reduzierten IL-2, IL-3 und Interferon (IFN) γ Produktion, die maßgeblich durch eine beeinträchtigte IL-1 Synthese verursacht wird (Faist et al., 1987; Livingston et al., 1988) und einer verminderten IL-2 Rezeptordichte (Quattrocchi et al., 1991), konnte von mehreren Gruppen auch eine auffällige Abnahme der HLA-DR Expression, einem Histokompatibilitätsantigen der Klasse II, auf peripheren Monozyten, sowie B- und T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Livingston et al., 1988). Diese Niederregulation von HLA-DR führt zu einer verminderten Kapazität peripherer Immunzellen, Antigene zu präsentieren, und somit zu einer geschwächten Immunabwehr. Auch hier zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen reduzierter Expression dieses Oberflächenantigens und der Entwicklung septischer Komplikationen (Faist et al., 1996).

Schluter et al. (1991a) wiesen in isolierten mononukleären Zellen brandverletzter Patienten, eine vermehrte IL-6 Freisetzung nach. Ayala (Ayala et al., 1991) zeigte eine Erhöhung der IL-6 Spiegel im Blut von Patienten mit hämorrhagischem Schock. Zudem

konnte eine Korrelation zwischen der Höhe des posttraumatischen IL-6 Anstiegs und der Wahrscheinlichkeit ein MOV zu entwickeln aufgezeigt werden (Waydhas *et al.*, 1996), Gebhard *et al.*, 2000). Übereinstimmend gilt IL-6 gegenwärtig als einer der potentesten prädiktiven Mediatoren zur Abschätzung des klinischen Verlaufes kritisch kranker Patienten. Auch das Procalcitonin wird mittlerweise als „Sepsismarker“ eingesetzt. Wanner *et al.* (2000) konnten signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen des Procalcitonins posttraumatisch bei Patienten mit MOV nachweisen, die zudem mit dem Schweregrad und dem klinischen Verlauf korrelierten. Interessanterweise ist aber auch die Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine mit der Entwicklung eines posttraumatischen Organversagens korreliert. So beschrieben Neidhardt *et al.* (1997) signifikant erhöhte Serumkonzentrationen des IL-10, einem antiinflammatorischen Zytokin, bei Patienten mit MOV, gegenüber Patienten, die kein MOV entwickelten. Außerdem war das Verhältnis von IL-10 zu TNF α bei nicht überlebenden Patienten mit Infektionen signifikant höher als bei Überlebenden (van Dissel *et al.*, 1998).

1.3 Grundbegriffe der Immunologie

Unter Immunsystem (lat. immunis = frei, unberührt) werden Organe, Zellen und Proteine verstanden, deren Funktion in der Erhaltung der Individualstruktur durch die Abwehr körperfremder Substanzen und Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten besteht. Voraussetzung dafür ist die Fähigkeit des Immunsystems zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden zu können, so dass im Normalfall keine Immunreaktion gegen körpereigene Zellen erfolgt (immunologische Toleranz).

Die im Laufe der Evolution entwickelte Abwehr des Körpers gliedert sich grundsätzlich in zwei Hauptsysteme: Die angeborene, unspezifische Immunität, sowie die erworbene, spezifische Immunität. Diese beiden Abwehrmechanismen sind nicht getrennt voneinander zu betrachten, sondern vielmehr eng miteinander vernetzt und sich gegenseitig beeinflussend. Weiterhin wird zwischen humoralen und zellulären Faktoren unterschieden. Das humorale Abwehrsystem ist durch in Körperflüssigkeiten gelöste Stoffe gekennzeichnet, besonders in Form von Antikörpern, sowie einer Reihe von Akut-Phase-Proteinen und antibakterieller Enzyme. Die zellulären Strukturen des Immunsystems stammen gänzlich von CD34+ Stammzellen des Knochenmarks ab. Diese durchlaufen dann entweder die Differenzierung der lymphatischen oder myeloischen Zellreihe oder reifen zu natürlichen Killerzellen. Myeloischen Ursprungs sind Monozyten, Makrophagen,

Granulozyten, Mastzellen und zum Teil dendritische Zellen. Zur lymphatischen Linie gehören neben T- und B-Lymphozyten die natürlichen Killerzellen und eine Subpopulation der dendritischen Zellen.

1.3.1 Unspezifische Immunantwort

1.3.1.1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem besteht aus verschiedenen Plasmaproteinen, die mit Krankheitserregern in Wechselwirkung treten und dabei eine kaskadenartige Reaktion induzieren. Die Aktivierung des Komplementsystems kann dabei entweder auf klassischen Weg durch Antigen-Antikörper-Komplex erfolgen, oder aber alternativ allein über Kontakt zu Pathogenoberflächen erfolgen. Die drei wichtigsten Ziele der Komplementaktivierung sind die Opsonierung von Pathogenen, die Mobilisierung von Entzündungszellen und das direkte Eliminieren von Erregern.

1.3.1.2 Phagozytäre Zellen

Hauptvertreter der phagozytären Immunzellen sind vor allem neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten. In Kontakt mit Krankheitserregern treten diese Zellen mit Hilfe von Rezeptoren, etwa dem Makrophagen-Mannoserezeptor oder dem Scavenger-Rezeptor bei Monozyten und Makrophagen. Diese verfügen außerdem über den Lipopolysaccharidrezeptor CD14. CD14 bindet einen LPS-LBP (Lipopolysaccharid bindendes Protein)-Komplex und interagiert hierauf mit dem sogenannten Toll-like-Rezeptor 4, der ebenfalls auf Phagozyten exprimiert wird. Im weiteren Verlauf kommt es durch Aktivierung der entsprechenden Gene einerseits zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, die die Wanderung antigenpräsentierender Zellen (APC) in Lymphknoten veranlassen. Andererseits wird eine vermehrte Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 oder CD86 auf diesen Zellen induziert, mit deren Hilfe im Lymphknoten CD4-T-Zellen nach Kontakt zu MHC-II auf APC aktiviert werden und somit die spezifische Immunantwort beginnt (Carreno & Collins, 2002).

1.3.1.3 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK), die im peripheren Blut etwa 7-8 % der Leukozyten ausmachen, sind Teil des angeborenen Immunsystems, obwohl sie sich einen Knochenmarksvorläufer mit T-Zellen teilen. Erstmals beschrieben wurden sie 1975 am Karolinska Institut in Stockholm. Im Gegensatz zu T-Zellen können sie ohne vorherige

Aktivierung unmittelbar bei Antigenkontakt reagieren, sie unterliegen also keiner MHC-Restriktion. Die Funktion der NK-Zelle besteht darin, aberrante Zellen, die keine MHC-I Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, zu erkennen und zu zerstören. Da MHC Moleküle oft nach Virusinfektion oder bei der Tumorentstehung herunterreguliert werden, um sie vor einem Angriff durch T-Zellen zu schützen, kommt den NK-Zellen hier besondere Bedeutung zu. In den letzten Jahren gelang es Rezeptoren zu identifizieren, die das Erkennen von spezifischen MHC Molekülen erlauben und die Aktivität der NK-Zellen regulieren. Diese Rezeptoren sind überwiegend inhibitorischer Natur, so kommt es physiologischerweise bei MHC-Erkennung nicht zu einer NK-Aktivierung mit konsekutiver Zerstörung der Zielzelle. In pathologischen Zuständen und damit einhergehender Herunterregulation der MHC-Moleküle, entfalten NK-Zellen ihre Zytotoxizität. Die natürliche zytotoxische Aktivität vermitteln NK-Zellen auf zwei verschiedenen Wegen, über Perforin-Granzym und Fas/FasL. Ferner besitzen NK-Zellen einen Rezeptor für die konstante Region bestimmter Antikörper. Mit Hilfe dieses Rezeptors, der als CD16 Oberflächenantigen klassifiziert ist, besitzt die NK-Zelle die Fähigkeit zur Antikörper-abhängigen Zytotoxizität. Morphologisch zeichnen sich NK-Zellen durch eine Vielzahl azurophiler Granula im Zytoplasma aus, weshalb sie auch als „large granular lymphocytes“ bezeichnet werden. Durchflusszytometrisch sind sie als Zellen mit dem Phänotyp CD3-, CD16+, CD56+ charakterisiert.

1.3.2 Spezifische Immunantwort

1.3.2.1 T-Lymphozyten

Aus dem Knochenmark wandern unreife T-Zellvorläufer, sogenannte Thymozyten in den Thymus ein. In diesem Stadium tragen sie noch keine charakteristischen Oberflächenproteine wie CD3, CD4 und CD8. Während ihrer Wanderung innerhalb des Thymus vom Kortex zur Medulla durchlaufen sie verschiedene Reifestadien und beginnen zunächst TCR-Gene zu transkribieren. Alle T-Lymphozyten tragen einen T-Zell-Rezeptor (TCR), der eine wichtige Rolle bei der Kontaktaufnahme mit anderen Zellen spielt und mit dem Oberflächenmarker CD3 assoziiert ist. Der TCR besteht aus zwei transmembranösen Proteinketten, wobei etwa 95% der T-Lymphozyten den α/β -TCR und zudem das Oberflächenprotein CD4 oder alternativ CD8 tragen. T-Lymphozyten, die dagegen den TCR γ/δ besitzen, exprimieren gewöhnlich weder CD4, noch CD8 und werden deshalb als doppelt negativ bezeichnet. Ihr Anteil beträgt physiologischerweise weniger als 5% aller T-Lymphozyten (Lanier *et al.*, 1987).

T-Lymphozyten, die 20-40% der zirkulierenden Leukozyten ausmachen, können und dürfen körperfremde Antigene nur erkennen, wenn sie ihnen von Zellen in Verbindung mit bestimmten Molekülen, sogenannten MHC-Molekülen, präsentiert werden. Von diesen existieren verschiedene Klassen, wobei für T-Lymphozyten lediglich die Klassen MHC-I und MHC-II von Bedeutung sind. CD4 tragende Lymphozyten erkennen Antigene, die mittels MHC II präsentiert werden, dagegen binden CD8-Lymphozyten MHC I tragende Zellen.

Das MHC I-Molekül ist auf nahezu allen kernhaltigen Zellen zu finden und besteht aus einer 45 kDa Kette, die etwa 90 Aminosäuren umfasst. MHC I-Moleküle binden über Peptidbindungen endogene, intrazelluläre Proteine, die von der Zelle aufgenommen, an das MHC I-Molekül gebunden und dann an der Zelloberfläche exprimiert werden. Das MHC II-Molekül wird auf B-Zellen, aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Langerhanszellen und Spermatozyten gefunden und besteht aus einer 33 kDa α -Kette, sowie einer 28 kDa schweren β -Kette. Es bindet exogene Proteine, die über Exocytose an MHC II-Moleküle gebunden werden (Bjorkman *et al.*, 1994). Zur Aktivierung von naiven T-Zellen, nämlich ausgereiften T-Zellen ohne bisherigen Antigenkontakt, ist eine weitere Interaktion nötig. So löst erst die zusätzliche Bindung zwischen dem Oberflächenmolekül CD28 auf der T-Zelle und dessen Liganden CD80/CD86 auf der APC eine Aktivierung aus (Slavik *et al.*, 1999). Die Expression des CD28 Oberflächenantigens auf T-Zellen bewahrt diese Zellen auch vor Anergie und sichert deren Überleben (Chambers & Allison, 1999). Die Auslösung eines Aktivierungssignals in der T-Zelle ist somit von Faktoren wie Antigendichte, der Anzahl kostimulatorischer Moleküle auf APC und der Anzahl der TCR-Moleküle auf der T-Zelle abhängig. In mehreren Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine hohe Anzahl kostimulatorischer Moleküle die Auslösung eines Aktivierungssignals in der T-Zelle auch bei geringer TCR-Dichte bewirkt (Bachmann *et al.*, 1996). Binden der TCR und das CD28 an die jeweiligen Liganden an der APC, führt dies zur Produktion von IL-2, welches für die Proliferation der naiven T-Zellen im Rahmen einer angemessenen Immunantwort notwendig ist.

Mittels der Oberflächenproteine CD4 und CD8 können T-Lymphozyten in T-Helferzellen und T-zytotoxische Zellen differenziert werden.

1.3.2.2 T-Helferzellen

T-Helferzellen stellen eine Lymphozytenpopulation dar, die verschiedene immunregulatorische Aufgaben, wie Unterstützung der Antigenpräsentation von

Makrophagen, Differenzierungshilfe der zytotoxischen T-Zellen und B-Lymphozyten wahrnimmt. Allen T-Helferzellen gemein ist das Oberflächenantigen CD4, das an Proteine der MHC Klasse II bindet.

Mosmann & Coffman (1989) beschrieben im Mausmodell eine funktionelle Polarisierung von CD4+ T-Helferzellen zu Th1- und Th2-Zellen, entsprechend ihrem Zytokinprofil. Demnach produzieren Th1-Zellen die Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- β , aber nur in geringem Masse IL-4 und IL-5. Die Ausschüttung dieser Zytokine wirkt in erster Linie auf den zellulären Arm der Immunantwort ein, da etwa Makrophagen durch IFN- γ aktiviert werden. Th1-Zellen werden daher auch als proinflammatorische Zellen bezeichnet.

T-Helferzellen vom Th2-Typ produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 und unterstützen damit sowohl die humorale Immunantwort, als auch allergische Reaktionen, da die freigesetzten Interleukine die B-Zellaktivierung fördern. Das Th1/Th2 Paradigma konnte mit Einschränkungen auch für humane CD4+-Zellen nachgewiesen werden (Salgame *et al.*, 1991).

In jüngerer Zeit ist dieses Konzept allerdings in einigen Punkten erweitert worden. So zeigte sich, dass insbesondere in Bezug auf humanes Interleukin-10 eine klare Abgrenzung zwischen Th1- und Th2-Zellen nicht immer möglich ist. Die Sekretion von IL-10 konnte sowohl für Th1-, als auch für Th2-Klone gezeigt werden (DelPrete *et al.*, 1993). Außerdem konnte zumindest in-vitro gezeigt werden, dass IFN- γ produzierende Th1-Zellen nach Stimulation mit IL-4 in der Lage sind IL-10 zu produzieren und die Expression von IFN- γ einzustellen (Assenmacher *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurden inzwischen CD4+-Zellen identifiziert, die viel IL-10, IFN- γ , TGF- β und IL-5, aber nur wenig IL-2 und kein IL-4 produzieren. Funktionell supprimieren diese Zellen antigenspezifische Immunantworten, so dass sie als regulatorische Typ1 T-Zellen (Tr1) bezeichnet wurden (Groux *et al.*, 1997; Jonuleit *et al.*, 2000). Ähnliche, durch TGF- β induzierte regulatorische T-Zellen wurden auch als Th3-Zellen bezeichnet (Weiner *et al.*, 2001). Die immunsuppressive Wirkung von IL-10 beruht vor allem auf der Abschwächung der antigenpräsentierenden und akzessorischen Kapazität von Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen durch Inhibierung der Expression von MHC-II-Molekülen und den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 (Corinti *et al.*, 2001). Darüber hinaus wirkt IL-10 aber auch inhibierend auf die Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α und GM-CSF (de Waal Malefyt *et al.*, 1991).

1.3.2.3 Zytotoxische T-Lymphozyten

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) exprimieren typischerweise auf der Oberfläche den T-Zell-Korezeptor CD8. Obwohl hilfreich für die phänotypische Klassifizierung dieser Effektorzellen bleibt festzuhalten, dass nicht alle zytotoxischen Zellen CD8+ sind. Unter bestimmten Umständen, wie beispielsweise bei Infektionen, können auch CD4+ Zellen lytisches Potenzial entwickeln, das sich nicht von den klassischen CD8+ zytotoxischen Zellen unterscheidet. CD8+ zytotoxische Zellen erkennen Antigene, die auf MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert werden. Bislang wurde angenommen, dass eine Interaktion zwischen T-Helferzellen, CTL und APC die Voraussetzung für die Aktivierung von CTL ist (Stuhler und Walden, 1993). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die APC durch den Kontakt mit der Th-Zelle über CD40/CD40L aktiviert wird und in diesem Zustand die CTL ohne den gleichzeitigen Kontakt mit einer Th-Zelle aktivieren kann (Ridge *et al.*, 1998). Die Interaktion von CD40/CD40L induziert auf der APC die Expression von kostimulatorischen Molekülen, die essentiell für eine effektive Stimulation der CTL sind (Shinde *et al.*, 1996). Nach ihrer Reifung verlassen die CTL die sekundären lymphatischen Organe, wandern in die Peripherie und produzieren IFN- γ und TNF- α , wodurch die Expression von MHC-Molekülen auf APC erhöht wird. Die zytotoxische Aktivität wird hierbei über Induktion der Apoptose in der Zielzelle erreicht (Henkart *et al.*, 1994).

Auch für CD8 positive T-Lymphozyten wurde die Existenz funktioneller Subgruppen belegt, die sich ähnlich wie CD4-Zellen in ihrem Zytokinprofil unterscheiden und entsprechend T(c) cytotoxic 1 und Tc2-Zellen bezeichnet werden (Vukmanovic-Stejic *et al.*, 2000). Tc1-Zellen sezernieren demnach IFN- γ , IL-2 und TNF α , und werden wahrscheinlich über IL-12 aktiviert. Tc2-Zellen dagegen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, sowie IL-13 und werden über IL-4 aktiviert.

1.3.2.4 Untersuchte humane Zelloberflächenmoleküle

Das CD3-Antigen hat eine Molekülmasse von 20-28 kDa und ist mit dem T-Zellrezeptor (TCR) assoziiert. Es wird von Thymozyten und reifen T-Zellen exprimiert.

Das CD4-Antigen hat eine Molekülmasse von 55 kDa und ist ein Transmembranglykoprotein, das auf einigen Thymozyten, etwa zwei Drittel der peripheren T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Es dient als Korezeptor für MHC-Klasse-II Moleküle.

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

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

Das CD16-Antigen hat eine Molekülmasse von 50-80 kDa und wird von den meisten NK-Zellen, aber auch von Neutrophilen exprimiert. Das Antigen geht während der Aktivierung von NK-Zellen verloren und wird nur relativ schwach exprimiert.

Das CD40-Antigen hat eine Molekülmasse von 48 kDa und wird auf B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und Epithelialbasalzellen exprimiert. Es bindet an CD154, einem CD40 Liganden, und dient als Rezeptor für kostimulierende Signale für B-Zellen und fördert deren Wachstum, Differenzierung und Isotypenwechsel und schützt diese vor dem programmiertem Zelltod. Außerdem steigert es die Zytokinproduktion bei Makrophagen und dendritischen Zellen.

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

HLA-DR ist als „major histocompatibility complex“, MHC-Klasse-II, ein Oberflächenantigen, das von dem „human leucocyte antigen complex“ auf Chromosom 6 kodiert wird. HLA-DR wird auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie Monozyten,

Makrophagen und dendritischen Zellen konstitutiv exprimiert und dient der Antigenpräsentation über die Bindung an den T-Zell-Rezeptor der CD4- Zellen.

Dagegen ist die HLA-DR-Expression auf CD3+ T-Lymphozyten erst in der Spätphase einer Immunaktivierung nachweisbar.

1.3.3 Die Apoptose

Die Apoptose gehört zu den wichtigsten Zellfunktionen. Unter Apoptose, erstmals 1971 als „shrinkage necrosis“ beschrieben (Kerr, 1971), versteht man den programmierten Zelltod mit kontrollierter Autodigestion. Dieser Vorgang steht im Gegensatz zur Nekrose, welche eine pathologische Form des Zelltodes darstellt. Im nekrotischen Geschehen kommt es zur Zell- und Organellschwellung und schließlich zur Zellruptur mit konsekutiver Entzündungsreaktion (Vaux *et al.*, 1994). Die Apoptose hingegen durchläuft verschiedene Stadien der zellulären Veränderung mit Verminderung des Zytoskeletts, Verdichtung des Zellkerns und Fragmentierung der DNA. Letztendlich werden apoptotische Zellen phagozytiert und die Entzündungsreaktion bleibt normalerweise aus. Apoptotische Vorgänge sind unabdingbar bei der natürlichen Selektion während der Zellwachstumsphasen, zur Elimination von aberranten Zellen, wie virusinfizierten- oder tumorhaltigen Zellen und zur Verhinderung einer übermässigen Proliferation von Zellen. Zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Apoptose. Beide Zellpopulationen können über verschiedene Wege den programmierten Zelltod initiieren. Einerseits über die Synthese und Freisetzung löslicher Mediatoren wie IFN- γ (Boehm *et al.*, 1997), TNF- α (Vassalli *et al.*, 1992) und weiterer Interleukine (Biron *et al.*, 1994). Andererseits besteht die Möglichkeit der direkten Zytolyse und Induktion des programmierten Zelltods über zytotoxische Granula, die Perforin und Granzyme enthalten, oder über Fas und seinen Liganden (FasL). Eine Dysregulation des Perforin vermittelten Weges der Apoptose ist mit Erkrankungen, wie der familiären hämophagozytischen Lymphohistiozytose, des Griscelli- Syndroms und des Chediak-Higashi-Syndroms (Filipovich *et al.*, 2006) assoziiert.

1.3.3.1 Rezeptor vermittelte Apoptose

Der am besten untersuchte Rezeptor assoziierte Apoptoseweg wird durch das Fas Protein und seinen Liganden (FasL) vermittelt (Berke *et al.*, 1995). Der Fas-Ligand der Effektorzelle bindet an Fas-Rezeptoren der Zielzelle und löst die Apoptose aus. Fas (=

fibroblast associated) wurde 1989 von zwei unabhängigen Gruppen erstmals beschrieben und auch als CD95 oder Apo1 bezeichnet (Trauth *et al.*, 1989; Yonehara *et al.* 1989). Es handelt sich um ein transmembranöses Protein, das aus 319 Aminosäuren besteht und über eine Cystein-reiche extrazelluläre Rezeptordomäne und eine zytoplasmatische Todesdomäne (DD) verfügt. Fas zeigt strukturelle Zugehörigkeit zur Familie des Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptors (Krammer *et al.*, 1994) und wird von fast allen Zellen exprimiert. Der Fas Ligand (FasL), ebenfalls ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie, ist ein Homotrimer und befähigt, drei Fas Moleküle zu binden. Infolgedessen kommt es zur Clusterbildung des Rezeptormoleküls Fas, die es einem Adapterprotein (FADD) ermöglicht, sich an den Rezeptor anzulagern. Dieses zytoplasmatische Adapterprotein bindet an Caspase 8 und induziert deren Aktivierung, worauf diese wiederum weitere Caspase aktiviert und letztendlich Proteine enzymatisch abgebaut werden (Borgerson *et al.*, 1999). Schließlich kommt es zur Apoptoseinduktion durch Zerstückelung von Zytoskeletproteinen, Aktivierung von Endonukleasen und Inaktivierung von Enzymen. Fas wird vor allem von NK-Zellen und aktivierten CTL exprimiert und spielt daher eine wichtige Rolle bei antiviralen und antitumorösen Reaktionen, sowie bei der Regulation der Lymphozytenentwicklung (Suda *et al.* 1995). Besondere Bedeutung scheint der apoptoseinduzierende Weg über Fas/FasL in CD4+ Zellen, insbesondere bei Th1-Zellen, zu haben (Ju *et al.*, 1994).

Neben Fas/FasL sind weitere, sogenannte Todesrezeptoren, etwa TNF-R1, die ähnliche oder dieselben intrazellulären Signalwege benutzen, bekannt (Borgerson *et al.*, 1999).

1.3.3.2 Perforin vermittelte Apoptose

Der zweite wichtige Apoptose induzierende Weg ist Perforin vermittelt. Perforin, ein sekretorisches Protein, ist der Hauptbestanteil zytoplasmatischer Granula in zytotoxischen, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen. Es besteht aus 534 Aminosäuren mit einem glykolierten Molekulargewicht von etwa 68-70 kDa und besitzt große Ähnlichkeit mit den porenbildenden Komplementkomponenten C6-C9. Seine Bedeutung liegt in der Fähigkeit Poren von bis zu 16 nm Durchmesser zu bilden und somit Granzymen den Eintritt in die Zielzelle zu ermöglichen. In den produzierenden Zellen wird die Wirkung des Perforins durch ein saures lysosomales Milieu und durch die Protease Cathepsin B inhibiert ().

Die Bindung von Perforin an die Zellmembran der Zielzelle ist Kalzium abhängig. Auch polymerisiert Perforin nur in Anwesenheit von Kalzium und ist fähig Poren in die

Lipidmembran der Zielzelle zu formen, durch die Granzyme mittels passiver Diffusion in die Zelle gelangen. Aktuellere Erklärungsansätze verlassen die Theorie der Perforin vermittelten Porenbildung, durch die Granzyme in die Zielzelle gelangen. Vielmehr wird postuliert, dass Perforin in die Zielmembran über Endozytose eintritt und ein Signal schafft, das Granzymen die Bindung an den sogenannten „cation-independent mannose-6-P Receptor“ (CI-MPR), auch bekannt als „insulin-like growth factor 2 receptor“, ermöglicht, mit dem sie in die Zielzelle aufgenommen werden (Motyka *et al.*, 2000). Ebenso gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass Perforin einen Kalziumeinstrom in die Zielzelle bewirkt, über den Perforin zusammen mit Granzymen durch Endozytose internalisiert werden. Die Freisetzung von Granzymen aus Endosomen in das Zytosol erfolgt ebenfalls perforinabhängig (Cullen *et al.*, 2008; Voskoboinik *et al.*, 2006).

Granzyme gehören zur Familie der neutralen Serinproteasen und weisen Ähnlichkeit zu dem Pankreasenzym Chymotrypsin auf. Sie werden als inaktive Vorstufen produziert, ebenso wie Perforin in zytoplasmatischen Granula gespeichert und erst durch Freisetzung von Cathepsin, einer Cysteinprotease, aktiviert. So produzieren CTL Cathepsin-defizienter Mäuse zwar adäquat Granzyme, diese sind jedoch inaktiv. Aktuell sind 5 humane Granzyme beschrieben, wobei Granzym-B, auch als zytotoxische Zellproteinase 1 (CCP1) oder Fragmentin 2 bezeichnet, am besten untersucht ist (Voskoboinik *et al.*, 2006). Granzym-B ist in der Nähe des Gens für die α -Kette des T-Zellrezeptors lokalisiert und löst die Apoptose auf verschiedenen Ebenen aus. So spaltet es die Pro-Caspase 3, welche dadurch aktiviert wird und wiederum den Inhibitor der Caspase- abhängigen DNase spaltet. Letztendlich transloziert die DNase in den Zellkern und fragmentiert die DNA. Weiterhin spaltet Ganzym-B BID (BH3-interacting domain death agonist) zu verkürztem BID, welches die äußere Mitochondrienmembran zerstört. Nun treten aus dem zwischenmembranösen Raum der Mitochondrien proapoptotische Proteine, wie Cytochrom C oder Endonuklease G, aus. Alternativ können direkt Moleküle gespalten werden, so etwa die PARP (poly ADP ribose polymerase) ein Sensor für DNA-Schäden oder die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase, welche die Reparatur von Doppelstrangbrüchen kontrolliert. Endstrecke all dieser Mechanismen ist der Abbau von Histon H1 und anderer Histone und schließlich das Auftreten von DNA-Strangbrüchen zwischen den Nukleosomen.

Aus diesen Gegebenheiten wird sichtbar, dass der Granzym-B/Perforinweg dem Mechanismus über CD95/CD95L im Hinblick auf die Bekämpfung viraler Erkrankungen

überlegen ist, da viele Viren Möglichkeiten entwickelt haben, die Caspasenaktivierung zu blockieren (Oberholzer *et al.*, 2001).

Stark aktivierte CTLs sind in der Lage nacheinander mehrere Zielzellen zu zerstören (Koren *et al.*, 1973). Jedoch bestehen Unterschiede in der zeitlichen Aktivierbarkeit zwischen den zytotoxischen Zellen. So tragen NK-Zellen zytotoxische Granula, deren Aktivität und Inhalt durch Zytokine wie IL-2 und IFN- γ , erhöht werden kann (Brown *et al.*, 2009). NK-Zellen sind also in der Lage innerhalb von Minuten Zytotoxizität zu vermitteln. CD8+ T-Lymphozyten dagegen, die im naiven Zustand keine zytotoxische Aktivität zeigen, benötigen einen 1-3 Tage dauernden Prozess der maximalen Aktivierung mittels IL-2 und IL-6 bis zytotoxische Granula ausgebildet sind (Brown *et al.*, 2009). Die CTL selbst zeigen dabei als Schutzmechanismus eine gewisse Resistenz gegenüber dem zytotoxischen Inhalt der Granula durch Aufrechterhaltung eines sauren Milieus, in dem Perforin mit Proteoglykanen eine Verbindung eingeht (Verret *et al.*, 1987).

Normalerweise ist Perforin und Granzym-B in CD4+ Zellen nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar. Bei bestimmten Erkrankungen allerdings, wie der Mononukleose (Nakata *et al.*, 1992) oder rheumatoider Arthritis (Namekawa *et al.*, 1998) und insbesondere der HIV-Infektion (Appay *et al.*, 2002b) können sie zytotoxisches Potenzial entwickeln. Beziüglich des prädominannten zytotoxischen Weges der CD4+ Zellen ist die Literatur uneinheitlich. Es wurde im murinen Modell sowohl der Fas/Fas Ligand Mechanismus (Ju *et al.*, 1994), als auch der Perforin vermittelte Weg in zytotoxischen CD4+ Zellen beschrieben (Niiya *et al.*, 2005).

1.4 Fragestellung

Eine angemessene und ausgewogene Immunantwort ist die Voraussetzung für die Erhaltung der überlebenswichtigen Organfunktionen nach schwerem Trauma jeder Genese. Hierbei nimmt die Apoptose, als einer der wichtigsten biologisch konservierten Mechanismen für vielzellige Organismen auf ein Trauma zu reagieren, eine entscheidende Rolle ein. Der Perforin/ Granzym B vermittelt Apoptoseweg ist von besonderem Interesse, da dieser für zytotoxische CD4+ Zellen als dominanter Apoptosemechanismus beschrieben ist.

Das Ziel der vorliegenden Studie war deshalb die Charakterisierung des zytotoxischen Arsenals von T-Lymphozyten unter besonderer Berücksichtigung der CD4+ Zellen nach massiver Polytraumatisierung und schwerer Verbrennungsverletzung mit folgender detaillierter Fragestellung:

- Ändert sich die prozentuale Verteilung der Leukozytensubpopulationen, insbesondere der zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen durch akzidentelles Trauma?
- Welchen Anteil haben Perforin- bzw. Granzym-B-positive Zellen an den verschiedenen Subpopulationen der Lymphozyten im gesunden Organismus?
- Sind bei Patienten nach schwerer Mehrfachverletzung bzw. schwerster Verbrennungsverletzung im posttraumatischen Verlauf Expressionsveränderungen der funktionsrelevanten zytotoxischen Effektormoleküle Perforin und Granzym B nachweisbar?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenauswahl

In die prospektive Studie wurden vom 1. Januar 2003 bis zum 30. Januar 2004 insgesamt 24 Patienten eingeschlossen. Das Untersuchungskollektiv der schwerbrandverletzten Patienten wurde aus der Abteilung für Plastische, Rekonstruktive und Handchirurgie - Zentrum für Schwerbrandverletzte (Prof. Dr. med. M. Ninkovic) des Städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen rekrutiert. Die Studienpatienten mit schwerer Mehrfachverletzung stammten aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians Universität München, Klinikum Großhadern (Prof. Dr. med. K.-W. Jauch), der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians Universität München, Klinikum Innenstadt (Prof. Dr. med. W. Mutschler), und der Klinik für Unfallchirurgie des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing (Dr. med. E. F. J. Höcherl).

2.2 Einschlusskriterien

Aufnahmebedingungen waren das Einverständnis der Patienten oder ihrer Angehörigen, und die Möglichkeit des Studienbeginns am ersten Tag post Trauma.

2.2.1 Schwerbrandverletzung

Vorraussetzung für die Aufnahme in die Studie waren mindestens 25 % Verbrennung des Grades II und/oder III der Gesamtkörperoberfläche (% KOF).

2.2.2 Polytrauma

Die Beurteilung der Verletzung erfolgte anhand des Injury Severity Scores (ISS) nach Greenspan et al. 1985, einer anerkannten und zuverlässigen Möglichkeit zur Abschätzung von Traumaschweregrad und Komplikationswahrscheinlichkeit. Zur Berechnung des ISS werden 6 Körperregionen (Haut / Weichteile, Kopf, Hals, Thorax, Abdomen, Wirbelsäule, Extremitäten/knochernes Becken) unterschieden und mit 1 Punkt (unwesentliche Verletzung) bis zu 5 Punkten (kritisch lebensbedrohliche Verletzung) bewertet. Der Gesamtschweregrad für jeden Patienten ergibt sich aus der Quadratsumme der drei schwersten Verletzungen. Maximal erreichbar sind demnach 75 Punkte.

Einschlusskriterium in die Studie war ein ISS von mindestens 25 Punkten.

2.3 Dokumentation und demographische Daten

Das Kollektiv der Schwerbrandverletzten setzte sich aus 14 Patienten (3 Frauen und 11 Männer) mit einem Durchschnittsalter von 40 ± 16 Jahren zusammen. Davon verstarben drei Patienten im Verlauf. Studienpatient 14 wies neben einer Verbrennung von 46 % der Körperoberfläche multiple Verletzungen auf (Tab. 1). Das Durchschnittsalter der 10 Polytraumapatienten (4 Frauen und 6 Männer) betrug 47 ± 11 Jahren, davon erlagen zwei Patienten innerhalb des Studienzeitraums ihren Verletzungen. Studienpatient 1 wies neben einem Polytrauma auch multiple Verbrennungen sowie ein Inhalationstrauma auf (Tab. 2). Das Kontrollkollektiv stellten 15 gesunde Freiwillige (7 Frauen und 8 Männer) mit einem Durchschnittsalter von 37 ± 12 Jahren.

Tabelle 1 Schwerbrandverletzte Studienteilnehmer

| Pat. Nr. | Geschlecht | Alter (J) | KOF (%) | Inhalations-trauma | Klinischer Verlauf | Verstorben |
|----------|------------|-----------|---------|--------------------|--------------------|------------|
| BT 1 | Männl. | 32 | 38 | Nein | MOV | Tag 43 |
| BT 2 | Männl. | 64 | 30 | Ja | unauffällig | Nein |
| BT 3 | Männl. | 72 | 52,5 | Nein | MOV | Tag 14 |
| BT 4 | Weibl. | 65 | 50 | Ja | MOV | Tag 30 |
| BT 5 | Weibl. | 37 | 25 | Nein | unauffällig | Nein |
| BT 6 | Männl. | 31 | 47 | Nein | unauffällig | Nein |
| BT 7 | Männl. | 49 | 38 | Nein | unauffällig | Nein |
| BT 8 | Männl. | 32 | 57,5 | Ja | Sepsis | Nein |
| BT 9 | Männl. | 30 | 50 | Nein | unauffällig | Nein |
| BT 10 | Männl. | 18 | 37,5 | Nein | unauffällig | Nein |
| BT 11 | Männl. | 45 | 79 | Nein | unauffällig | Nein |
| BT 12 | Weibl. | 34 | 45 | Nein | unauffällig | Nein |
| BT 13 | Männl. | 28 | 56 | Nein | unauffällig | Nein |
| BT 14 | Männl. | 26 | 46* | nein | unauffällig | Nein |

* Multiple Verletzungen, Hämatothorax

Tabelle 2 Polytraumapatienten

| Pat. Nr. | Geschlecht | Alter (J) | ISS (Pkt.) | Klinischer Verlauf | Verstorben |
|-----------------|-------------------|------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|
| PT 1 | Männl. | 63 | 41* | unauffällig | Nein |
| PT 2 | Männl. | 50 | 40 | unauffällig | Nein |
| PT 3 | Weibl. | 64 | 57 | MOV | Tag 9 |
| PT 4 | Männl. | 33 | 54 | unauffällig | Nein |
| PT 5 | Männl. | 43 | 40 | unauffällig | Nein |
| PT 6 | Männl. | 58 | 29 | unauffällig | Nein |
| PT 7 | Männl. | 29 | 50 | unauffällig | Nein |
| PT 8 | Weibl | 48 | 66 | MOV | Tag 4 |
| PT 9 | Weibl. | 45 | 27 | unauffällig | Nein |
| PT 10 | Weibl. | 40 | 45 | unauffällig | Nein |

* Multiple Verbrennungen mit Inhalationstrauma

2.4 Probenentnahme

An den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 post Trauma wurde den Patienten jeweils 7,5 ml Na-Heparin koaguliertes Blut aus einer peripheren Vene steril entnommen (Na-Heparin Sarstedt Monovette). Um den Einfluss der zirkadianen Rhythmik zu minimieren wurde ein standardisierter Zeitpunkt der Blutabnahme bis 8:00h morgens gewählt. Die Blutproben wurden anschließend bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb einer Stunde aufbereitet.

2.5 Probenaufbereitung

2.5.1 Messung von intrazellulärem Perforin und Granzym-B

1 ml heparinisiertes Vollblut wurde im Verhältnis 1:10 mit RPMI 1640 Kulturmedium, das mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 0,1mg/ml Gentamycin supplementiert war, verdünnt. Jeweils 1 ml dieses verdünnten Blutes wurde zusammen mit 0,5 ml Phosphatgepufferter Saline (PBS) in 5 Eppendorf Röhrchen resuspendiert und anschließend 5 Minuten bei 220 x g und 4°C zentrifugiert und schließlich der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Nach diesem Schritt wurde der Waschvorgang mit 1 ml PBS-Puffer nochmals wiederholt. In die 5 Gefäße wurde nun jeweils 5 µl der prätitrierten Oberflächenantikörper in folgenden Zweierkombinationen zugegeben: CD8 PC5/ CD56 PE, CD4 PC5/ CD56PE, CD8 PC5/ CD4 FITC und CD4 PC5/-. Nach 20 minütiger Inkubationszeit bei 4°C wurden jeweils 100 µl IntraPrep Reagent 1 zur Fixierung der

Zellen hinzugegeben, geschüttelt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang mit 1 ml PBS-Puffer wurde mit 300 µl humanem AB-Serum resuspendiert, um mögliche freie Fc-Rezeptoren zu blockieren. Anschließend folgte eine 25 minütige Inkubation im Kühlschrank. Nach einem weiteren Waschschnitt mit 800 µl PBS-Pufferlösung wurden die gewonnenen Zellen mittels 100 µl IntraPrep Reagent 2 permeabilisiert und zu 30 µl Portionen aliquotiert. Als letzter Schritt wurde jeweils 1 µl anti-Granzym-B mAk, bzw. anti-Perforin mAk hinzugegeben und nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln nochmals mit PBS-Puffer aufgefüllt und für 5 Minuten bei 4°C und 200 x g zentrifugiert. Bis zur durchflusszytometrischen Messung der Proben wurden diese im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.5.2 Messung der Zelloberflächenantigene

Jeweils 50 µl heparinisiertes Vollblut wurden in 5 bzw. 6 FACS-Messrörchen pipettiert und jeweils mit 5 µl Antikörperlösung versetzt. Die Färbekombinationen ergaben CD14 PC5/CD3 PE/HLA-DR FITC, CD14 PC5/ CD16 FITC/ CD40 PE und als Isotypkontrolle IgG2a PC5/ IgG1 FITC/ IgG1 PE, sowie CD4 FITC/ CD8 PC5/ CD28 PE, CD14 PC5/ TLR-4 FITC und als Isotypkontrolle IgG1 FITC/ IgG1 PC5/ IgG1 PE. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten im Kühlschrank erfolgte die Hämolyse der Erythrozyten mit 250 µl Optilyse C, da sich erythrozytenhaltige Proben nicht für durchflusszytometrische Untersuchungen eignen. Es schloss sich eine weitere 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln an. Vor Beginn der durchflusszytometrischen Messung wurden jeweils 250 µl PBS-Puffer hinzugegeben.

2.6 Geräte und Materialien

2.6.1 Geräte

- Durchflusszytometer: Epics XL der Fa. Beckmann Coulter, USA
- Universal 30 RF Kühlzentrifuge der Fa. Hettich, Tuttlingen
- Sicherheitssterilwerkbank, Klasse II, BSB 6, Fa. Flow Laboratories, Meckenheim

2.6.2 Puffer und Lösungen

- Fötales Kälberserum (FCS), mykoplasmengetestet, Fa. Vitromex, Vilshofen

- RPMI 1640 Kulturmedium mit L-Glutamin und 25 mM HEPES, Fa. Gibco, Paisley, UK
- Phosphat-gepufferte-Saline (PBS), pH 7,2, (Natriumchlorid 5,48 g, di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat 10,12 g, Kaliumdihydrogenphosphat 2,28 g, Wasser f. Injektionszwecke ad 1000 ml, Apotheke Klinikum München, LMU Innenstadt
- IntraPrep Permeabilization Reagent, Fa. Immunotech, Marseille, France
- Optilyse C, Fa. Beckmann-Coulter, Krefeld

2.6.3 Verwendete monoklonale Antikörper

- CD3 PE, PN IM 1282, Fa. Immunotech, France
- CD3 PC5, PN IM2635, Fa. Immunotech, France
- CD4 PE, PN IM0449, Fa. Immunotech, France
- CD4 PC5, PN IM2636, Fa. Immunotech, France
- CD4 FITC, PN IM0448, Fa. Immunotech, France
- CD8 PC5, PN IM2638, Fa. Immunotech, France
- CD14 PC5, PN IM2640, Fa. Immunotech, France
- CD16 FITC, PN IM0814, Fa. Immunotech, France
- CD28 PE, Nr.2071, Fa. Immunotech, France
- CD40 PE, Nr.1936, Fa. Immunotech, France
- CD56 PE, NKH-1-RD1, Lot 729313 Fa. Beckmann-Coulter, Krefeld
- IgG1 PE mouse, PN IM 0670, Fa. Immunotech, France
- IgG1 PC5 mouse, A09149, Fa. Immunotech, France
- IgG1 FITC mouse, PN IM0639, Fa. Immunotech, France
- IgG2a PC5 mouse, PNA09149, Fa. Immunotech, France
- HLA-DR FITC, Nr. 1638, Fa. Beckmann-Coulter, Krefeld
- Perforin PE, clone dG9, Fa. Hözel Diagnostika, Köln
- Perforin FITC, clone dG9, Fa. Hözel Diagnostika, Köln
- Granzym-B FITC, Fa. Hözel Diagnostika, Köln

2.6.4 Multiparameter Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurde ein Epics XL, ausgestattet mit einem 488 nm Argon-Ionenlaser, der Fa. Beckmann-Coulter verwendet.

2.7 Datenaquisition

Pro Messung wurden zwischen 5000 und 10000 Zellen analysiert und die Rohdaten bestehend aus den linear verstärkten „Forward-“ und „Side Scatter“ Signalen, sowie drei logarithmisch verstärkten Fluoreszenzsignalen im Listendateiformat (*.lmd) gespeichert. Zum Ausschluss unspezifischer Färbung und zum Setzen der Analysefenster wurden Isotypkontrollen durchgeführt. Die Datenauswertung erfolgte mit der frei erhältlichen Software WinMDI Version 2.8.

2.8 Statistische Auswertung

Die Streuung der Mittelwerte ist prinzipiell als Standardfehler angegeben. Unterschiede zwischen den Stichproben (Patienten an konsekutiven Tagen versus Kontrollen) wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse für parametrische (ANOVA) bzw. nicht-parametrische Daten (Kruskal-Wallis Rangsummen-ANOVA) erfasst. Die minimal geforderte Signifikanz für die anschließend paarweise durchgeführten Mehrfachvergleiche war für $p<0,05$ (*) definiert. Präsentiert werden die Ergebnisse über Boxplots als Prozent positive Zellen und z. T. über Liniendiagramme als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) zur indirekten Abschätzung des Expressionsgrades. Die Boxplots zeigen den Median (durchgezogene Linie in der Box), die Quartile und die Extremwerte. Die Box stellt den Interquartilbereich mit 50% der Werte dar, die von der Box ausgehenden Linien führen bis zur 5.-95. Perzentile. Die maximalen Werte werden ober- und unterhalb der Linie jeweils als Einzelpunkte ausgegeben, die lineare Regressionsanalyse indiziert den Verlauf.

3 Ergebnisse

3.1 Messungen zur Differenzierung von Lymphozytensubpopulationen

3.1.1 CD4+ Lymphozyten

Der prozentuale Anteil der CD4+ Lymphozyten, der sogenannten T-Helferzellen, an der Gesamtpopulation der Lymphozyten, beträgt in der gesunden Kontrollgruppe im Mittel $51,75 \pm 1,62\%$. Nach Verbrennung bleibt die relative Häufigkeit der CD4+ Zellen mit Werten von $43,73 \pm 4,24\%$ am Tag 1 und $47,35 \pm 1,62\%$ am Tag 10 auf Kontrollniveau (Abb. 2). Auch nach Mehrfachverletzung zeigt der Anteil der CD4+ Zellen keinerlei statistisch relevante Veränderungen im Vergleich zur gesunden Referenz ($43,10 \pm 4,46\%$ am Tag 1 und $47,48 \pm 5,50\%$ am Tag 10) (Abb. 3).

Die Expressionsdichte des CD4 Antigens, dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), sind sowohl für die Gruppe der Schwerbrandverletzten ($42,81 \pm 3,81$ MFI am Tag 1 und $47,24 \pm 2,90$ MFI am Tag 10) (Abb. 3), als auch für das Kollektiv der Polytraumapatienten ($42,47 \pm 5,70$ MFI am Tag 1 bzw. $37,34 \pm 11,51$ MFI am Tag 10) keine signifikanten Veränderungen nachweisbar, verglichen mit Kontrollen ($45,12 \pm 2,15$ MFI) (Abb. 3).

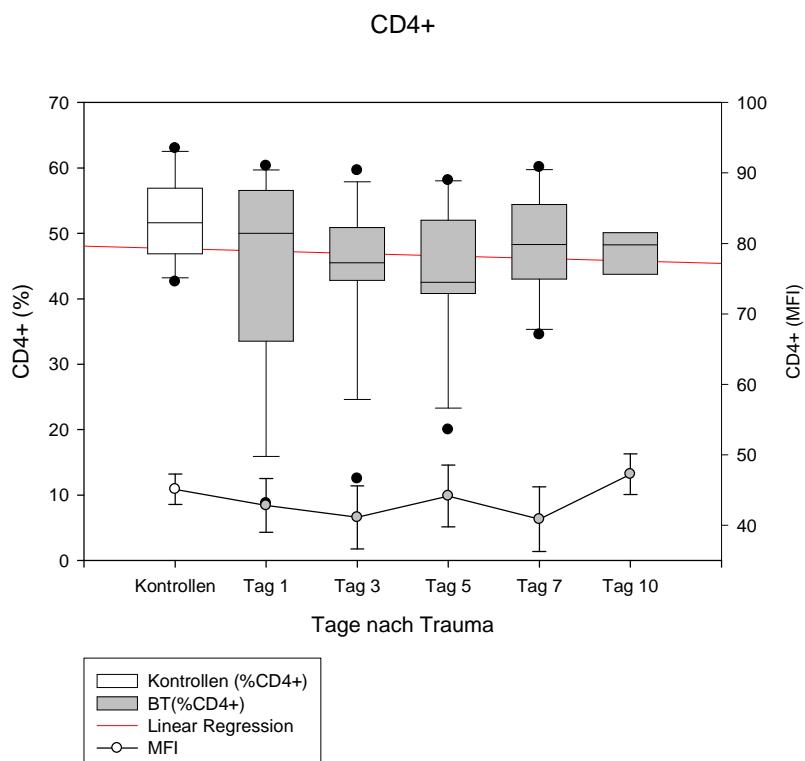


Abb. 2 Frequenz der CD4+ T-Lymphozyten und CD4-Expression im Schwerverbranntenkollektiv

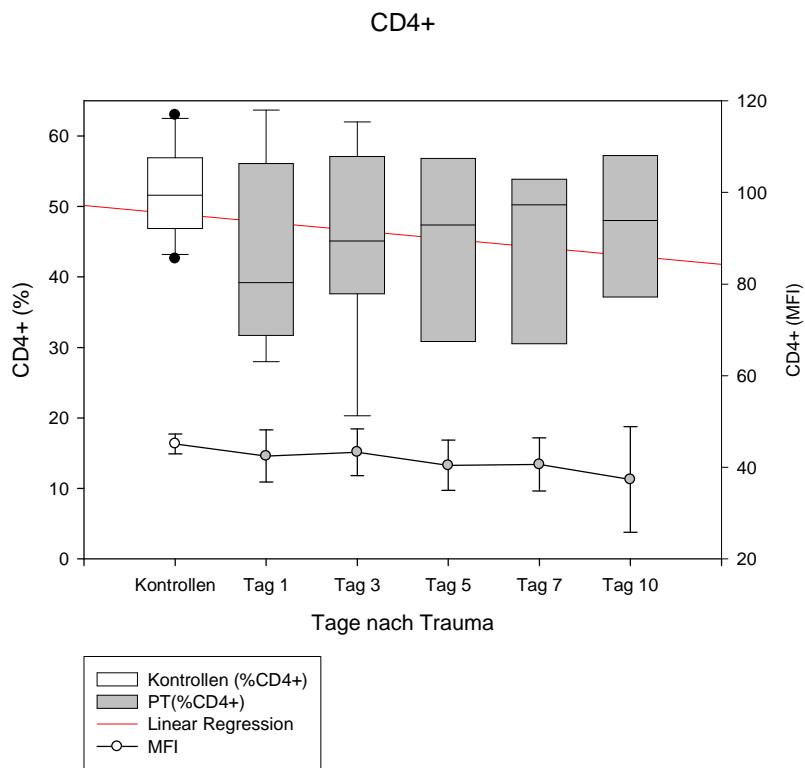


Abb. 3 Frequenz der CD4+ T-Lymphozyten und CD4-Expression im Polytraumakollektiv

3.1.2 CD8+ Lymphozyten

CD8+ Lymphozyten, die im Allgemeinen auch als zytotoxische T-Zellen (CTL) bezeichnet werden, zeigen im Kontrollkollektiv eine Frequenz von $29,27 \pm 1,78\%$. Patienten mit Verbrennungsverletzungen weisen eine verminderte Frequenz auf mit signifikant verminderten Werten an den Tagen 5 ($19,60 \pm 2,76\%$), 7 ($18,56 \pm 2,14\%$) und 10 ($18,15 \pm 3,53\%$) (Abb. 4). Ebenso zeigte die prozentuale Analyse der CD8+ Zellen nach Polytrauma eine, wenn auch geringere Abnahme an allen Tagen gegenüber den Kontrollen, mit signifikanten $20,58 \pm 1,91\%$ am Tag 5 (Abb. 5).

Die mittlere Fluoreszenzintensität des CD8+ Rezeptors liegt sowohl in der Gruppe der Brandverletzten mit Werten von $850,19 \pm 114,27$ MFI am Tag 1 und $1271,98 \pm 132,40$ MFI am Tag 10 (Abb. 4), als auch im Polytraumakollektiv (Tag 1: $1005,66 \pm 149,81$ MFI, Tag 10: $1133,28 \pm 151,66$ MFI) im Bereich der Kontrollen, die Werte von $1139,14 \pm 117,51$ MFI aufweisen (Abb. 5).

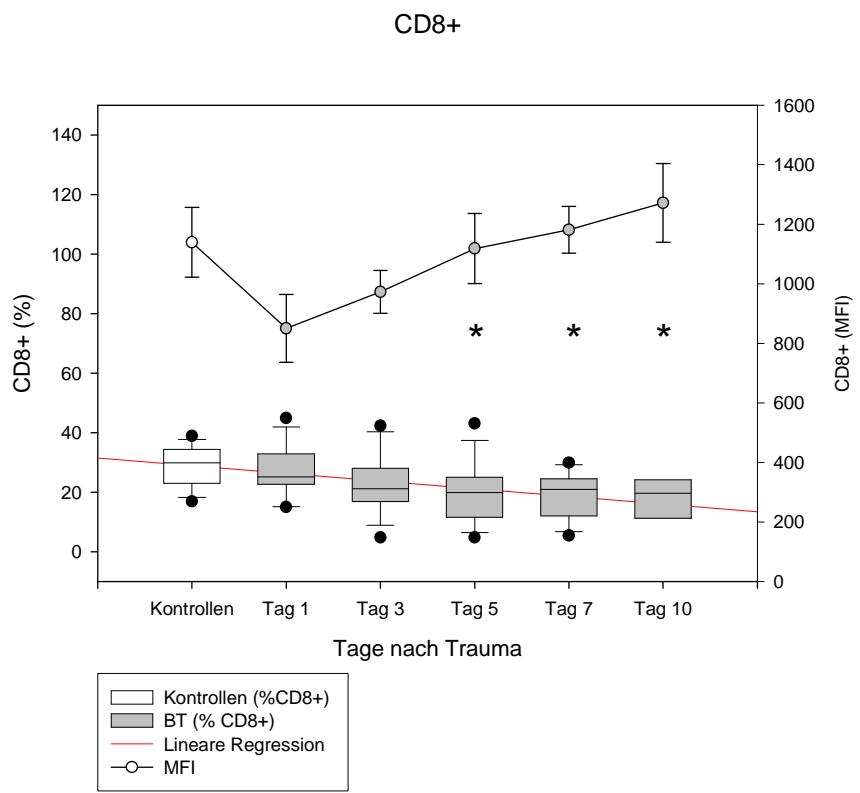


Abb. 4 Frequenz der CD8+ T-Lymphozyten und CD8-Expression im Schwerverbranntenkollektiv, * $p<0,05$ vs. Kontrollen

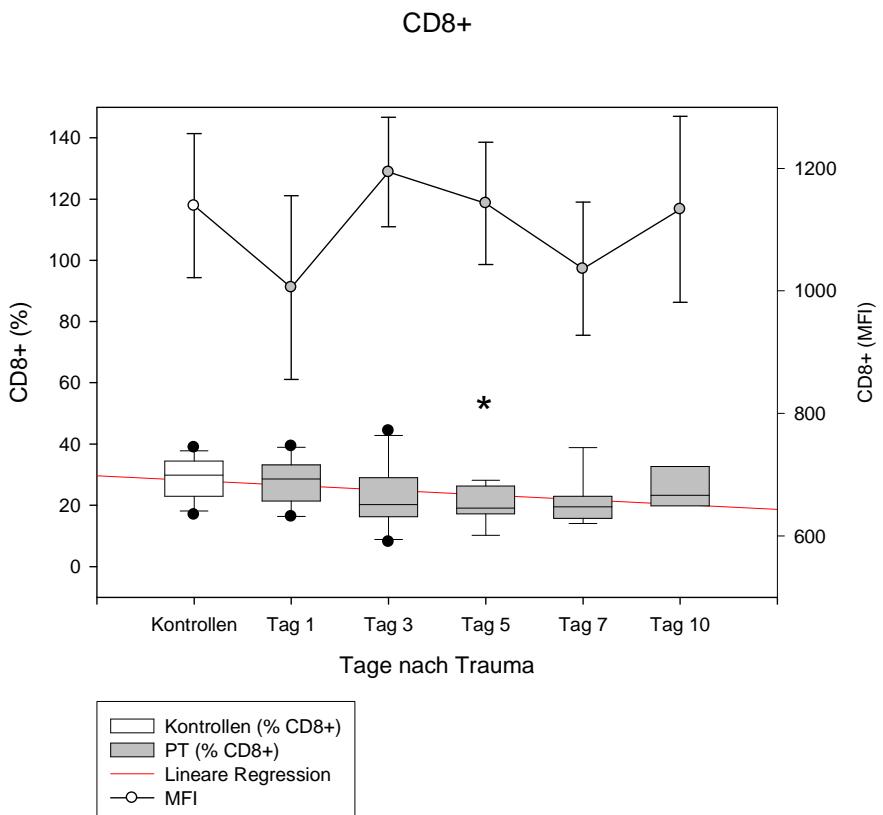


Abb. 5 Frequenz der CD8+ T-Lymphozyten und CD8-Expression im Polytraumakollektiv, * $p<0,05$ vs. Kontrollen

3.1.3 Ratio CD4+/CD8+ Lymphozyten

Das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Lymphozyten zeigte im Schwerverbranntenkollektiv eine tendenzielle, nicht signifikante Zunahme von $2,26 \pm 0,49$ an Tag 1 auf $3,63 \pm 0,95$ an Tag 7 gegenüber $1,90 \pm 0,81$ bei Gesundkontrollen (Abb.7).

Die Ratio der CD4+ zu CD8+ Lymphozyten lag im Kollektiv der polytraumatisierten Patienten zu jedem Zeitpunkt im Bereich der Gesundkontrollen. Das Kontrollkollektiv wies Werte von $1,90 \pm 0,81$ auf. An Tag 1 lag die CD4+/CD8+ Ratio bei polytraumatisierten Patienten bei $1,56 \pm 0,35$, an Tag 7 bei $2,31 \pm 0,45$ (Abb.8).

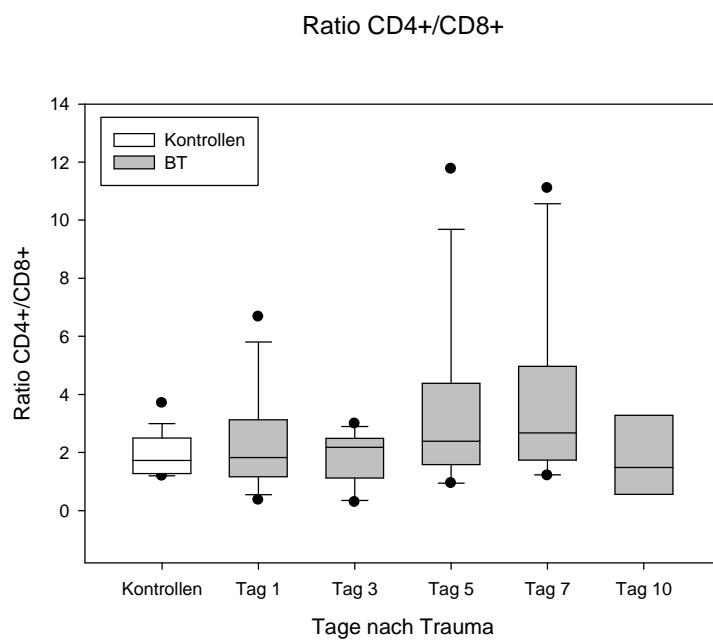


Abb. 7 Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Lymphozyten im Schwerverbranntenkollektiv

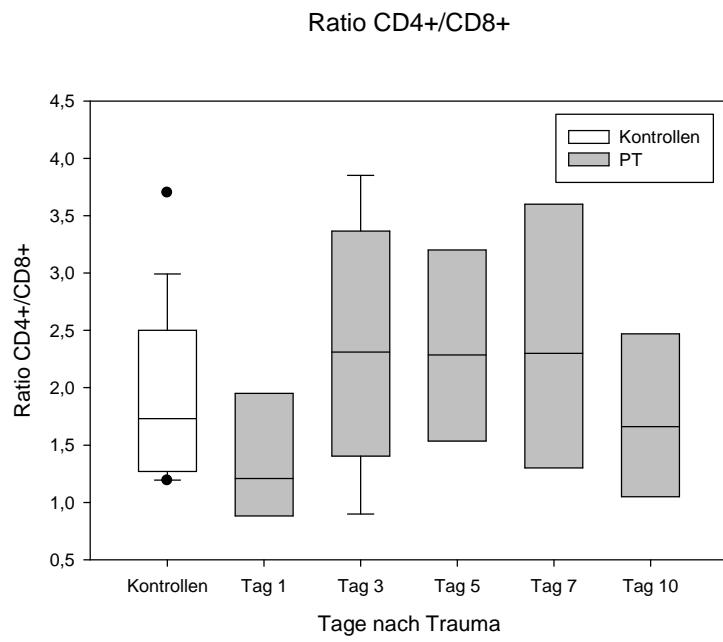


Abb. 8 Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Lymphozyten im Polytraumakollektiv

3.1.4 CD4+CD8+ Lymphozyten

Der prozentuale Anteil von CD4+/CD8+ T-Lymphozyten ist im Vergleich zu den Gesundkontrollen, die eine Frequenz von $0,5 \pm 0,05\%$ aufwiesen, bei den Schwerbrandverletzten mit Werten von $0,55 \pm 0,11\%$ am Tag 1 und $0,48 \pm 0,15\%$ am Tag 10 zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert (Abb. 6). Das Kollektiv der Polytraumapatienten zeigte zwar leicht erhöhte Werte (Tag 1: $1,08 \pm 0,25\%$, Tag 10: $0,96 \pm 0,19\%$), diese ergeben jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 7).

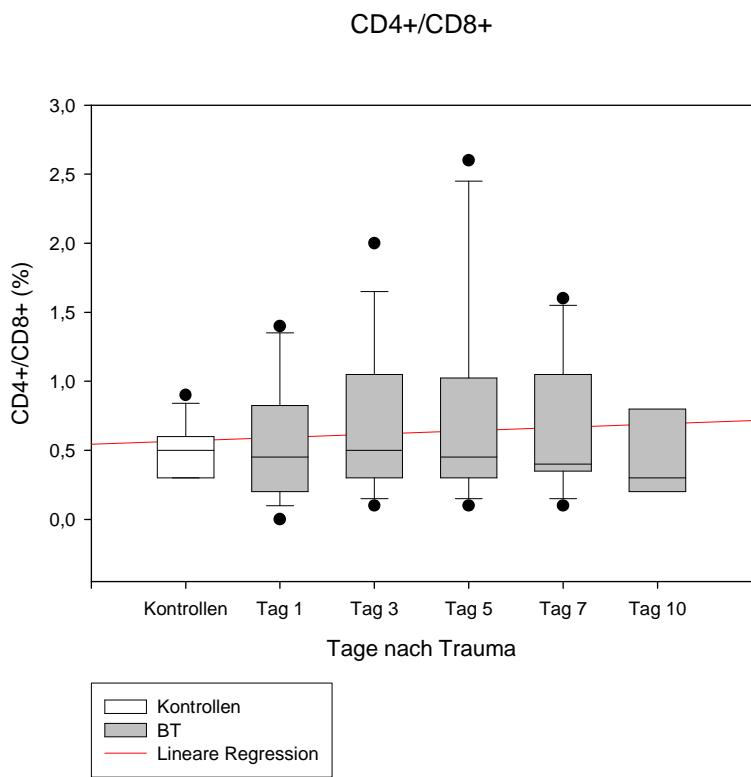


Abb. 6 Frequenz der CD4+/CD8+ T-Lymphozyten im Schwerverbranntenkollektiv

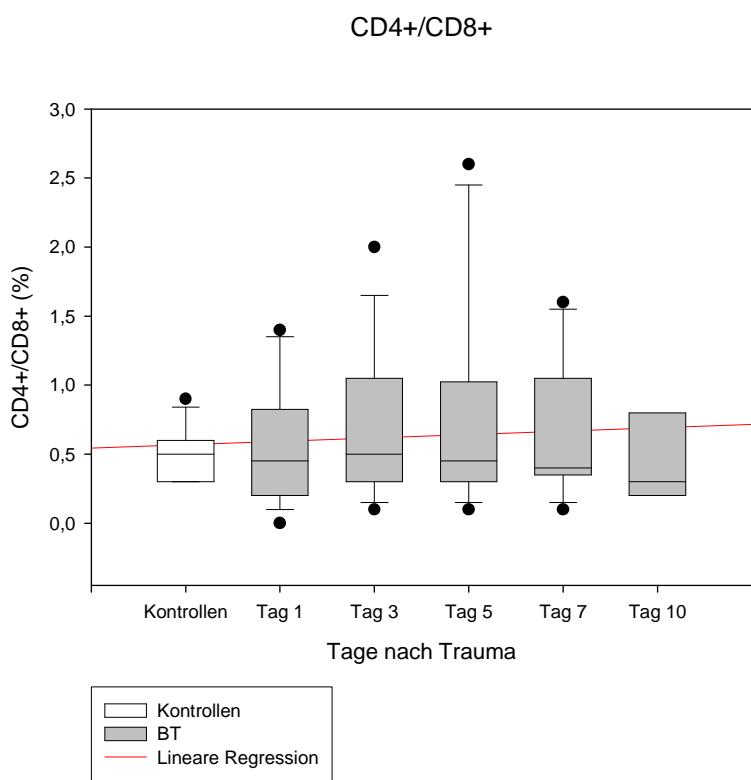


Abb. 7 Frequenz der CD4+/CD8+ T-Lymphozyten im Polytraumakollektiv

3.1.5 CD56+ Zellen

Innerhalb der CD56+ Zellen lässt sich im posttraumatischen Verlauf in der Gruppe der Brandverletzten prozentual eine kontinuierliche Abnahme von $8,56 \pm 1,72\%$ am Tag 1, über $6,81 \pm 1,51\%$ am Tag 5, zu $4,48 \pm 1,99\%$ am Tag 10 nachweisen (Abb. 8). Signifikant verändert im Vergleich zu gesunden Kontrollen, die einen Mittelwert von $9,20 \pm 1,12\%$ aufwiesen, war Tag 10. Im Kollektiv der polytraumatisierten Patienten ergibt sich posttraumatisch ein uneinheitliches Bild, von Werten von $12,95 \pm 2,61\%$ am Tag 1, über $6,16 \pm 1,25\%$ am Tag 3, bis zu $11,4 \pm 2,76\%$ am Tag 10. Diese ergeben zu keinem Zeitpunkt eine statistische Signifikanz (Abb. 9).

Die Expressionsdichte (MFI) des CD56+ Antigens zeigt ebenfalls uneinheitliche Verläufe. So bleibt diese bei den Brandverletzten Patienten mit Ausnahme des ersten Tages, der mit $23,25 \pm 1,08$ MFI signifikant gegenüber den Gesundkontrollen mit Werten von $30,56 \pm 2,00$ MFI erniedrigt ist (Abb. 8), auf annähernd gleichem Niveau (Tag 3: $30,75 \pm 2,52$ MFI, Tag 10: $33,70 \pm 3,34$ MFI), während die Expression des CD56+ Antigens in der Polytraumagruppe kontinuierlich von $28,53 \pm 2,09$ MFI am Tag 1 bis auf signifikante $45,87 \pm 5,87$ MFI am Tag 7 gesteigert wird (Abb. 9).

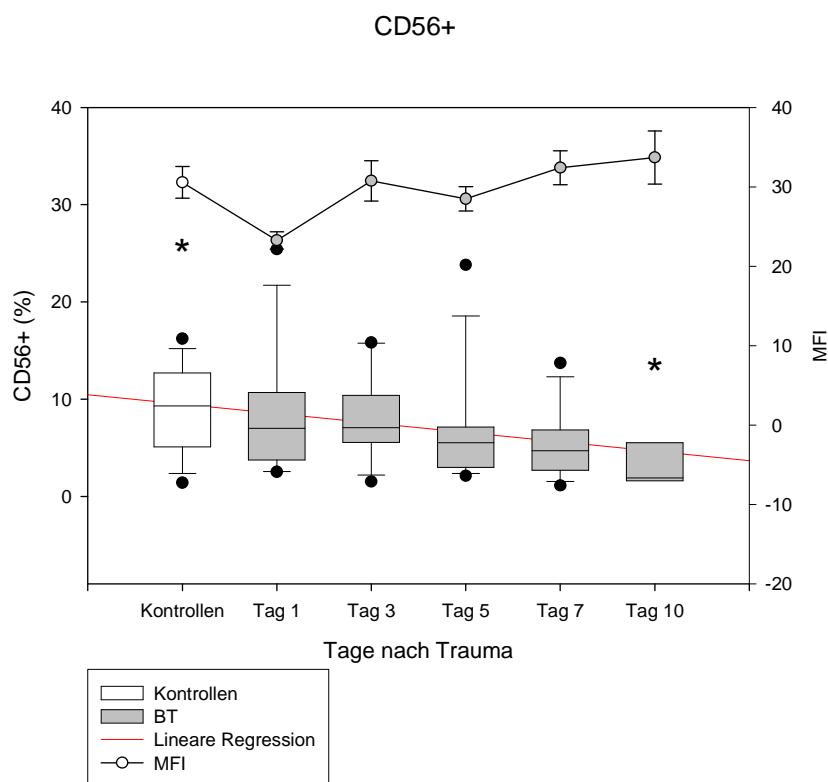


Abb. 8 Frequenz der CD56+ NK-Zellen und CD56-Expression im Schwerverbranntenkollektiv, * $p<0,05$ vs. Kontrollen

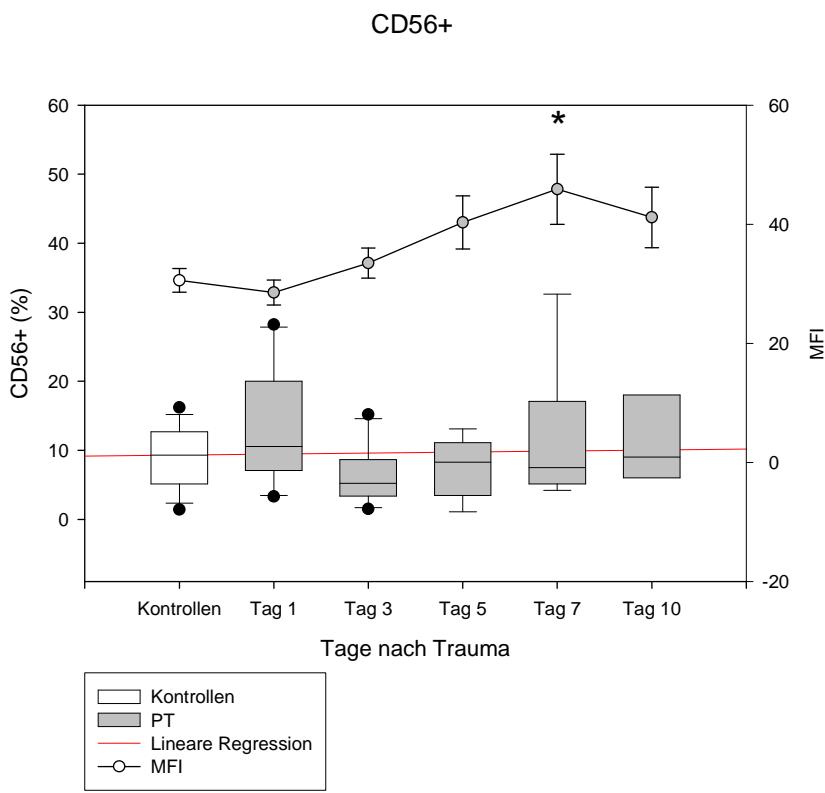


Abb. 9 Frequenz der CD56+ NK-Zellen und der CD56-Expression im Polytraumakollektiv, *p<0,05 vs. Kontrollen

3.1.6 CD4+CD56+ Lymphozyten

Der prozentuale Anteil der CD4+/CD56+ T-Lymphozyten stieg posttraumatisch, ausgehend von $0,46 \pm 0,15\%$ bei Gesundkontrollen, sowohl in der Brandverletzengruppe (Tag 1: $3,65 \pm 3,21\%$, Tag 10: $1,75 \pm 1,32\%$) (

Abb. 10), als auch in dem Kollektiv der Patienten, die ein Polytrauma erlitten hatten, (Tag 1: $0,72 \pm 0,16\%$, Tag 10: $1,58 \pm 0,60\%$) (Abb. 11), nur leicht, nicht aber signifikant an.

Die mittlere Fluoreszenzintensität zeigte ebenfalls gegenüber einem Ausgangswert von $21,04 \pm 2,00$ MFI im Gesundkollektiv für beide Patientengruppen keine signifikante Veränderung. Die Schwerbrandverletzten wiesen Werte zwischen $17,57 \pm 2,29$ MFI am Tag 1 und $26,27 \pm 3,29$ MFI am Tag 3 auf (

Abb. 10). Die Expressionsdichte des CD56+ Antigens auf CD4+ Zellen ergab bei polytraumatisierten Patienten einen kontinuierlich leichten Anstieg von $22,92 \pm 3,64$ MFI am Tag 1, bis auf $32,82 \pm 9,37$ MFI am Tag 10 (Abb. 11).

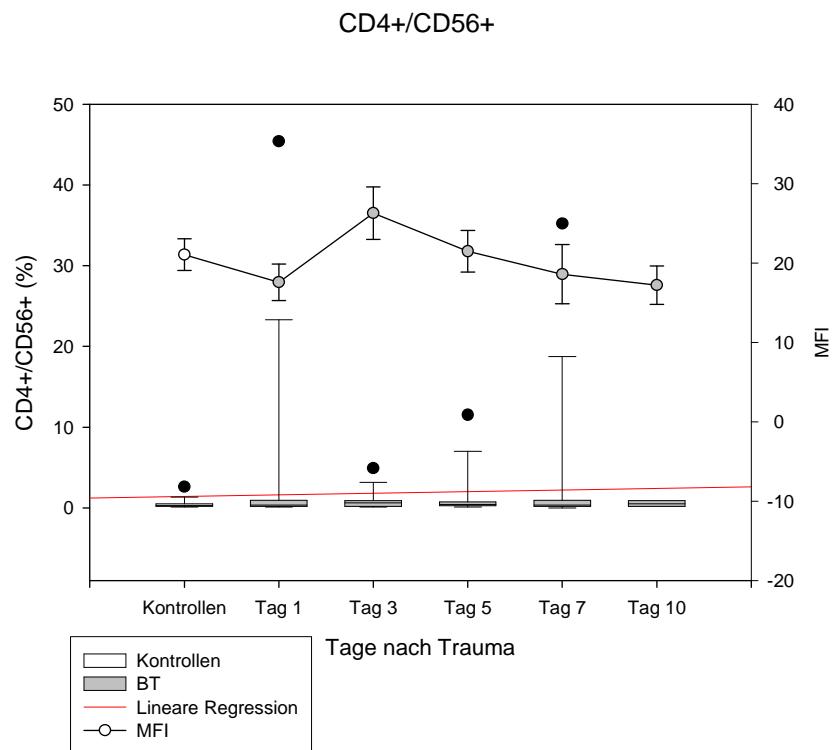


Abb. 10 Frequenz der CD4+/CD56+ T-Lymphozyten im Schwerverbranntenkollektiv

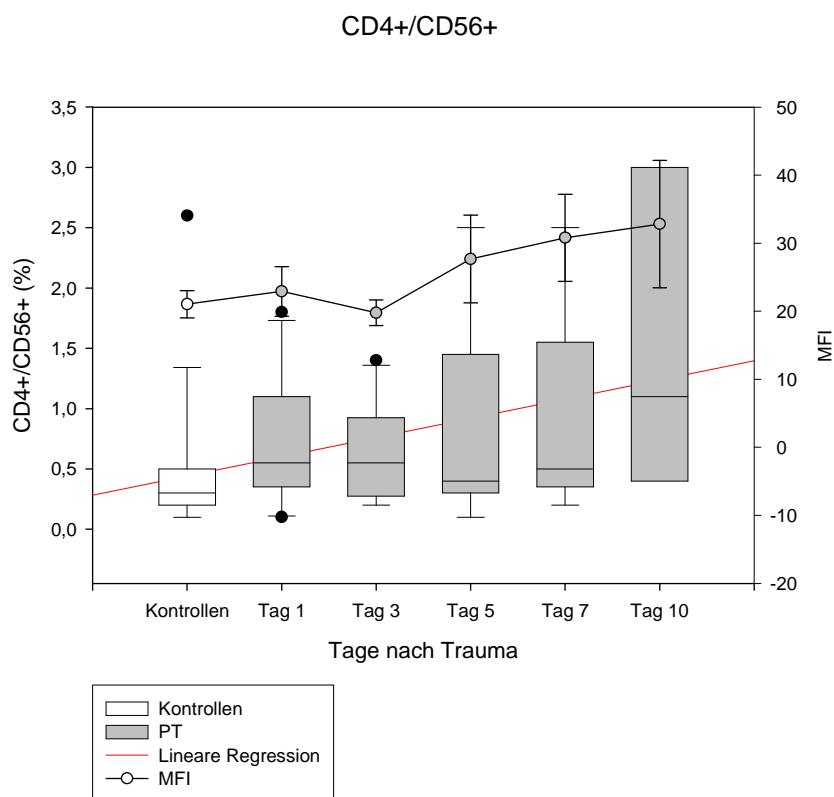
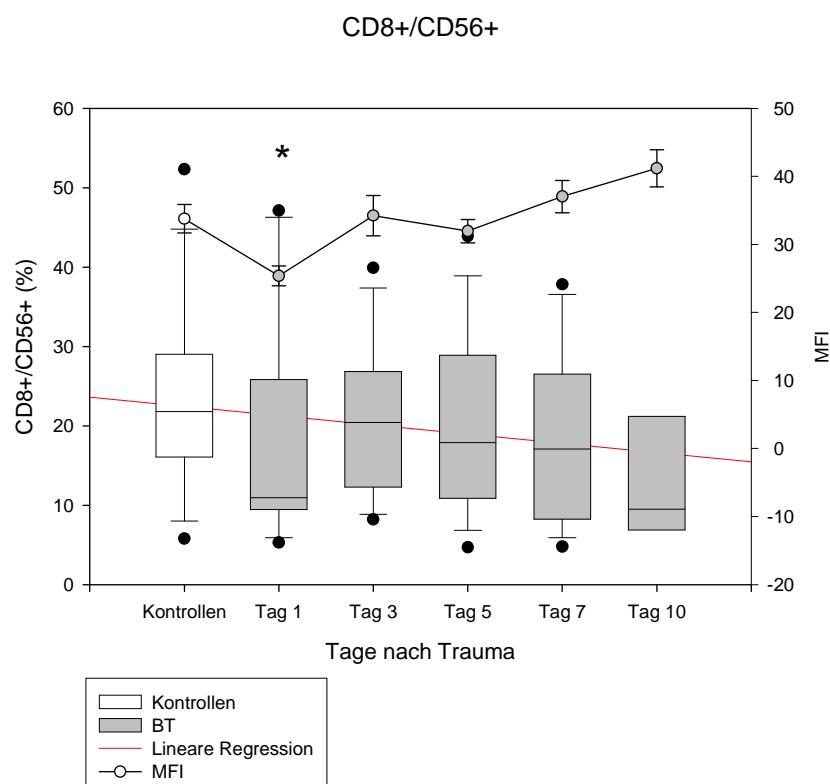


Abb. 11 Frequenz der CD4+/CD56+ T-Lymphozyten im Polytraumakollektiv

3.1.7 CD8+CD56+ Lymphozyten

Die Frequenz der CD8+/CD56+ Zellen war ausgehend von $23,37 \pm 3,21\%$ im Gesundkollektiv nur leichten und zu keinem Zeitpunkt signifikanten Veränderungen in den beiden Patientengruppen unterlegen. Die Gruppe der Brandverletzten variierte von $21,10 \pm 2,54\%$ am Tag 3 bis $14,55 \pm 4,36\%$ am Tag 10 (Abb. 12). Patienten nach Polytrauma wiesen Werte zwischen $18,69 \pm 6,79\%$ am Tag 3 und $31,35 \pm 6,79\%$ am Tag 7 auf (Abb. 13).

Das CD56+ Antigen wurde auf CD8+ Lymphozyten im Vergleich zu Gesundkontrollen, die eine mittlere Expressionsdichte von $33,77 \pm 2,10$ MFI zeigten, in beiden Patientengruppen kontinuierlich hochreguliert. Das Kollektiv der Schwerbrandverletzten zeigte hierbei zunächst am Tag 1 einem mit $25,37 \pm 1,44$ MFI signifikant erniedrigten Wert. Im Verlauf stieg die mittlere Fluoreszenzintensität von $34,22 \pm 2,96$ MFI am Tag 3 auf $41,18 \pm 2,73$ MFI am Tag 10, jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant (Abb. 12). Bei Patienten, die ein Polytrauma erlitten hatten, stieg die mittlere Expressionsdichte von $29,81 \pm 2,46$ MFI am Tag 1 auf signifikant erhöhte $46,82 \pm 5,58$ MFI an Tag 7 (Abb. 13).



**Abb. 12 Frequenz der CD8+/CD56+ T-Lymphozyten im Schwerverbranntenkollektiv,
* $p<0,05$ vs. Kontrollen**

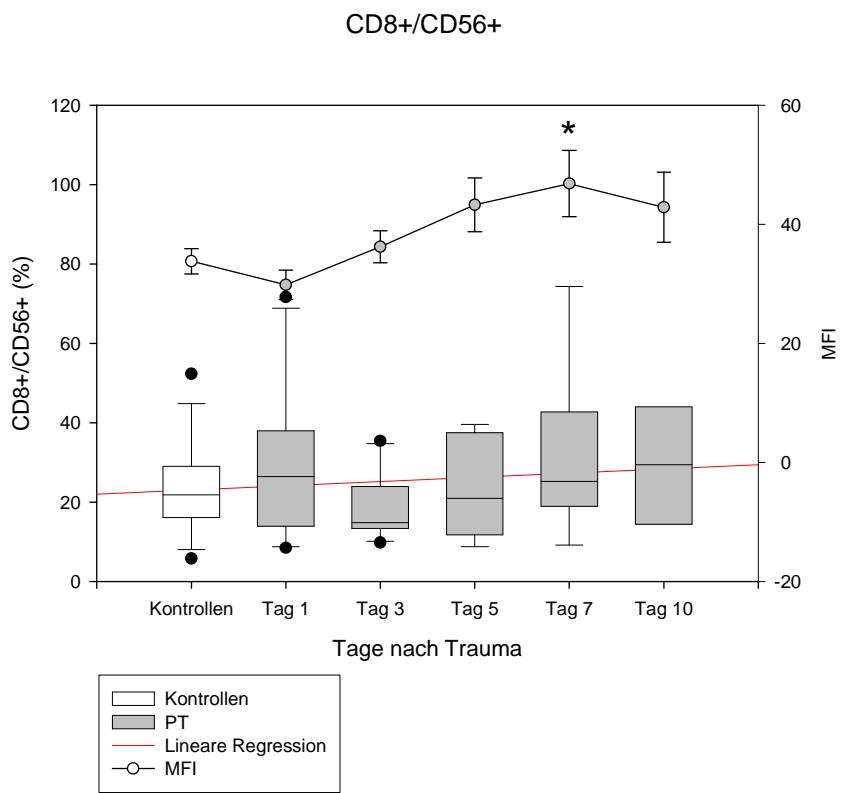


Abb. 13 Frequenz der CD8+/CD56+ T-Lymphozyten im Polytraumakollektiv, *p<0,05 vs. Kontrollen

3.2 Intrazelluläre Messungen zur Bestimmung des zytotoxischen Potenzials verschiedener Lymphozytensubpopulationen

3.2.1 CD4+/Perforin-FITC+ Lymphozyten

Der prozentuale Anteil der Perforin+ / CD4+ Lymphozyten, detektiert mit einem FITC fluorochromierten Antikörper, betrug im Gesundkollektiv $0,79 \pm 0,17\%$. Patienten, die eine schwere Verbrennung erlitten hatten, zeigten erhöhte Werte mit $1,90 \pm 0,55\%$ am Tag 1 bis $1,18 \pm 0,52\%$ am Tag 10 (Abb. 14). Eine statistische Signifikanz ergab sich jedoch nicht. Polytraumatisierte Patienten dagegen wiesen eine wesentlich höhere Frequenz an CD4+/Perforin-FITC+ Zellen auf, mit signifikant erhöhten Werten an den Tagen 5 ($3,75 \pm 1,40\%$), 7 ($4,05 \pm 1,47\%$) und 10 ($5,92 \pm 2,16\%$) (Abb. 15). Die Expressionsdichte von Perforin-FITC in CD4+ T-Lymphozyten lag in beiden Patientengruppen im Bereich des Kontrollkollektivs mit $12,21 \pm 1,32$ MFI. Schwerbrandverletzte zeigten eine Expression von $10,92 \pm 1,22$ MFI am Tag 1 und $18,60 \pm 4,43$ MFI am Tag 3 (Abb. 14), Polytraumapatienten am Tag 1 $12,52 \pm 1,67$ MFI und am Tag 10 $22,46 \pm 6,97$ MFI (Abb. 15).

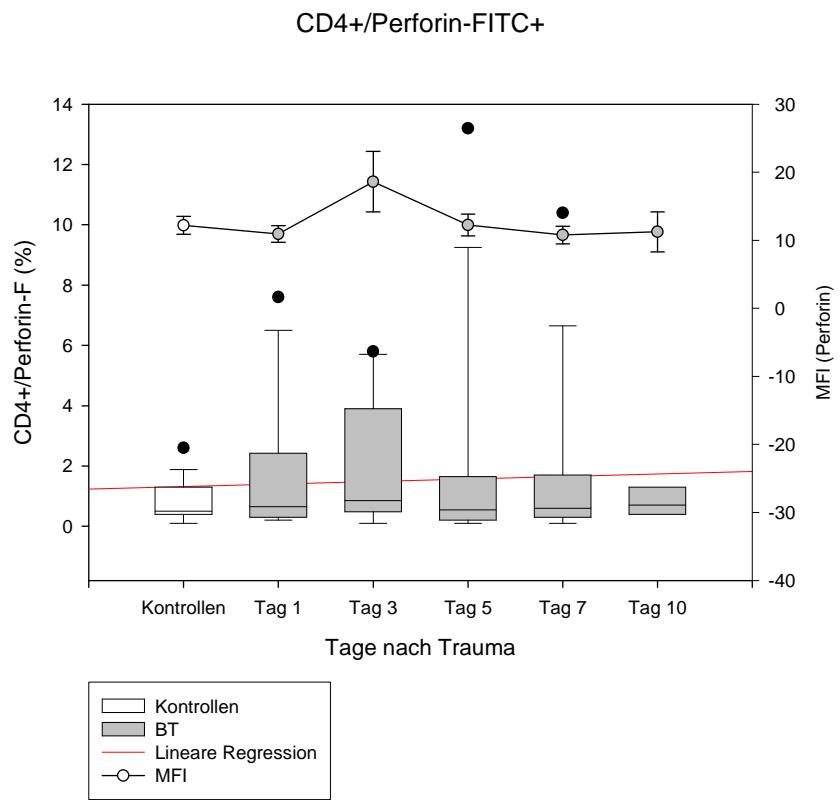


Abb. 14 Frequenz der CD4+/Perforin+ T-Lymphozyten im Schwerverbranntenkollektiv

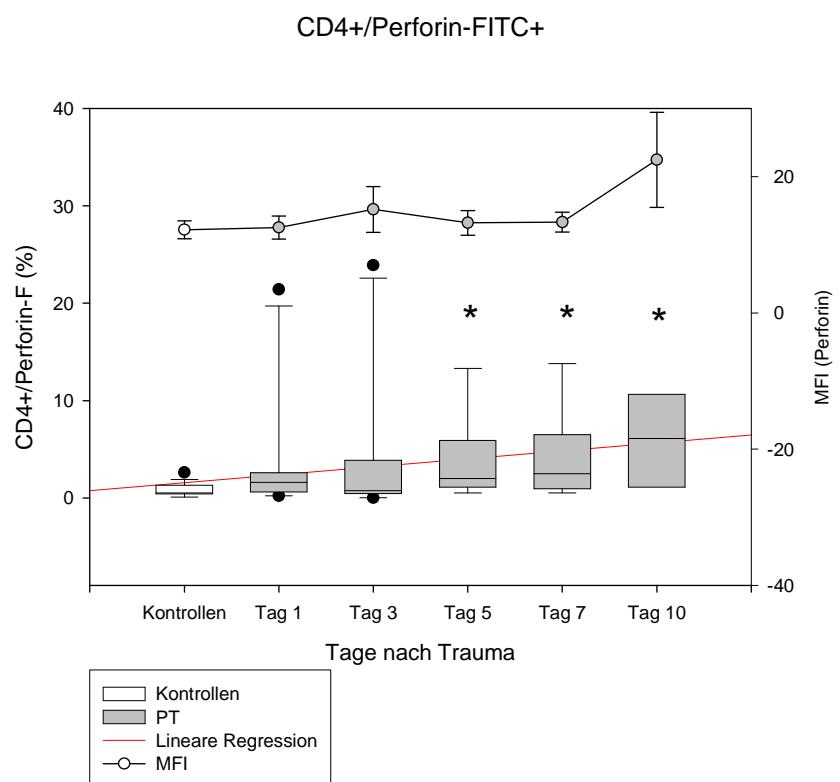


Abb. 15 Frequenz der CD4+/Perforin+ T-Lymphozyten im Polytraumakollektiv, p<0,05 vs. Kontrollen

3.2.2 CD4+/Perforin-PE+ Lymphozyten

Zur Untersuchung der Perforin Expression von CD4+ Zellen wurde auch ein PE markierter Antikörper verwendet. Die Analysen zeigten erwartungsgemäß mit dem FITC-Konjugat vergleichbare Ergebnisse. Gesunde Probanden wiesen im Mittel einen prozentualen Anteil von $0,86 \pm 0,16\%$ CD4+/Perforin-PE+ Lymphozyten auf. In der Gruppe der Patienten mit Brandverletzungen stieg der Anteil dieser Zellen auf $1,44 \pm 0,52$ am Tag 10 und $2,65 \pm 1,17\%$ am Tag 5 (Abb. 16). Eine statistische Signifikanz ergab sich nicht. Polytraumatisierte Patienten wiesen wiederum eine höhere Frequenz auf, mit Werten von $3,26 \pm 1,35\%$ am Tag 5 bis auf signifikant erhöhte $4,44 \pm 1,49\%$ am Tag 7 (Abb. 17). Die Expression von Perforin an den gemessenen konsekutiven Tagen lag im Bereich des Kontrollkollektives mit $22,54 \pm 2,45$ MFI. Brandverletzte zeigten Werte von $18,02 \pm 1,99$ MFI am Tag 1 bis $28,41 \pm 2,99$ MFI am Tag 7 (Abb. 16), Polytraumatisierte von $23,71 \pm 2,26$ MFI am Tag 1 bis $30,52 \pm 4,07$ MFI am Tag 10 (Abb. 17).

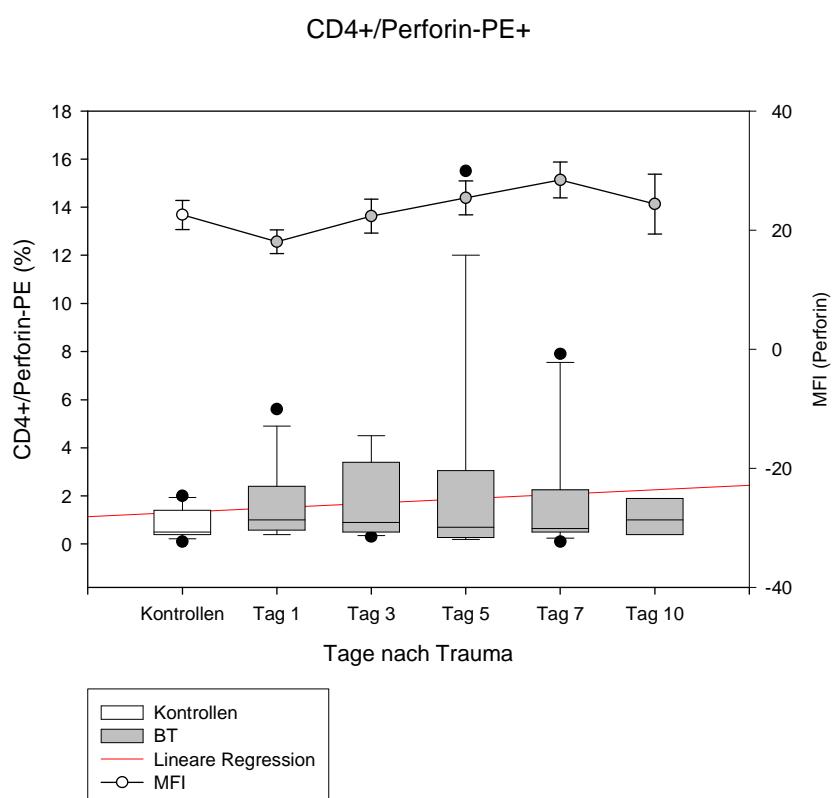


Abb. 16 Frequenz der CD4+/Perforin+ T-Lymphozyten im Schwererverbranntenkollektiv

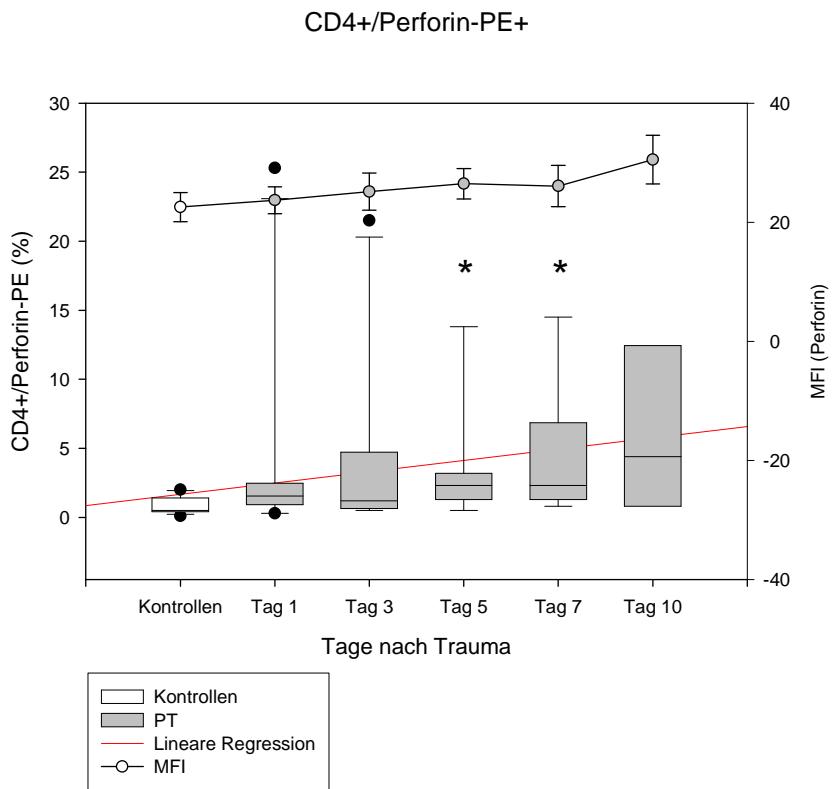


Abb. 17 Frequenz der CD4+/Perforin+ T-Lymphozyten im Polytraumakollektiv, p<0,05 vs. Kontrollen

3.2.3 CD4+/Granzym-B+ Lymphozyten

Die Analyse der CD4+/Granzym-B+ T-Lymphozyten ergab für die gesunde Referenzgruppe einen prozentualen Anteil von $0,72 \pm 0,22\%$. Im posttraumatischen Verlauf zeigten sich erhöhte, aber nicht signifikante, Werte in der Patientengruppe, die eine Verbrennung erlitten hatte, mit $1,92 \pm 0,89\%$ am Tag 1, $2,51 \pm 1,13\%$ am Tag 5 und $1,81 \pm 0,75\%$ am Tag 10 (Abb. 18). Patienten, die eine schwere mechanische Verletzung erlitten hatten, wiesen dagegen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Werte auf, mit $4,21 \pm 2,42\%$ am Tag 1, $4,44 \pm 1,88\%$ am Tag 7 und $7,22 \pm 3,43\%$ am Tag 10 (Abb. 19).

Granzym-B wurde von CD4+ Lymphozyten bei gesunden Kontrollen mit einem Wert von $11,42 \pm 1,99$ MFI exprimiert. Diese Expressionsdichte lag im Kollektiv der Schwerbrandverletzten im Bereich der Gesundkontrollen, mit $13,47 \pm 2,49$ MFI am Tag 1 nach Verbrennung und $9,54 \pm 1,48$ MFI am Tag 10 (Abb. 18). Bei polytraumatisierten Patienten zeichnete sich mit $17,77 \pm 3,11$ MFI am Tag 1, $20,32 \pm 3,00$ MFI am Tag 7 und

$26,22 \pm 8,03$ MFI am Tag 10 eine tendenziell zunehmende Expression ab, die jedoch keine Signifikanz erlangte (Abb. 19).

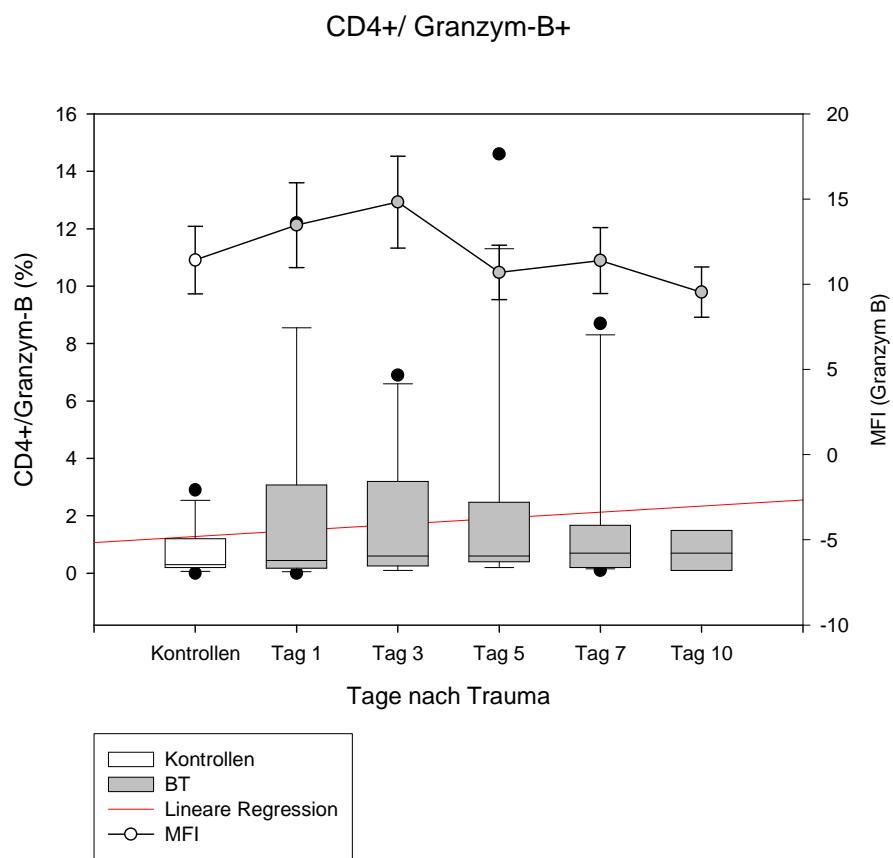


Abb. 18 Frequenz der CD4+/Granzym-B+ T-Lymphozyten und Granzym-B Expression im Schwerverbranntenkollektiv

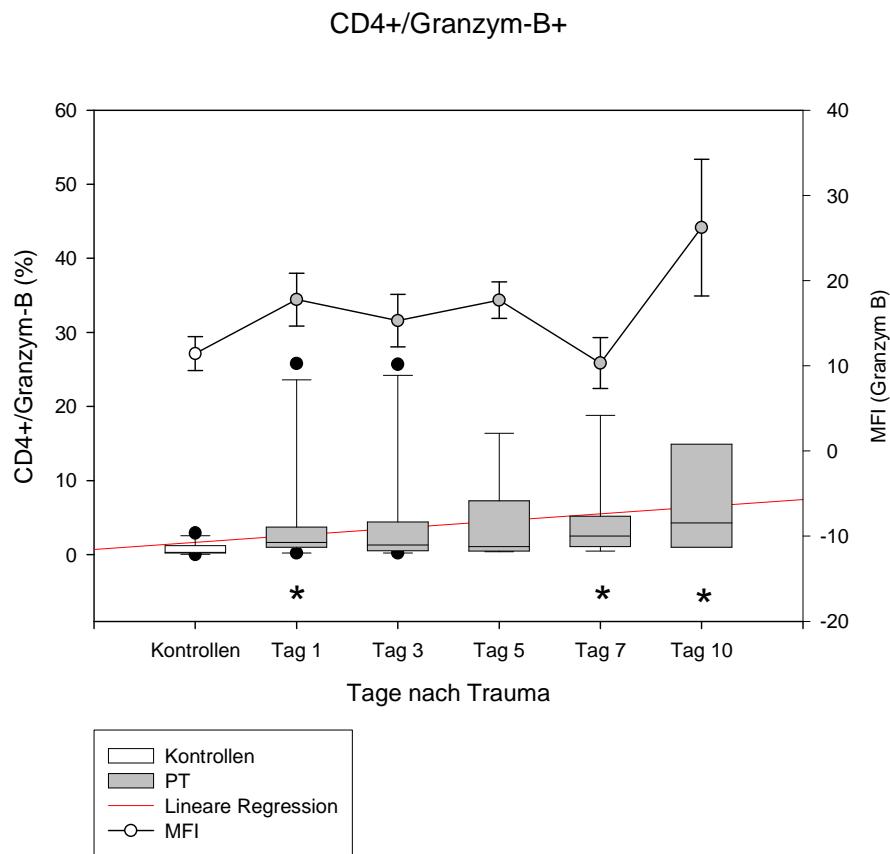


Abb. 19 Frequenz der CD4+/Granzym-B+ T-Lymphozyten und Granzym-B Expression im Polytraumakollektiv, * $p<0,05$ vs. Kontrollen

3.2.4 CD4+/Perforin+/Granzym-B+ Lymphozyten

Die Frequenz der CD4+ T-Zellen, die sowohl Perforin, als auch Granzym-B in intrazellulären Granula enthielten, ergab für die Gruppe der gesunden Probanden einen prozentualen Wert von $0,36 \pm 0,13\%$. Nach Trauma stieg der Anteil dieser zytotoxischen Zellen in dem Kollektiv der Brandverletzten, jedoch nicht signifikant, von $0,85 \pm 0,39\%$ am Tag 1 auf $2,16 \pm 1,04\%$ am Tag 5 und fiel dann wieder auf einen Wert von $0,97 \pm 0,70\%$ am Tag 10 (Abb. 20).

Polytraumatisierte Patienten zeigten eine stärkere Erhöhung mit einem prozentualen Ergebnis von $3,18 \pm 2,39\%$ am Tag 1 und signifikant erhöhten $3,31 \pm 1,45\%$ am Tag 7 und $6,46 \pm 3,27\%$ am Tag 10 (Abb. 21).

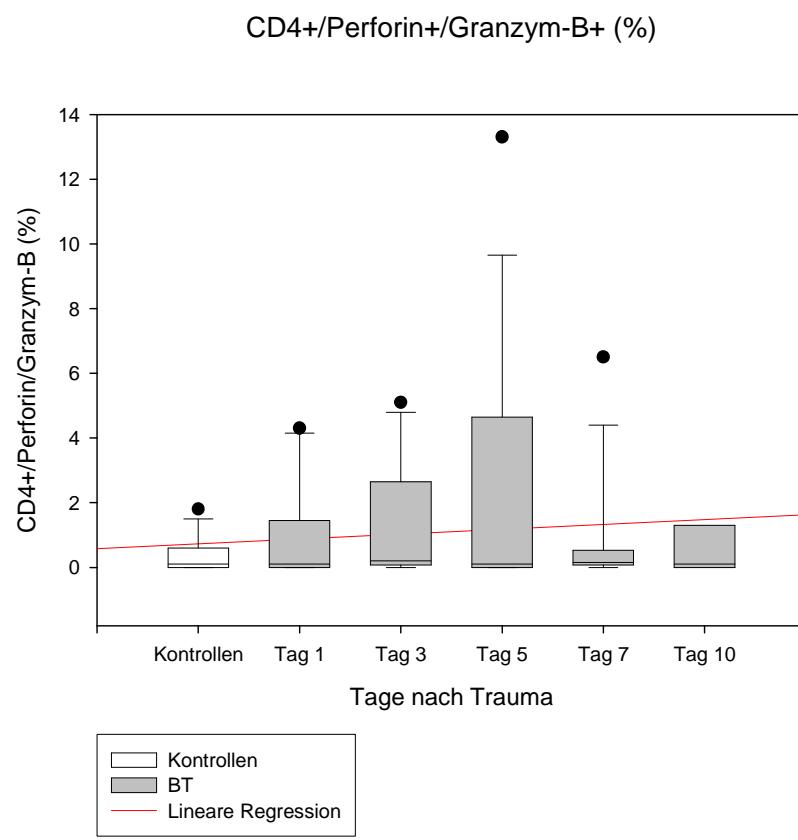


Abb. 20 Frequenz der CD4+/Perforin+/Granzym-B+ T-Lymphozyten im Schwerverbranntenkollektiv

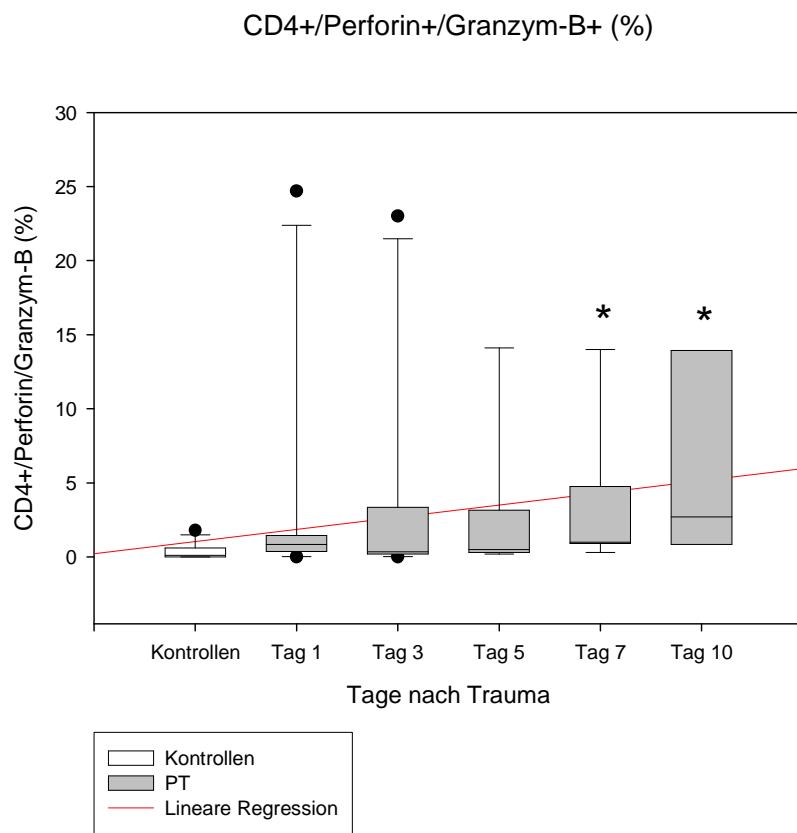


Abb. 21 Frequenz der CD4+/Perforin+/Granzym-B+ T-Lymphozyten im Polytraumakollektiv, *p<0,05 vs. Kontrollen

3.2.5 CD8+/Perforin+ Lymphozyten

Innerhalb der CD8+ T-Lymphozyten Subpopulation, die Perforin als zytotoxischen Marker enthielten, zeigte sich in dem Kollektiv der Gesundkontrollen ein Anteil von $34,26 \pm 6,29\%$. Der prozentuale Anteil CD8+/Perforin+ Zellen nahm bei schwerbrandverletzten Patienten nach anfänglicher Stagnation auf Kontrollniveau (Tag 1: $33,56 \pm 7,10\%$, Tag 5: $35,81 \pm 8,64\%$) leicht ab, zeigte aber keine statistische Signifikanz (Tag 10: $26,15 \pm 9,07\%$) (Abb. 22).

Nach Mehrfachverletzung sahen wir im Verlauf eine kontinuierliche Zunahme ohne statistische Signifikanz der CD8+/Perforin+ T-Zellen mit Werten von $36,10 \pm 9,06\%$ am Tag 3, $50,10 \pm 7,28\%$ am Tag 5 und $60,75 \pm 2,70\%$ am Tag 10 (Abb. 23).

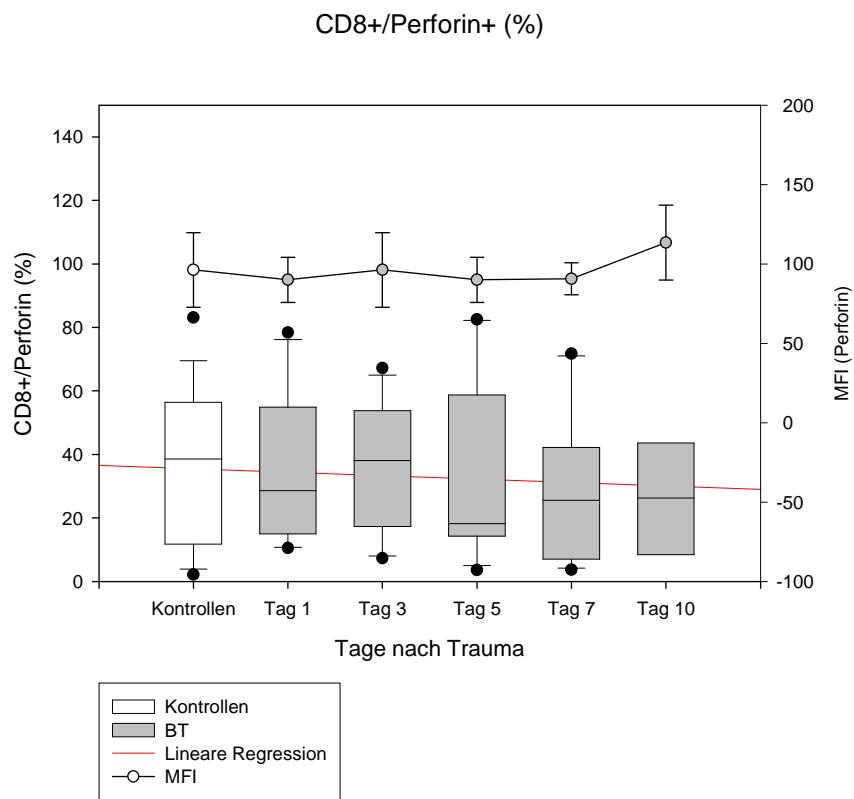


Abb. 22 Frequenz der CD8+/Perforin+ T-Lymphozyten und Perforin Expression im Schwerverbranntenkollektiv

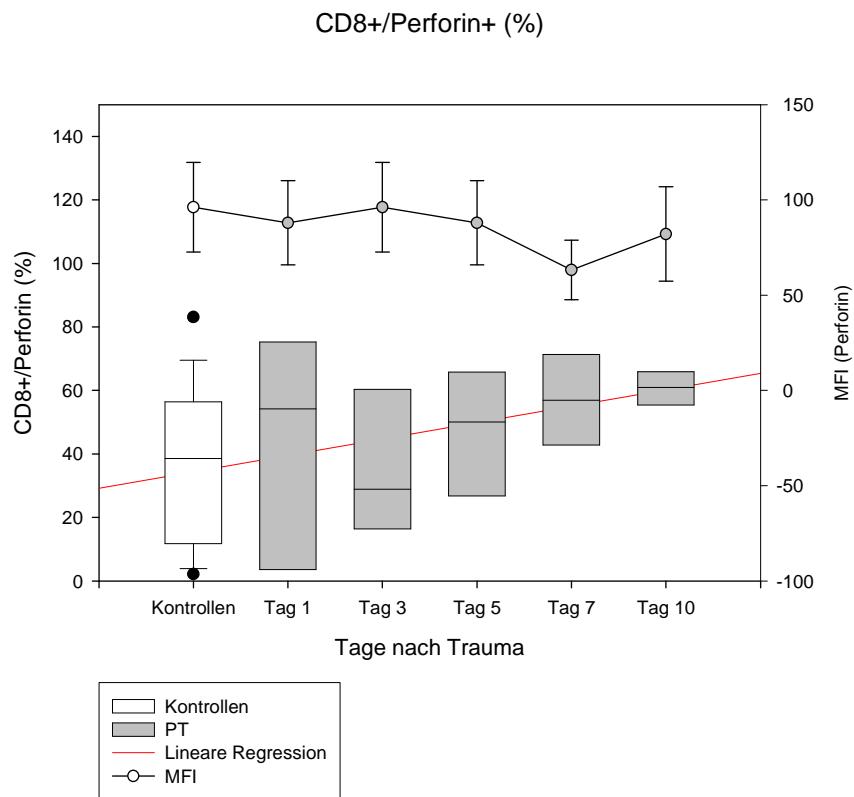


Abb. 23 Frequenz der CD8+/Perforin+ T-Lymphozyten und Perforinexpression im Polytraumakollektiv

3.2.6 CD8+/Granzym-B+ Lymphozyten

CD8+ T-Lymphozyten, die den zytotoxischen Marker Granzym-B enthielten, waren bei Gesundkontrollen mit einem prozentualen Anteil von $28,73 \pm 3,76\%$ nachzuweisen. In der Gruppe der Schwerbrandverletzten kam es zu keiner signifikanten Veränderung nach Trauma, so dass die Werte von $32,99 \pm 6,51\%$ am Tag 1 bis $19,30 \pm 7,29\%$ am Tag 10 im Bereich der Kontrollen lagen (Abb. 24). Patienten, die ein Polytrauma erlitten hatten wiesen posttraumatisch einen erhöhten prozentualen Anteil an CD8+/Granzym-B+ T-Zellen auf, mit Werten von $46,77 \pm 6,80\%$ am Tag 1 bis $51,22 \pm 8,08\%$ am Tag 10 (Abb. 25). Diese ergaben jedoch zu keinem Zeitpunkt eine statistische Signifikanz.

Die Bestimmung der Expressionsdichte von Granzym-B in CD8+ T-Lymphozyten ergab für beide Patientengruppen Werte im Bereich des Kontrollkollektivs, mit $22,99 \pm 2,02$ MFI (Schwerbrandverletzte (Abb. 24): Tag 1 $26,30 \pm 2,40$ MFI, Tag 10 $25,18 \pm 4,29$ MFI; Polytraumapatienten (Abb. 25): Tag 1 $32,83 \pm 6,95$ MFI, Tag 10 $26,76 \pm 4,07$ MFI).

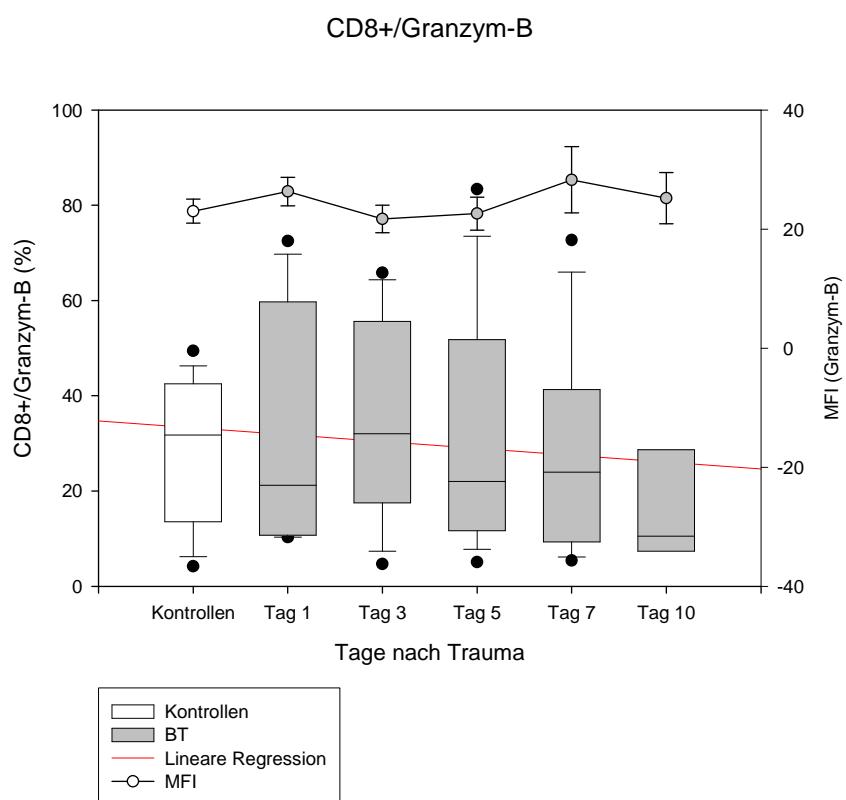


Abb. 24 Frequenz der CD8+/Granzym-B+ T-Lymphozyten und Granzym-B Expression im Schwerverbranntenkollektiv

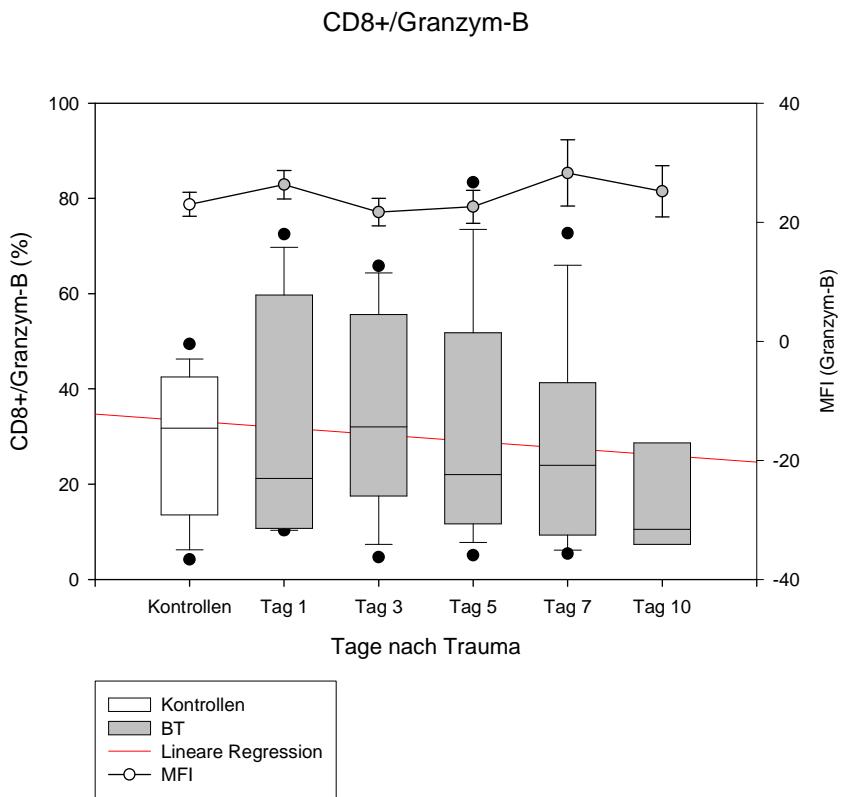


Abb. 25 Frequenz der CD8+/Granzym-B+ T-Lymphozyten und Granzym-B Expression im Polytraumakollektiv

3.2.7 CD4+/CD8+/Perforin+ Lymphozyten

Der prozentuale Anteil an CD4+/CD8+ T-Lymphozyten, die intrazellulär zytotoxische Granula mit Perforin enthielten lag im Kontrollkollektiv bei $13,92 \pm 4,93\%$. Nach Verbrennungsverletzung stieg dieser Prozentsatz auf Werte von $17,81 \pm 5,19\%$ am Tag 1 und $25,60 \pm 7,82\%$ am Tag 7 an, war jedoch zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikant erhöht (Abb. 26). Bei Patienten, die ein Polytrauma erlitten hatten, kam es im Verlauf zu einer kontinuierlichen Erhöhung des prozentualen Anteils an CD4+/CD8+ doppelpositiven Zellen mit zytotoxischem Potential, nachgewiesen über Perforin. Statistische Relevanz erreichten die Werte gemessen an den Tagen 5 ($41,38 \pm 9,46\%$) und 7 ($43,98 \pm 7,77\%$) (Abb. 27).

Messungen der Dichteverteilung von Perforin in CD4+/CD8+ T-Lymphozyten ergaben, ausgehend von $38,96 \pm 25,96$ MFI bei Gesundkontrollen, in der Gruppe der Brandverletzten an den Tagen 1 ($111,00 \pm 74,64$ MFI) und 7 ($105,42 \pm 62,63$ MFI) erhöhte Werte, die aber keine statistische Signifikanz erreichten (Abb. 26). Die Dichteverteilung an den übrigen Tagen nach Trauma lag im Bereich des Kontrollkollektivs. Ebenso zeigte das Expressionsverhalten dieser Zellen bei Polytraumapatienten keine signifikanten

Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen und lag bei $33,06 \pm 4,80$ MFI am Tag 1 und leicht erhöhten $64,05 \pm 19,07$ MFI am Tag 10 (Abb. 27).

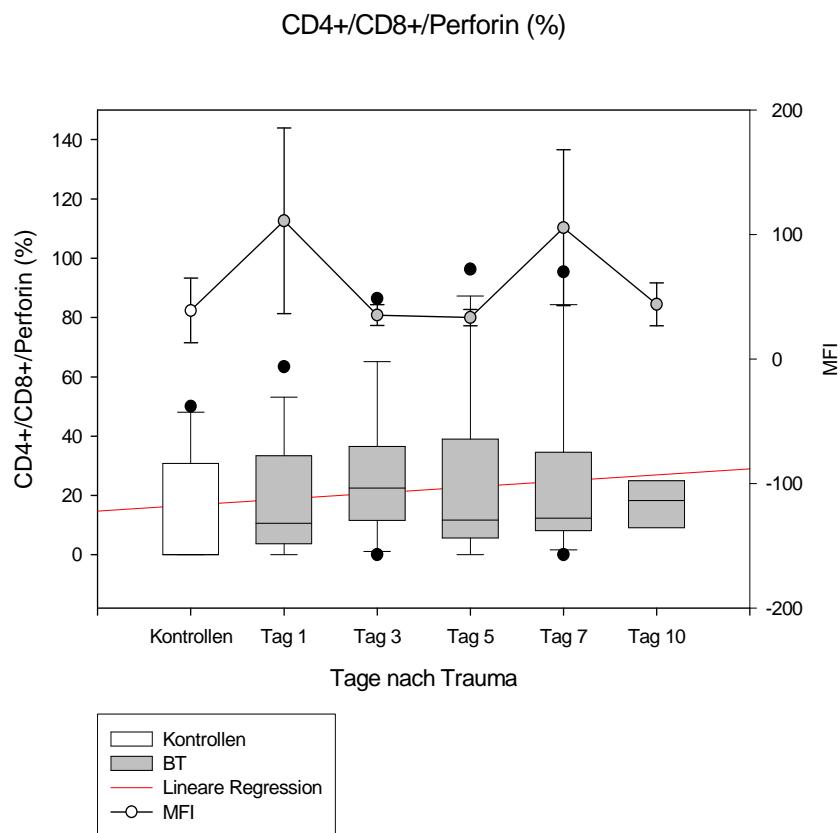


Abb. 26 Frequenz der CD4+/CD8+/Perforin+ T-Lymphozyten im Schwerverbranntenkollektiv

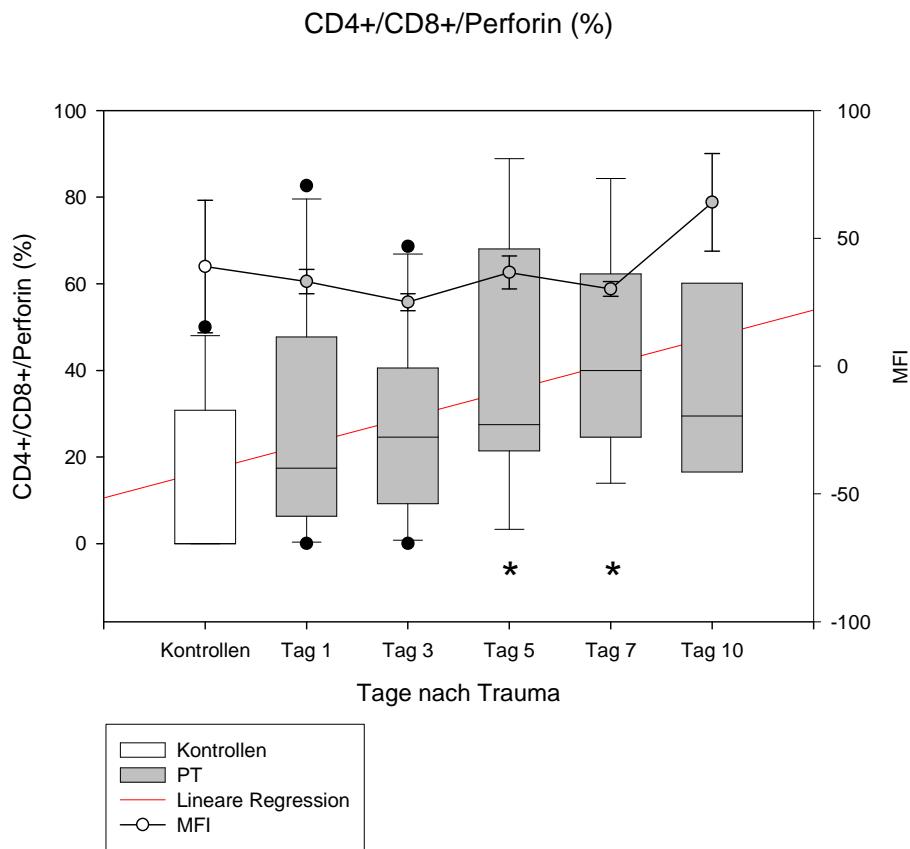


Abb. 27 Frequenz der CD4+/CD8+/Perforin+ T-Lymphozyten im Polytraumakollektiv,

* $p < 0,05$ vs. Kontrollen

3.2.8 CD4+/CD56+/Perforin+ Lymphozyten

Bei Betrachtung der Frequenz von CD4+/CD56+ T-Lymphozyten, die Perforin als zytotoxischen Mediator enthielten, wies die Kontrollgruppe einen Wert von $15,12 \pm 4,99$ % auf. Der prozentuale Anteil dieser Lymphozytenpopulation lag bei Patienten mit Brandverletzung mit Werten zwischen $23,38 \pm 6,60$ % am Tag 3 und $7,13 \pm 2,15$ % am Tag 10 im Bereich des Kontrollkollektivs (Abb. 28). Polytraumatisierte Patienten zeigten in der Analyse einen leichten, aber nicht signifikanten Anstieg der Frequenz mit einem Anteil von $26,99 \pm 10,15$ % am Tag 1 und $36,81 \pm 9,80$ % am Tag 7 (Abb. 29).

Die mittlere Expressionsdichte von Perforin in CD4+/CD56+ T-Lymphozyten ergab im Kontrollkollektiv einen Wert von $18,51 \pm 6,16$ MFI. Im Verlauf zeigte sich bei schwerbrandverletzten Patienten eine leichte Abnahme von $27,55 \pm 17,16$ MFI am Tag 1 und $33,26 \pm 9,48$ MFI am Tag 3, auf $11,90 \pm 3,51$ MFI am Tag 10, die jedoch zu keinem Zeitpunkt, im Vergleich zu den Gesundkontrollen, signifikant war (Abb. 28). Bei polytraumatisierten Patienten dagegen konnte eine leichte und kontinuierliche Zunahme

verzeichnet werden mit Expressionsdichtewerten von $15,24 \pm 3,70$ MFI am Tag 1 bis $31,68 \pm 10,17$ MFI am Tag 10 (Abb. 29). Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht festgestellt werden.

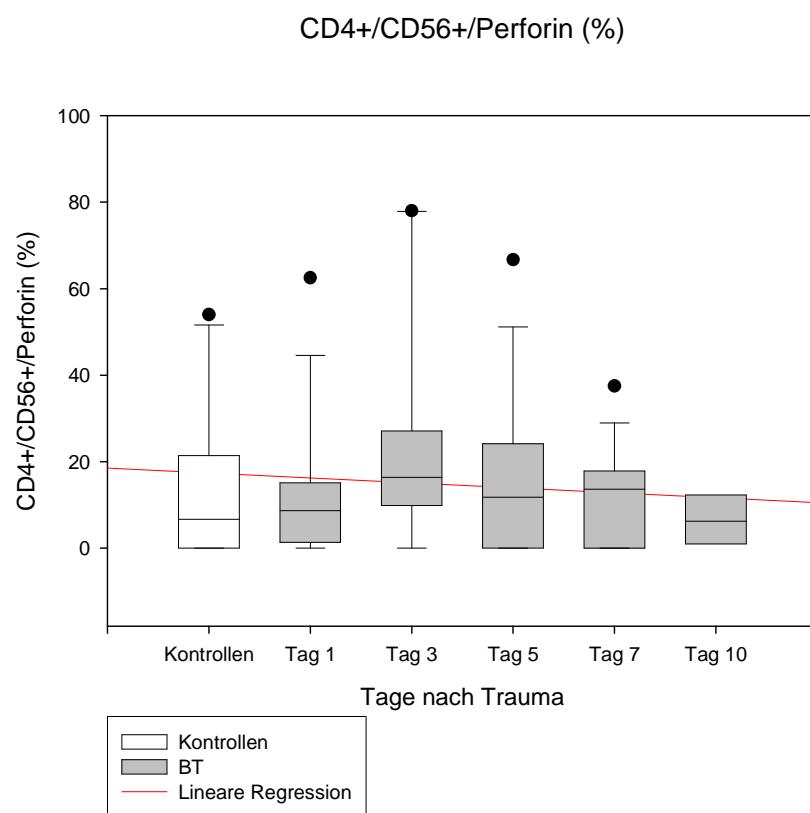


Abb. 28 Frequenz der CD4+/CD56+/Perforin+ T-Lymphozyten im Schwerverbranntenkollektiv

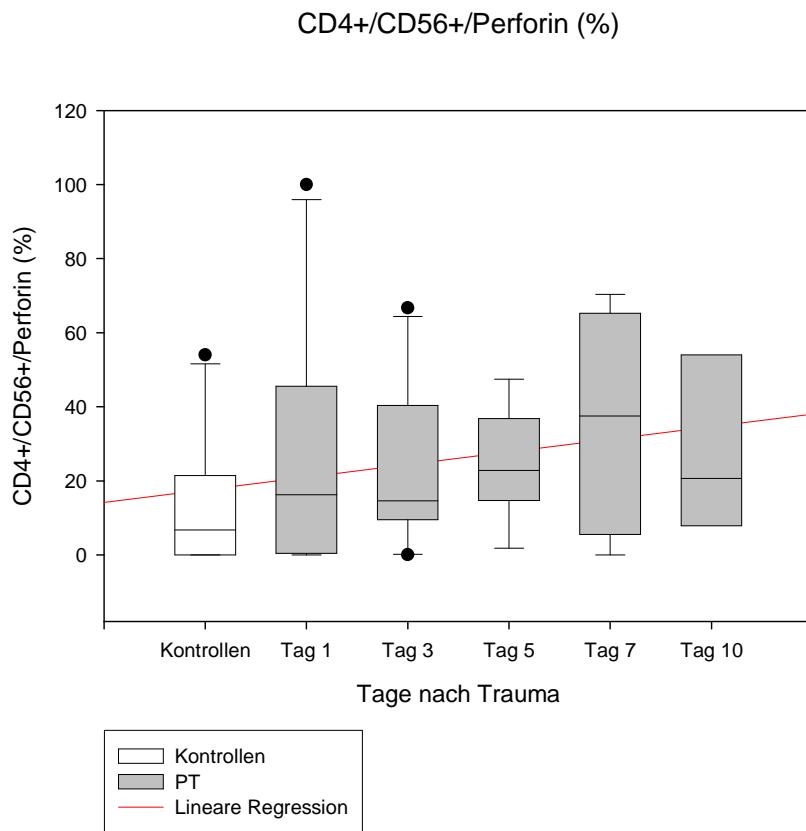


Abb. 29 Frequenz der CD4+/CD56+/Perforin+ T-Lymphozyten im Polytraumakollektiv

3.2.9 CD56+/Perforin+ Lymphozyten

CD56+ Zellen enthielten in der Gruppe der Gesundkontrollen zu $75,06 \pm 6,17\%$ das zytotoxische Molekül Perforin. In dem Kollektiv der Brandverletzten ergaben sich Werte zwischen $85,80 \pm 2,44\%$ am Tag 3 und $70,71 \pm 5,40\%$ am Tag 10 (Abb. 30). Nach Mehrfachverletzung nahm der prozentuale Anteil von $79,24 \pm 7,28\%$ am Tag 3 auf $89,50 \pm 2,37\%$ am Tag 10 leicht zu. Jedoch ergab die Analyse für beide Patientengruppen keine statistische Signifikanz gegenüber Gesundkontrollen (Abb. 31).

Die mittlere Fluoreszenzintensität von Perforin auf CD56+ Zellen erreichte in der Kontrollgruppe $96,69 \pm 10,78$ MFI. Nach Verbrennungsverletzung kam es zu einer kontinuierlichen, aber nicht signifikanten, Abnahme dieser Expressionsdichte von $90,70 \pm 10,78$ MFI am Tag 1 auf $62,14 \pm 8,69$ MFI am Tag 10 (Abb. 30). Auch die Gruppe der Polytrauma Patienten wies eine rückläufige MFI nach Trauma auf, die jedoch ebenfalls keine statistische Signifikanz ergab ($85,89 \pm 15,01$ MFI am Tag 1, $60,68 \pm 8,80$ MFI am Tag 5, $80,50 \pm 24,29$ MFI am Tag 10) (Abb. 31).

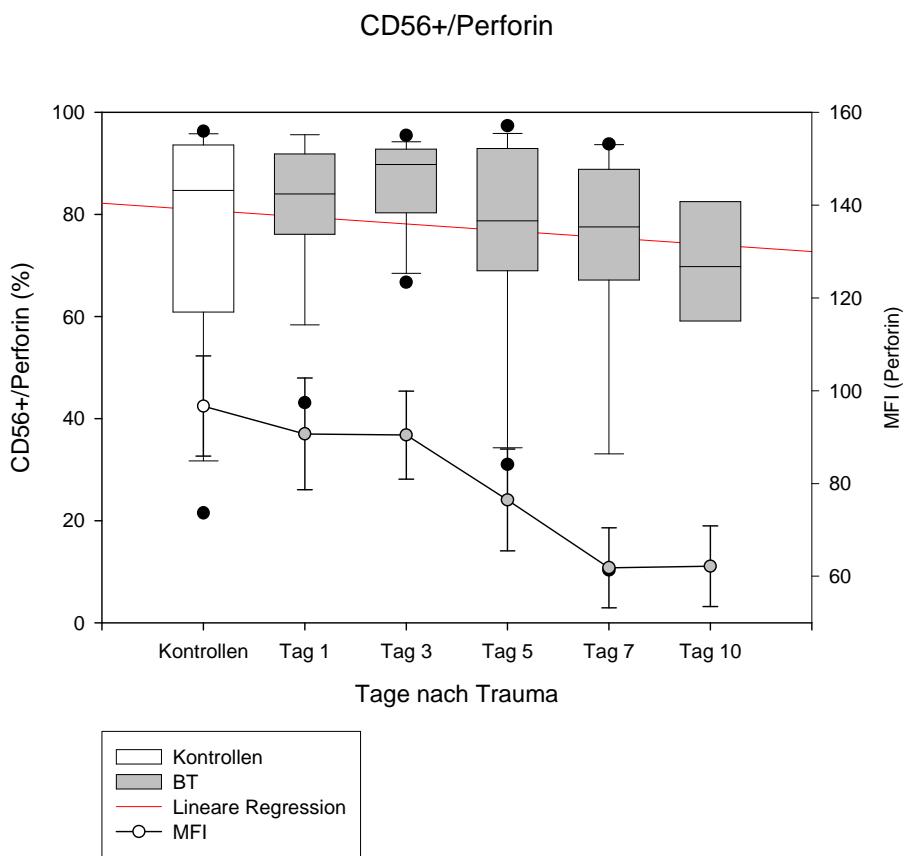


Abb. 30 Frequenz der CD56+/Perforin+ T-Lymphozyten und Perforinexpression im Schwerverbranntenkollektiv

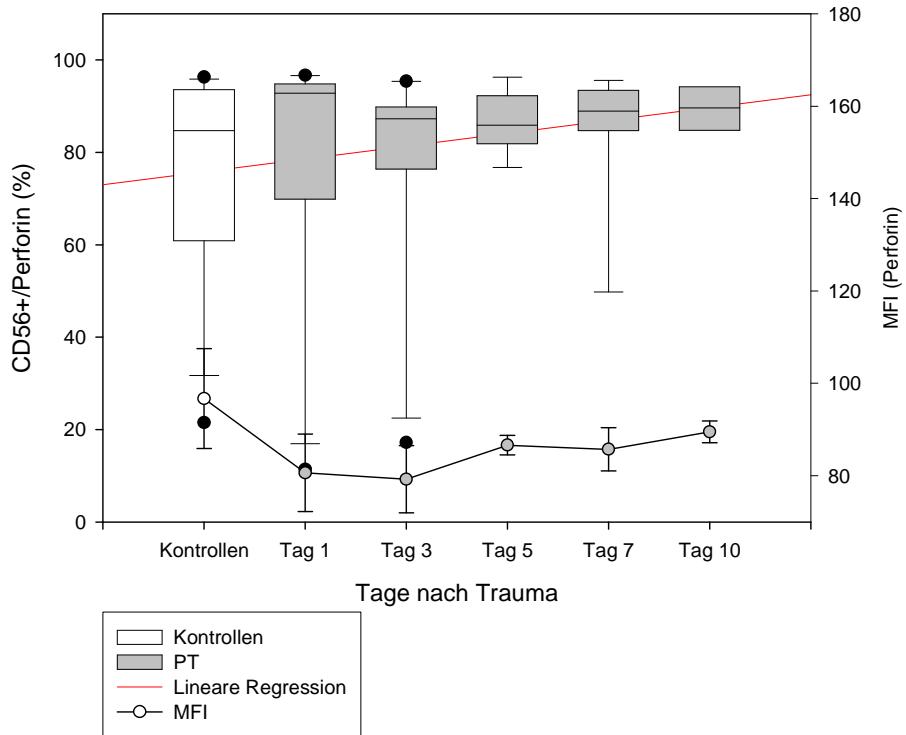


Abb. 31 Frequenz der CD56+/Perforin+ T-Lymphozyten und Perforinexpression im Polytraumakollektiv

3.2.10 CD56+/Granzym-B+ Lymphozyten

Die Analyse der CD56+ Zellen, die Granzym-B enthielten, ergab bei gesunden Probanden einen Wert von $63,96 \pm 4,96\%$. Ausgehend von dieser Frequenz konnte sowohl bei Brandverletzten Patienten mit Werten zwischen $79,52 \pm 2,86\%$ am Tag 1 und $59,93 \pm 6,84\%$ am Tag 7 (Abb. 32), als auch bei Patienten nach Polytrauma mit $66,38 \pm 5,46\%$ am Tag 3 und $76,54 \pm 4,12\%$ am Tag 7 (Abb. 33), keinerlei statistisch signifikante Veränderung nachgewiesen werden.

Auch die Expressionsdichte von Granzym-B zeigte in beiden Patientengruppen keine signifikant von Gesundkontrollen abweichenden Werte. So wies das Kontrollkollektiv eine MFI von $22,80 \pm 1,68$ auf, während in der Gruppe der Schwerbrandverletzten dieser Wert zwischen $29,20 \pm 2,93$ MFI am Tag 1 und $23,79 \pm 3,10$ MFI am Tag 5 schwankte (Abb. 32). Bei polytraumatisierten Patienten ergab sich eine Expressionsdichte zwischen $34,98 \pm 7,23$ MFI am Tag 1 und $21,83 \pm 2,65$ MFI am Tag 5 (Abb. 33).

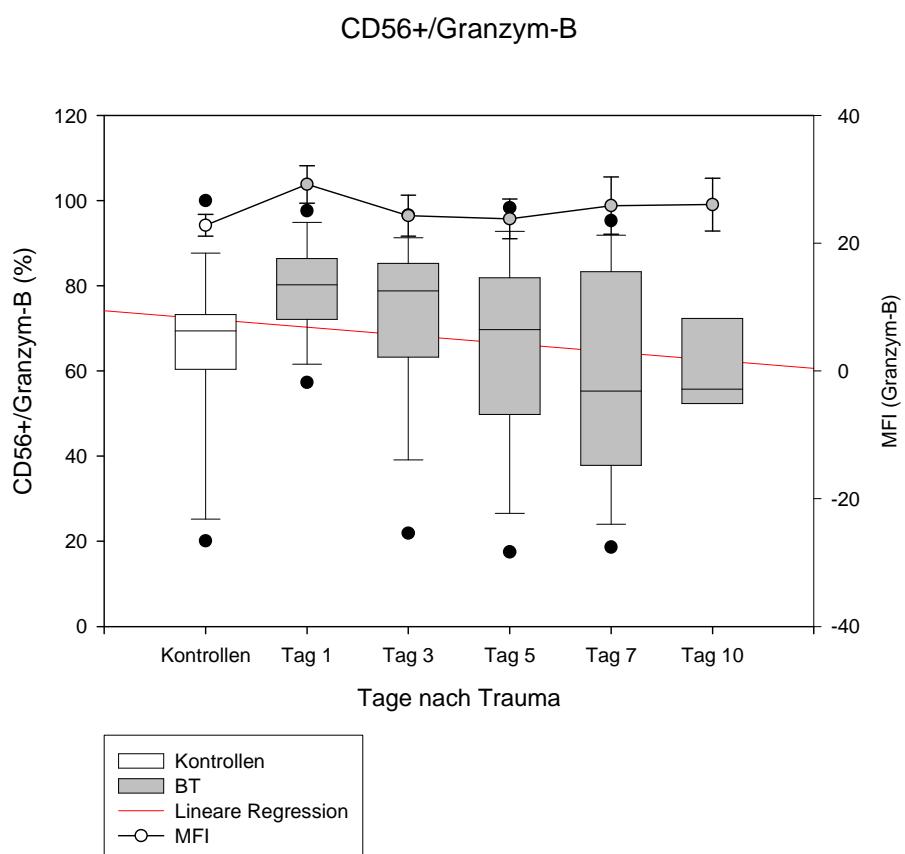


Abb. 32 Frequenz der CD56+/Granzym-B+ T-Lymphozyten und Granzym-B Expression im Schwerverbranntenkollektiv

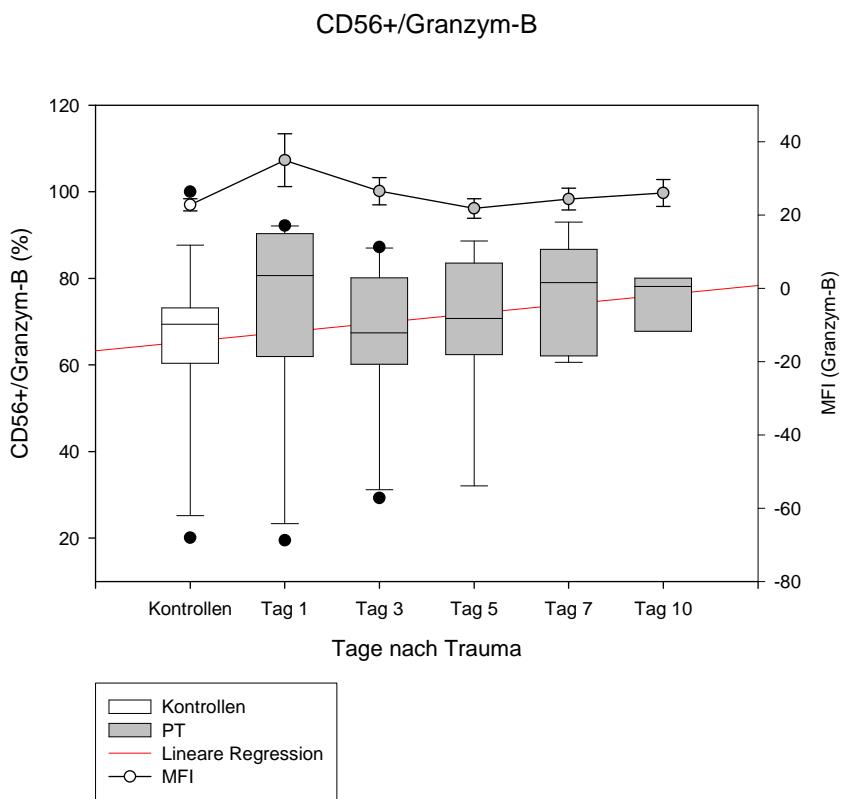


Abb. 33 Frequenz der CD56+/Granzym-B+ T-Lymphozyten und Granzym-B Expression im Polytraumakollektiv

3.3 Oberflächenantigen Differenzierung von Lymphozyten und Monozyten

3.3.1 CD3+/HLA-DR+ Lymphozyten

CD3+/HLA-DR+ Zellen, die als aktivierte T-Lymphozyten bezeichnet werden, waren bei Gesundkontrollen mit einer Frequenz von $1,56 \pm 0,05\%$ anzugeben. Nach einer Verbrennungsverletzung stieg der prozentuale Anteil dieser Lymphozytenpopulation von $1,87 \pm 0,11\%$ am Tag 1 auf signifikant erhöhte $2,20 \pm 0,23\%$ am Tag 3, $2,35 \pm 0,21\%$ am Tag 5 und $3,10 \pm 0,51\%$ am Tag 7 (Abb. 34).

Bei Patienten, die ein Polytrauma erlitten hatten, erhöhte sich der Prozentsatz an aktivierte T-Lymphozyten post Trauma von $2,07 \pm 0,20\%$ am Tag 1 auf $3,14 \pm 0,64\%$ am Tag 7 und $3,10 \pm 0,70\%$ am Tag 10. Die Werte an den Tagen 7 und 10 waren signifikant erhöht (Abb. 35).

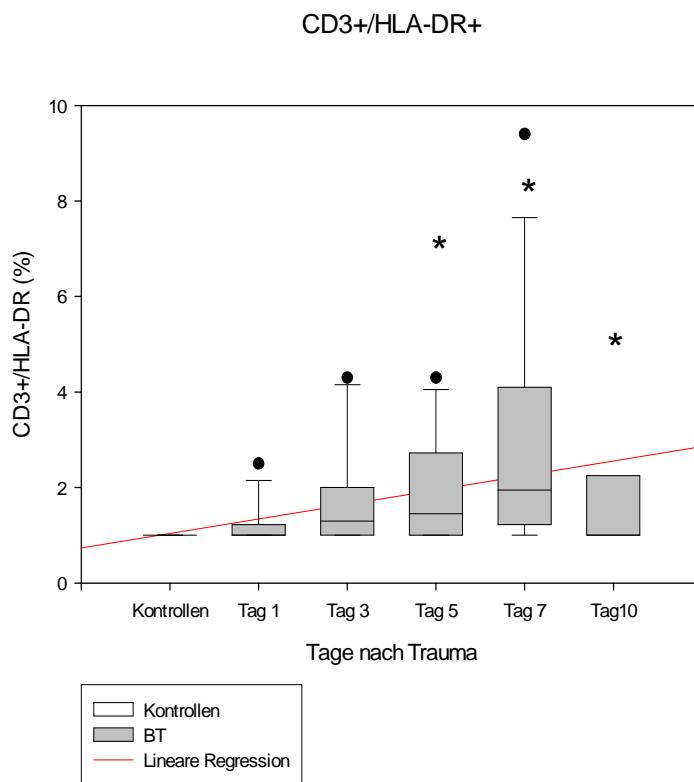


Abb. 34 Frequenz der CD3+/HLA-DR+ T-Lymphozyten im Schwerverbranntenkollektiv,

* $p<0,05$ vs. Kontrollen

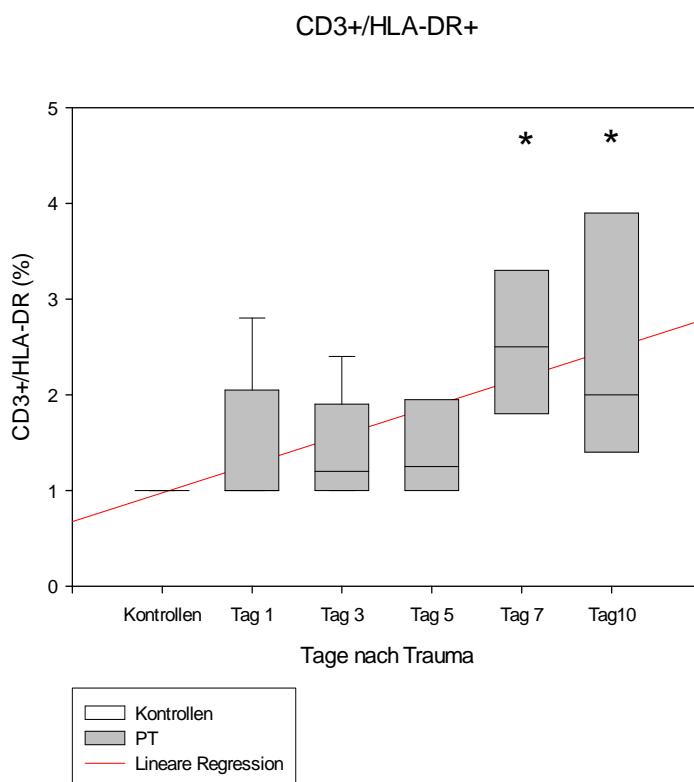
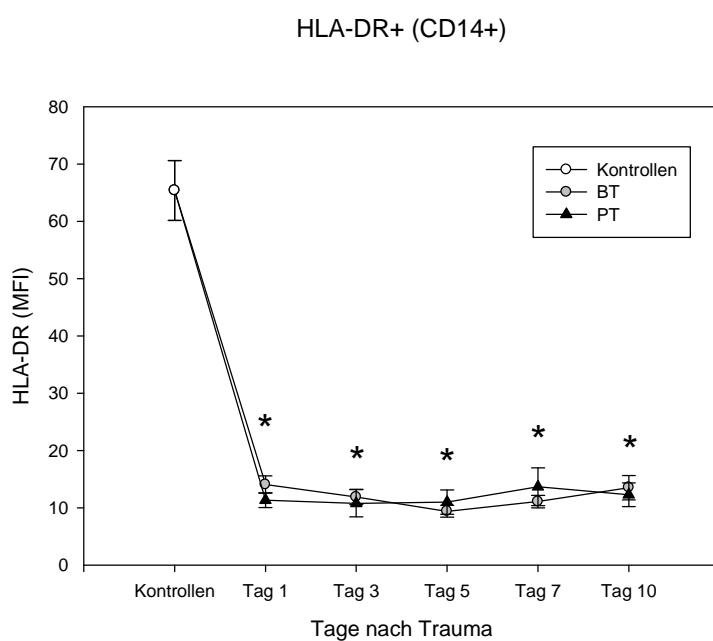


Abb. 35 Frequenz der CD3+/HLA-DR+ T-Lymphozyten im Polytraumakollektiv, * $p<0,05$ vs. Kontrollen

3.3.2 CD14+/HLA-DR+ Monozyten

Die Expressionsdichte des HLA-DR Antigens auf CD14+ Monozyten betrug in der Gruppe der gesunden Probanden $65,38 \pm 5,24$ MFI. Patienten, die sich eine Verbrennungsverletzung zugezogen hatten, zeigten signifikant verminderte Werte an allen untersuchten Tagen nach dem Trauma (Tag 1: $14,04 \pm 1,51$ MFI, Tag 10: $13,51 \pm 2,12$ MFI) (Abb. 36).

Auch nach Polytrauma war die Expression des HLA-DR Antigens während des gesamten Untersuchungszeitraums auf CD14+ Zellen stark rückläufig und an den Tagen 1 ($11,32 \pm 1,27\%$) bis 7 ($13,67 \pm 3,30\%$) signifikant erniedrigt (Abb. 37).



**Abb. 36 Expressionsdichte (MFI) des HLA-DR Antigens auf CD14+ Monozyten im Schwerverbranntenkollektiv und Kollektiv der polytraumatisierten Patienten,
* $p < 0,05$ vs. Kontrollen**

3.3.3 CD14+/CD40+ Monozyten

Die Analyse der CD14+ Monozyten, die zudem das kostimulatorische Molekül CD40 auf ihrer Oberfläche trugen, ergab für gesunde Kontrollen einen prozentualen Anteil von $22,35 \pm 3,54\%$. Bei Patienten mit schwerer Brandverletzung ermittelten wir an den Tagen 1 ($3,95 \pm 0,94\%$), 3 ($11,90 \pm 1,80\%$), 5 ($11,74 \pm 1,91\%$) und 7 ($9,58 \pm 2,60\%$) signifikant erniedrigte Werte. Lediglich an Tag 10 ergab die Auswertung mit $13,00 \pm 3,63\%$ eine zwar erniedrigte, aber nicht signifikante Frequenz dieser Population (Abb. 37). Patienten, die ein Polytrauma erlitten hatten, zeigten an den Tagen nach dem Trauma leicht erniedrigte prozentuale Anteile an CD14+/CD40+ Zellen, ohne jedoch an einem Untersuchungszeitpunkt statistische Signifikanz zu erreichen (Tag 1: $10,58 \pm 3,53\%$, Tag 7: $20,88 \pm 7,81\%$) (Abb. 38).

Die Expressionsdichte des CD40 Antigens auf CD14+ Zellen lag bei Gesundkontrollen bei $14,73 \pm 4,45$ MFI. Diese Expressionsdichte zeigte im Schwerverbranntenkollektiv am Tag 1 nach Trauma einen signifikanten Abfall auf $2,33 \pm 0,67$ MFI, um dann wieder auf Ausgangsniveau zu steigen. Im Kollektiv der polytraumatisierten Patienten zeigte die Expressionsdichte des CD40 Antigens auf CD14+ Zellen am Tag 1 nach Trauma lediglich eine tendenzielle Abnahme auf $8,72 \pm 3,05$ und lag an den weiteren Tagen nach Trauma im Bereich der Kontrollen.

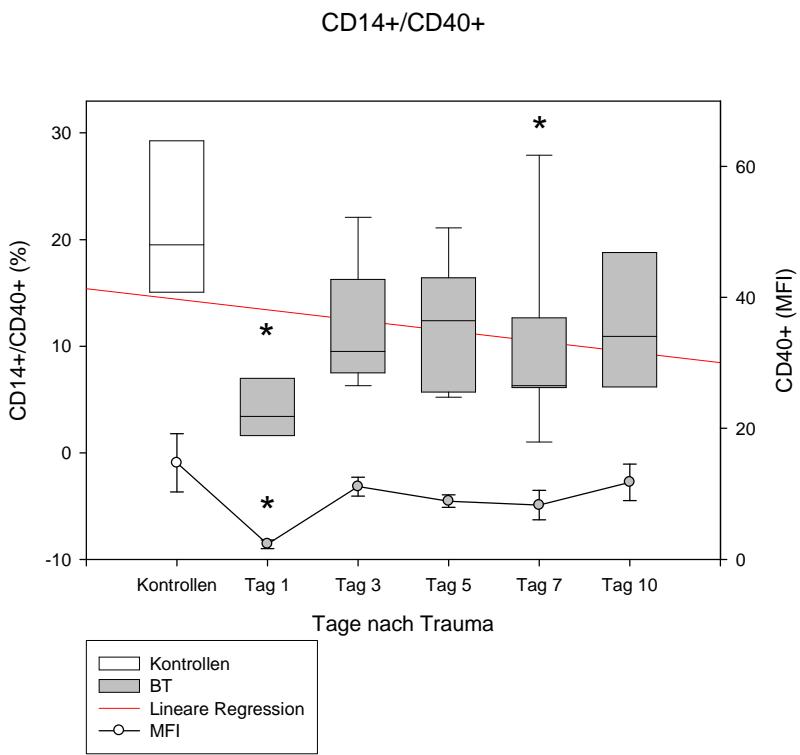


Abb. 37 Frequenz der CD14+/CD40+ Monozyten und Expressionsdichte von CD40 im Schwerverbranntenkollektiv, *p< 0,05 vs. Kontrollen

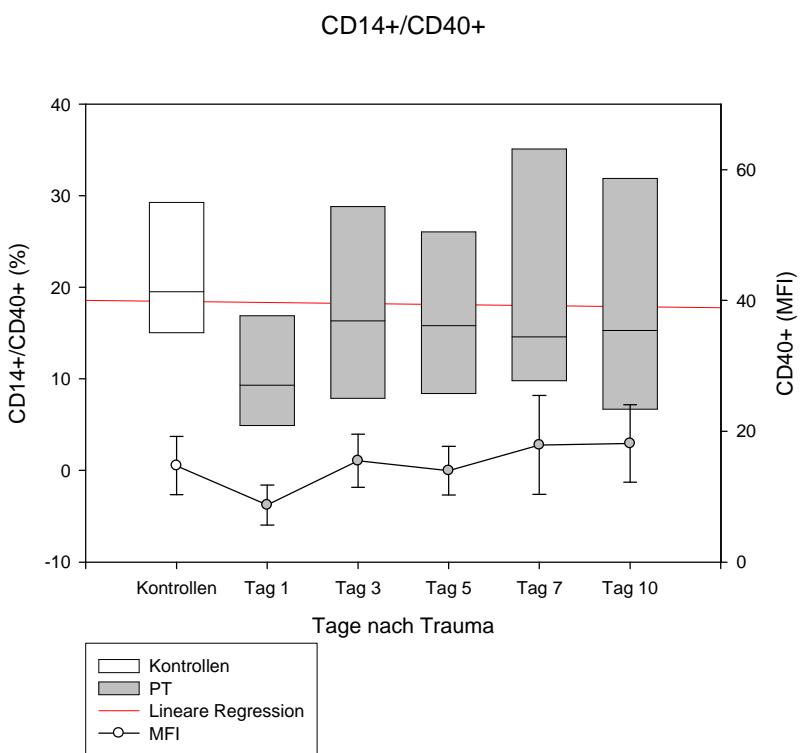


Abb. 38 Frequenz der CD14+/CD40+ Monozyten und Expressionsdichte von CD40 im Polytraumakollektiv

3.3.4 CD14+/CD16+ Monozyten

Monozyten, die als charakteristischen Marker das CD14 Oberflächenantigen tragen, können zusätzlich noch einen weiteren Differenzierungsmarker, das CD16 Antigen, aufweisen. Die Analyse der CD14+/CD16+ Monozyten ergab einen prozentualen Anteil von $4,20 \pm 0,41\%$ bei gesunden Probanden. Nach Verbrennungsverletzung blieb diese Frequenz zunächst an den Tagen 1 bis 5 konstant und unterschied sich nicht wesentlich von den Gesundwerten (Tag 1: $4,09 \pm 0,57\%$) (Abb. 39). An den Tagen 7 und 10 zeigte sich ein Rückgang des prozentualen Anteils der CD14+/CD16+ Zellen, mit signifikanten $1,40 \pm 0,22\%$ am Tag 10.

Bei Patienten mit polytraumatischem Verletzungsmuster zeigte sich eine wesentlich geringere Abnahme des prozentualen CD14+/CD16+ Anteils, welcher auch zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine statistische Signifikanz ergab (Tag 1: $3,58 \pm 0,97\%$, Tag 10: $2,20 \pm 0,50\%$) (Abb. 40).

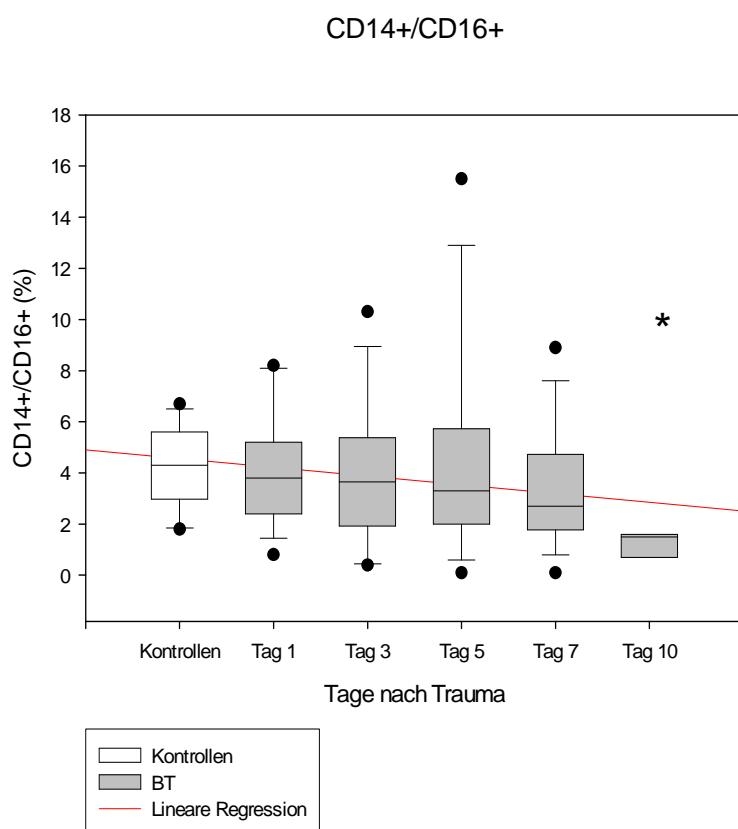


Abb. 39 Frequenz der CD14+/C16+ Monozyten im Scherverbranntenkollektiv, * $p<0,05$ vs. Kontrollen

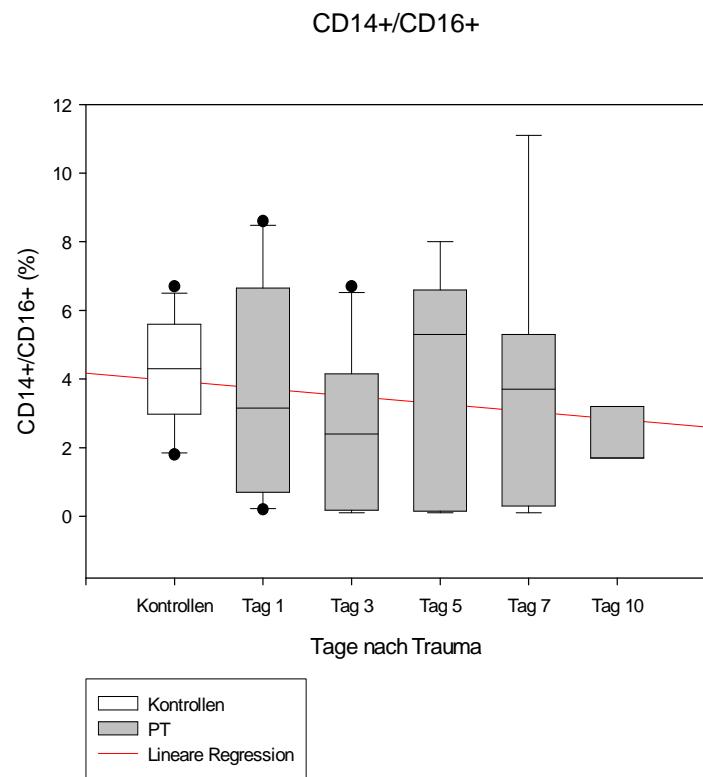


Abb. 40 Frequenz der CD14+/CD16+ Monozyten im Polytraumakollektiv

4. Diskussion

Schweres Unfalltrauma und ausgedehnte tiefe Verbrennungsverletzungen resultieren in einer nachhaltigen Immundysfunktion, die mit einer hohen Inzidenz für septische Komplikationen, dem konsekutiven Auftreten eines (Multi-) organversagens ((M)OV) und einer hohen Morbidität und Letalität vergesellschaftet ist. Die posttraumatische Immundysfunktion ist sowohl durch eine sofortige lokale und systemische Entzündungsreaktion charakterisiert, als auch durch eine korrespondierende Beeinträchtigung der zellvermittelten Immunantwort, häufig auch als posttraumatische Anergie oder Immunparalyse beschrieben. Die Entstehung von SIRS und Organdysfunktion wird durch traumainduzierte zelluläre Nekrosen und den damit einhergehenden Zellmembranschaden mit Freisetzung inflammatorischer und zytotoxischer Moleküle begünstigt. Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich bei der Apoptose um einen aktiven Prozess, der ohne zellulären Membranschaden abläuft und dessen Kaskade vorwiegend von leukozytär freigesetzten Mediatoren initiiert wird. Auch eine verstärkte Apoptoserate lymphoider Organe und zum Teil parenchymaler Gewebe trägt im kritisch kranken Patienten zur Immunsuppression, Anergie und Organdysfunktion bei (Oberholzer et al., 2001). Sowohl zytotoxische T-Zellen als auch natürliche Killerzellen sind in der Lage apoptotische Vorgänge über den Granula-Exozytose-Weg zu induzieren (Teodorczyk-Injeyan et al., 1995) und tragen damit entscheidend zu einer effektiven zytotoxischen Immunantwort und letztendlich zum Erhalt der immunologischen Homöostase bei. Die Frage, wie beispielsweise Perforin, ein Bestandteil zytotoxischer Granula, seine proapoptotischen und immunregulatorischen Eigenschaften ausübt ist nur unzureichend beantwortet und Gegenstand intensiver Forschungsanstrengungen.

Da die traumaassoziierte Monozytentysfunktion von phänotypischen Alterationen begleitet wird, wurden in der vorliegenden Studie durchflusszytometrische Untersuchungen zur Charakterisierung und Differenzierung peripherer Blutzellen durchgeführt, unter besonderer Berücksichtigung des zytotoxischen Arsenals von T-Lymphozytensubpopulationen nach schwerem Trauma.

Monozyten verfügen über spezifische Rezeptoren, um die Signale aus ihrem Umfeld zu verarbeiten und mit anderen Zellen zu kommunizieren. Das wichtige Oberflächenantigen CD14 bindet beispielsweise den Komplex aus LPS und LBP und interagiert anschließend mit dem sogenannten Toll-like-Rezeptor 4. Das Ergebnis der nachfolgenden Signalkaskade ist die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen und eine vermehrte Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 oder CD86, mit deren Hilfe im Lymphknoten

CD4-T-Zellen nach Kontakt zu MHC-II Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) aktiviert werden (Carreno & Collins, 2002). Das HLA-DR-Molekül ist das meist exprimierte Antigen des MHC-II-Komplexes auf Monozyten und reflektiert den Status der individuellen zellulären Immunkompetenz. Eine stark verminderte monozytäre HLA-DR Expression ist somit Zeichen einer global eingeschränkten Immunfunktion. Hershman et al. (1990) untersuchten die HLA-DR Expression bei traumatisierten Patienten und fanden bei komplikationslosem Verlauf eine Rekonstitution auf Normalwerte innerhalb einer Woche, wohingegen septische Patienten drei Wochen benötigten. Bei Patienten, die verstarben, kehrte die HLA-DR Expression ante mortem nicht mehr auf Ausgangswerte zurück (Hershman et al., 1990). Eine ausreichende Expression von HLA-DR Molekülen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen ist essentiell für die Initiierung einer adäquaten T-Helferzell-Antwort und damit für die gesamte spezifische Immunantwort. In vorliegender Studie war die Expressionsdichte des HLA-DR Antigens auf CD14+ Monozyten sowohl im Schwerverbranntenkollektiv, als auch nach Mehrfachverletzung signifikant verringert. Diese Beobachtung steht in Einklang mit früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die einen HLA-DR Expressionsverlust auf Monozyten nach Trauma beschrieben. Die persistierende Verminderung der HLA-DR Expression konnte als Risikofaktor für posttraumatisch septische Komplikationen und als Surrogatmarker einer insuffizienten Immunantwort identifiziert werden (Faist et al., 1996). Bei Patienten mit septischen Komplikationen ist die Expression dieses Oberflächenmarkers auf CD14+-Zellen zudem stärker supprimiert, als bei Patienten mit komplikationslosen Verlauf (Hershman et al., 1990).

Auf zirkulierenden CD3+ T-Lymphozyten ist das Expressionsniveau von HLA-DR sehr variabel und abhängig vom Aktivierungsstatus der Zelle (Hannet et al., 1992). Der prozentuale Anteil aktiverter CD3 positiver Lymphozyten, die HLA-DR auf ihrer Oberfläche exprimierten, stieg posttraumatisch sowohl in der Verbrennungsgruppe, als auch in der Polytraumagruppe kontinuierlich an. Wakefield konnte eine prozentuale Zunahme aktiverter T-Lymphozyten nach operativem Trauma nachweisen, mit signifikant höheren Werten bei Patienten, die einen unkomplizierten posttraumatischen Verlauf zeigten, verglichen mit denen, die septische Komplikationen entwickelten (Wakefield et al., 1993). Abgesehen von funktionellen Untersuchungen, stellt die Messung des Aktivierungsgrades den einzigen Hinweis auf die Reaktionsfähigkeit der T-Zellen dar. Die posttraumatisch zunehmende HLA-DR Expression auf CD3+ T-Zellen kann deshalb als

Zeichen der Aktivierbarkeit gewertet werden, das die Auseinandersetzung des spezifischen Immunsystems mit dem traumatischen Insult anzeigen.

Das Oberflächenmolekül CD40 gehört zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren und wird neben Monozyten auch auf B-Zellen, dendritischen Zellen und Fibroblasten exprimiert, wo es an den CD40 Liganden (CD154) auf T-Zellen bindet. Die Interaktion von CD40/CD40L induziert auf APCs die Expression von kostimulatorischen Molekülen, die essentiell für eine effektive Stimulation der CTL sind (Shinde *et al.*, 1996). In der Literatur wird die Bedeutung der CD40 Expression in der Sepsis kontrovers diskutiert. Newton *et al.* (2004) konnten keine Änderung der CD40 Expression auf Monozyten im septischen Geschehen feststellen. Dagegen zeigten Gold *et al.* (2003) in einem murinen Sepsismodell ein verlängertes Überleben von CD40 Knockout-Mäusen gegenüber dem Wildtyp. Andererseits konnte die Herabregulation der CD40 Expression auf Monozyten bei Patienten mit schwerer Sepsis mit einem schlechteren klinischen Ergebnis korreliert werden, wohingegen bei verstärkter Expression eher von einem protektiven Effekt auszugehen ist (Sugimoto *et al.*, 2003). Die Analyse des CD40 Oberflächenmarkers auf CD14 positiven Monozyten in vorliegender Arbeit erfordert eine differenzierte Betrachtungsweise. Vermutlich aufgrund der unterschiedlichen Mechanismen, die den beiden Verletzungsmustern zugrunde liegen, konnten wir im Verbrennungskollektiv eine signifikante Reduktion der Frequenz und der Expressionsstärke dieses Antigens feststellen. Bei den mehrfachverletzten Patienten dagegen, ergaben die Untersuchungen keine signifikanten Veränderungen. Da der Anstieg der monozytären CD40 Expression den regulatorischen Effekt von T-Zellen auf die Monozytenfunktion widerspiegelt (Grewal *et al.*, 1997), liegt umgekehrt die Vermutung nahe, dass die Niederregulation von CD40 Ausdruck der Deaktivierung von Monozyten im Sinne der posttraumatischen Anergie ist. Trotz der Heterogenität peripherer Monozyten sind zwei Hauptpopulationen beschrieben worden, die klassischen CD14++/CD16- und die proinflammatorischen CD14+/CD16+ Monozyten, die sich in der Zytokinsynthesekapazität und ihrer Neigung zu dendritischen Zellen zu differenzieren unterscheiden (Ziegler-Heitbrock, 2007). CD14+/CD16+ Monozyten zeigen eine höhere Phagozytoseaktivität im Gegensatz zu CD14+/CD16- Zellen, sind potente IL-1 und TNF- α Produzenten und exprimieren HLA-DR hoch (Scherberich *et al.*, 2003). In vorliegender Studie war die Häufigkeit von CD14+/CD16+ Monozyten in den ersten 10 Tagen nach schwerer Brandverletzung und Mehrfachverletzung tendenziell leicht rückläufig. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, konstatierte Fingerle *et al.*, dass bei Patienten im septischen Geschehen die Anzahl der

Monozyten mit dem Expressionsmuster CD14+/CD16+ signifikant erhöht ist (Fingerle *et al.*, 1993). Auch Scherberich (Scherberich & Nockher, 1999) beschrieb eine über 20 prozentige Expansion dieser Zellpopulation bei Patienten mit akuter oder chronischer Infektion. Dennoch könnte die prozentuale Abnahme dieser monozytären Subpopulation in den hier untersuchten Patientenkollektiven auch Ausdruck einer gesteigerten Immunsuppression im posttraumatischen Verlauf sein. Dayyani *et al.* konnte einen derartigen Mechanismus für CD14+/CD16+ Monozyten nach immunsuppressiver Glukokortikoidtherapie nachweisen (Dayyani *et al.*, 2003). Er beschrieb eine bis zu 95%ige Reduzierung dieser Zellen nach Therapie. Endogene Glukokortikoidfreisetzung, die die Anzahl an CD14+/CD16+ Zellen reduzieren könnte, ist zumindest bei schwerbrandverletzten Patienten beschrieben, und könnte unsere Beobachtung einer Depletion der CD14+/CD16+ Monozyten, insbesondere nach Verbrennungsverletzung, verglichen mit polytraumatisierten Patienten, unterstützen (Fukuzuka *et al.*, 2000).

Auch natürliche Killerzellen, die ebenfalls Teil des angeborenen Immunsystems sind, weisen prozentual anteilige Verschiebungen nach Trauma auf. In unserer Studie kam es zu einer signifikanten Abnahme der CD56+ NK-Zellen bei Patienten mit schwerer Verbrennungsverletzung. Bei Patienten mit Polytrauma konnte eine zumindest tendenzielle prozentuale Abnahme dieser Zellen gesehen werden. Die Expressionsdichte des CD56 Antigens änderte sich im Verlauf nach Trauma in beiden Patientenkollektiven nur unerheblich. Die Ergebnisse der brandverletzten Patienten korrelieren mit denen von Zedler (Zedler, 2003), der nach thermischem Trauma eine kontinuierliche prozentuale Abnahme der Killerzellen beobachtete. Ditschkowski *et al.* zeigte, dass die relative zahlenmäßige Abnahme der natürlichen Killerzellen Patienten für septische Komplikationen prädisponiert (Ditschkowski *et al.*, 1999). Blazar (Blazar *et al.*, 1986b) beschrieb zudem eine supprimierte Killerzellaktivität nach Trauma, die Hoyt (Hoyt *et al.*, 1988) auf zirkulierende immunsuppressive Peptide zurückführte. El-Sameea *et al.* (2004) konnten zeigen, dass die Zytotoxizität von Killerzellen bei septischen Neugeborenen mehr herunterreguliert ist, als der prozentuale Anteil dieser Zellen während der septischen Phase. In eigenen Untersuchungen zeigten sich sowohl der Anteil Perforin bzw. Granzym-B tragender CD56+ Zellen, als auch die Expressionsdichte dieser Moleküle auf CD56+ Zellen nach Trauma nicht signifikant verändert.

Der relative Anteil von CD4+ T-Helferzellen an konsekutiven Tagen nach Trauma nahm im Verbrennungskollektiv signifikant ab, zeigte jedoch bei Patienten mit mechanischer Verletzung nur eine tendenzielle Abnahme. Die Expressionsdichte des CD4 Antigens auf

T-Helferzellen zeigte keine Veränderung nach Trauma. Ähnliches stellte sich bei Analyse der CD8 positiven T-Lymphozyten heraus. Hier kam es sowohl nach thermischem als auch nach mechanischem Trauma zu einer signifikanten prozentualen Abnahme der CD8+ Zellen. Die Expressionsdichte des CD8 Antigens wies analog zu CD4 keine signifikanten Veränderungen auf. Eine CD4+ Lymphozytendepletion nach Trauma (Cheadle *et al.*, 1993), Verbrennungsverletzungen (Mabrouk *et al.*, 2003) und in der Sepsis (Holub *et al.*, 2003) konnte in vivo gezeigt werden. Dagegen wurde ein prozentualer Abfall der CD8+ Zellen nur im Mausmodell von Patenaude (Patenaude *et al.*, 2005) beschrieben. Ursache dieser temporären Lymphopenie bei akuten pathologischen Zuständen ist laut Feeney (Feeney *et al.*, 1995) eine, durch proinflammatorische Mediatoren wie IL-1 und TNF- α bedingte, verstärkte Lymphozytensequestration. Andererseits führt Hotchkiss (Hotchkiss *et al.*, 1999) die Lymphozytendepletion auf eine gesteigerte Lymphozytenapoptose im septischen Geschehen zurück. Tschaikowsky (Tschairowsky *et al.*, 2002) zeigte bei postoperativen Patienten, die septische Komplikationen entwickelten, sowohl eine prozentuale relative Verschiebung der Lymphozytenpopulationen als auch einen absoluten Anstieg der CD4+ und CD8+ Zellen auf das Doppelte bei nicht überlebenden Patienten. Von einigen Autoren wurde ein Rückgang der CD4+/CD8+ Ratio beschrieben (Shimonkevitz *et al.*, 2005; Yadav et al., 2009). In unserer Studie kam es zu keiner signifikanten Änderung des CD4+/CD8+ Verhältnisses. Es konnte jedoch im Schwerverbranntenkollektiv eine tendenzielle Zunahme der CD4+/CD8+ Ratio gesehen werden. Die Literatur bleibt zu diesem Thema recht uneinheitlich, so konnte bisher zwischen einem veränderten CD4+/CD8+ Verhältnis und dem Auftreten septischer Komplikationen keine Korrelation nachgewiesen werden (Ertel und Faist, 1993). Tschairowsky (Tschairowsky *et al.*, 2002) beschrieb eine signifikante Zunahme der CD4+/CD8+ Ratio bei septischen Patienten, und Antonacci (Antonacci *et al.*, 1984) berichtete über einen Anstieg des CD4+/CD8+ Verhältnisses bei überlebenden Patienten mit drittgradigen Verbrennungen. Diese offensichtliche Diskrepanz der zahlenmäßigen Veränderung bestimmter Phänotypen nach Trauma zwischen den verschiedenen Studien kann unterschiedliche Gründe, wie differente Analyseverfahren, Zählmethoden oder Selektionsstrategien, haben. Ein Vergleich der Studienergebnisse dürfte demnach in vielen Fällen nur bedingt möglich sein.

Funktionell führt schweres Trauma zu einer Verschiebung des Zytokinsynthesemusters von T-Helferzellen in Richtung eines überwiegend Th2-artigen, immunsuppressiven Phänotyps (Guo *et al.*, 2003; O'Sullivan *et al.*, 1995). Diese Verschiebung von einer eher

zytotoxischen (Th1) zu einer weitgehend humoralen und daher abgeschwächten Immunantwort ist mit einer erhöhten Infektionsanfälligkeit verbunden. Eine Th1-polarisierte Immunantwort zeigt sich in der Freisetzung der Zytokine IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ und TNF- α (Faist et al., 1997; Alzona et al., 1995; O'Sullivan et al., 1995). Dagegen dominieren in der Th2-Antwort die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die als Inhibitoren antigenpräsentierender Zellen gelten (O'Sullivan et al., 1995). Interessanterweise konnten funktionelle Veränderungen von T-Zellen im eigenen Labor nicht nur für CD4 positive T-Helferzellen, sondern auch für CD8+ T-Zellen beschrieben werden (Zedler et al., 1997). Nach Verbrennungstrauma verschiebt sich die Zytokinsekretion der CD8+ zytotoxischen Zellen in Richtung eines Th2-ähnlichen Profils. Das Leitzytokin der Th2-Antwort mit überwiegend antiinflammatorischen Eigenschaften ist IL-4, das entscheidenden Einfluss auf die zytotoxische Funktion sich entwickelnder T-Zellen hat. IL-4 inhibiert in zytotoxischen Zellen die Expression der zytolytischen Effektormoleküle Perforin und Granzym-B, und unterstützt die Entwicklung nicht zytotoxischer Zellen (Kienzle et al., 2002). Dieser Vorgang wurde bei HIV-Infektionen, *in vivo* bestätigt (Maggi et al., 1994). Insbesondere nach HIV-Infektion zeigte sich eine verminderte perforinvermittelte zytotoxische Aktivität der CD8+ Zellen zugunsten einer vermehrten zytotoxische Aktivität der CD4+ Zellen (Appay et al., 2002). Die Zytotoxizität von CD4+ Zellen in pathologischen Zuständen erfolgt präferentiell über den Perforin/Granzym-B Weg (Williams et al., 1996). Perforin, ein 68-70 kDa großes Protein und Hauptbestandteil der Granula zytotoxischer CD8+ T-Zellen und natürlicher Killerzellen, ermöglicht Granzym-B, einer 26-32 kDa großen Serinprotease und weiterem Bestandteil zytotoxischer Granula, den Zutritt in die Zielzelle, wo es zur Induktion apoptotischer Kaskaden kommt. Der genaue Mechanismus der perforinvermittelten Zytotoxizität ist noch nicht abschließend geklärt ist und deshalb Gegenstand aktueller Untersuchungen. Im posttraumatischen Verlauf wurde eine Zunahme der Apoptoserate in unterschiedlichen immunologischen Zellen konstatiert (Teodorczyk-Injeyan et al., 1995), die sich allerdings hinsichtlich der Induktion in verschiedenen Lymphozytensubpopulationen unterscheidet. In einigen Zellpopulationen, wie den CD8 positiven T-Lymphozyten, wird die Apoptose über TNF-Rezeptoren vermittelt, während Th1-polarisierte CD4 positive T-Lymphozyten gewöhnlich den Fas/FasL Weg benutzen (Oberholzer et al., 2001). Diese Zusammenhänge wurden hauptsächlich im murinen Modell gezeigt (Stalder et al., 1994). Neuere Untersuchungen weisen den perforinvermittelten zytotoxischen Weg als präferentiellen Mechanismus sowohl für

CD4+-, als auch für CD8+-Lymphozyten nach (Brown et al., 2009). Jedenfalls kann der zytolytische Mechanismus über ein verändertes Zytokinmuster nach Trauma oder im septischen Geschehen adaptiert werden (Oberholzer et al., 2001), wobei bis heute unklar bleiben muss, unter welchen physiologischen Bedingungen welcher Weg eingeschlagen wird. Der prozentuale Anteil der CD4+ T-Lymphozyten, die Perforin enthielten, stieg in der Gruppe der Schwerbrandverletzten posttraumatisch im Vergleich zum Kontrollkollektiv, welches erwartungsgemäss nur wenige zytotoxische CD4 Zellen aufwies tendenziell, nicht aber signifikant an. In der Polytraumagruppe dagegen erreichte die Zunahme der CD4+/Perforin+ Lymphozyten signifikantes Niveau. Die Expressionsdichte von Perforin in CD4+ T-Helferzellen verblieb über den gesamten Untersuchungszeitraum in beiden Patientenkollektiven auf Kontrollniveau. Bei Analyse der Granzym-B Expression zeigte sich ein ähnliches Muster, nämlich leicht erhöhte Werte in der Verbrennungsgruppe und signifikant höhere Werte im Polytraumakollektiv. Die Expressionsdichte von Granzym-B in CD4+ Zellen stagnierte bei Verbrennungspatienten auf Kontrollniveau, wurde jedoch bei polytraumatisierten Patienten leicht hochreguliert. Auch bei der Messung der CD4 positiven Zellen, die sowohl Perforin als auch Granzym-B enthielten, zeigte sich das Bild des leichten, jedoch nicht signifikanten, prozentualen Anstiegs bei schwerverbrannten Patienten und des signifikanten Anstiegs in der Gruppe der Polytraumapatienten. Neben den oben bereits diskutierten viralen Infektionen, weisen vor allem Autoimmunerkrankungen, etwa die rheumatoide Arthritis (Namekawa et al., 1998), oder Neoplasien wie die B-Zell chronisch lymphatische Leukämie (Porakishvili et al., 2004) ähnliche Ergebnisse mit einem erhöhtem Anteil Perforin positiver CD4 Zellen auf. Die für den posttraumatisch zunehmend zytotoxischen Phänotyp der CD4+ Zellen verantwortlichen Mechanismen sind gegenwärtig noch weitgehend unklar. Es mehren sich allerdings Anzeichen, die für einen Perforin abhängigen Apoptoseweg in CD4 Zellen sprechen, der von CD8 Zellen reguliert wird. In älteren Arbeiten wurde gezeigt, dass sich CD4+ Zellen nur in Abwesenheit von aktivierten CD8+ Zellen zu perforinhaltigen zytotoxischen Zellen entwickeln können (Williams et al., 1996). Neueren Erkenntnissen zufolge, kann die Entwicklung perforinpositiver CD4-Zellen auch unabhängig von aktivierten CD8-Zellen erfolgen (Brown et al., 2009). In vitro Modelle demonstrierten dabei die entscheidende Bedeutung von IL-2 in der Entwicklung dieser zytotoxischen CD4+-Zellen (Brown et al., 2009). IL-4 hingegen inhibiert die Generation von zytotoxischen CD4+-Zellen (Kienzle et al., 2002). Eine erhöhte IL-2 und IL-4 de novo Synthese wurde von Zedler (2003) bei nichtüberlebenden Schwerbrandverletzten

gefunden. Finnerty und Kollegen zeigten bei schwerbrandverletzten Kindern sowohl eine signifikante Erhöhung von IL-2, als auch von IL-4 und IL-12 nach Trauma (Finnerty et al., 2006). Dabei vermag IL-2 auch ohne Antigenerkennung die zytolytische Aktivität in Lymphozyten zu erhöhen (Tamang et al., 2006). Möglicherweise ist die zunehmende Expression von zytotoxischen Effektormolekülen in CD4+ Lymphozyten post Trauma abhängig vom jeweils vorherrschenden Zytokinmilieu. Leider wurden in dieser Studie ergänzend keine Zytokinprofile ermittelt. Interessanterweise stagnierte entgegen dem Befund bei CD4+ Zellen die Frequenz der CD8+ Zellen, die Perforin und Granzym-B enthielten, über den gesamten Beobachtungszeitraum auf weitgehend gleichem Niveau. Während CD8+ Lymphozyten, die MHC-Klasse-I restriktiv sind hauptsächlich viral infizierte Zellen oder Tumorzellen eliminieren, töten zytotoxische CD4+-Lymphozyten aktivierte MHC-Klasse-II exprimierenden Zellen, also antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen und Monozyten. Dementsprechend wird den CD4+ CTL im Gegensatz zu CD8+ CTL eine immunregulatorische Rolle zugeschrieben (Hahn et al., 1995). Die posttraumatische Expression zytolytischer Moleküle in CD4+ Zellen könnte somit als bedeutsamer Mechanismus zur Begrenzung einer kontinuierlichen Immunantwort gedeutet werden, um einer überbordenden Abwehrreaktion entgegenzuwirken. Auch die Elimination potenziell vom Abwehrsystem als „gefährlich“ einzustufender Effektorzellen nach Beendigung einer Serie von Immunantworten wäre eine denkbare Funktion dieser Zellen. Die in vorliegender Studie nachgewiesene unterschiedliche posttraumatische Expansion der CD4+ und CD8+ CTL in beiden Patientenkollektiven ist unter Umständen als phänotypische Ausprägung der Aktivierung des erworbenen Immunsystems im späteren Verlauf nach schwerem Trauma zu bewerten. Obwohl der genaue Mechanismus der unterschiedlichen Regulation zytotoxischer CD4+- und CD8+- Zellen noch weitgehend unbekannt ist, wird Perforin in CD8+-Zellen konstitutiv exprimiert, wohingegen CD4+ CTL einer Aktivierung bedürfen (Niiya et al., 2005). Der induzierte Erwerb zytotoxischer Eigenschaften von CD4+ Zellen ist durchaus einleuchtend, zumal aktivierte CD4+ CTL in der Lage sind APC zu eliminieren und damit eine Hyperimmunantwort zu verhindern. Eine Aktivierung des spezifischen Immunsystems konnte in vorliegender Studie durch den Nachweis einer verstärkten HLA-DR Expression auf CD3+-Lymphozyten nach schwerer Verbrennungs- oder massiver Mehrfachverletzung erbracht werden. Dennoch kam es nur nach schwerer Mehrfachverletzung zur signifikanten Expansion von CD4+ CTL im posttraumatischen Verlauf, was die Vermutung nahelegt, dass auch das Ausmaß der Deaktivierung antigenpräsentierender Zellen für die Ausprägung zytotoxischer

Eigenschaften eine Rolle spielen könnte. Offensichtlich spiegeln die divergenten Ergebnisse der hier vorgestellten phänotypischen Zellcharakterisierungen nach Verbrennungsverletzung und Polytraumatisierung die unterschiedlichen Mechanismen beider Verletzungsmuster wider. Insbesondere kann bei dem beobachteten differenzierten Auftreten von CD4+ und CD8+ CTL vermutet werden, dass es sich um einen sinnvollen Teil einer Strategie zur Generierung einer effektiven und zugleich protektiven posttraumatischen Immunantwort handelt.

5. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Schweres Unfalltrauma und ausgedehnte tiefe Verbrennungen resultieren in einer nachhaltigen Immundysfunktion. Die posttraumatische Immundysfunktion ist sowohl durch eine sofortige lokale und systemische Entzündungsreaktion charakterisiert als auch durch eine damit korrespondierende Beeinträchtigung der zellvermittelten Immunantwort, auch häufig als Immunparalyse beschrieben. Die komplexe Störung der immunologischen Homöostase manifestiert sich nicht selten in einer erhöhten Suszeptibilität für Infektionen und der Entwicklung von Sepsis und septischem Multiorganversagen nach schwerem Trauma. Der apoptotische Zelltod unterstützt über die Depletion von Immunzellen die posttraumatische Immunsuppression und wird als zugrundeliegender Mechanismus für die septische Organdysfunktion betrachtet. Perforin und Granzym B sind typischerweise Bestandteile der Granula zytotoxischer Zellen und an der Induktion der Apoptose maßgeblich beteiligt.

Das Ziel der vorliegenden Studie war deshalb die Charakterisierung des zytotoxischen Arsenals von T-Lymphozyten unter besonderer Berücksichtigung der CD4+ und CD8+ Subpopulationen nach massiver Mehrfach- oder schwerer Verbrennungsverletzung. Ergänzend wurden Untersuchungen zur Expressionskinetik von Differenzierungsmarkern und weiterer hinsichtlich des zellulären Aktivierungsstatus bzw. des Grades der Immunkompetenz relevanter Oberflächenmoleküle auf peripheren Blutzellen durchgeführt. Für die phänotypisch vergleichende Studie wurde einem Probandenkollektiv einmalig, sowie den Patienten an den Tagen 1,3,5,7 und 10 nach Trauma zu standardisierten Zeitpunkten venöses Blut entnommen und der sofortigen Aufarbeitung und Messung mittels durchflusszytometrischer Analyse zugeführt.

Bei der Untersuchung prozentual anteiliger Verschiebungen leukozytärer Subpopulationen nach Trauma konnten signifikante Veränderungen differenziert nachgewiesen werden. CD56+ NK-Zellen waren im Schwerverbranntenkollektiv posttraumatisch prozentual signifikant erniedrigt, während diese Zellpopulation bei polytraumatisierten Patienten keine Änderungen zeigte. Bei Analyse der T-Helferzellen (CD4+) fand sich ebenfalls ein nichtsignifikanter Frequenzrückgang bei beiden Patientengruppen. Die prozentuale Untersuchung der CD8+-T-Zellen ergab eine signifikante Reduktion bei beiden untersuchten Patientenkollektiven post Trauma.

Beim Nachweis der intrazellulären zytotoxischen Effektormoleküle Perforin und Granzym-B konnten ebenfalls posttraumatisch signifikante Veränderungen festgestellt werden. Bei polytraumatisierten Patienten nahm der Anteil der T-Helferzellen (CD4+), die Perforin und/oder Granzym-B enthielten signifikant zu. Im Kollektiv der Schwerbrandverletzten kam es ebenso, wenn auch nicht signifikant, zu einer prozentualen Expansion dieser Zellpopulation. Aktivierte T-Lymphozyten (CD3+-HLA-DR+) konnten in beiden Patientengruppen nach Trauma prozentual signifikant vermehrt nachgewiesen werden.

Neben diesen lymphozytären Veränderungen nach Trauma wurden außerdem prozentuale Veränderungen peripherer Monozytenpopulationen in der vorliegenden Arbeit analysiert. Das MHC Klasse II Molekül HLA-DR, ein Surrogatmarker der Immunkompetenz auf CD14+ Monozyten war in beiden Patientenkollektiven posttraumatisch signifikant niederreguliert. Bei der Untersuchung der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD40, konnte in der Gruppe der schwerbrandverletzten Patienten eine signifikante prozentuale Abnahme verzeichnet werden, hingegen in der Gruppe der polytraumatisierten Patienten keine Veränderung. Andererseits wiesen Patienten, die eine Brandverletzung erlitten hatten, posttraumatisch eine signifikante Reduktion der CD14+CD16+ Monozyten auf, während diese Veränderung bei polytraumatisierten Patienten kein signifikantes Niveau erreichte.

In der vorliegenden Arbeit wurden anteilige Verschiebungen peripherer mononukleärer Blutzellpopulationen nach schwerer Verbrennungsverletzung oder massiver Polytraumatisierung differenziert nachgewiesen. Die Frage, ob die festgestellten phänotypischen Alterationen in den Patientenkollektiven durch die unterschiedlichen Traumamuster bedingt sind, kann aufgrund der geringen Fallzahlen abschließend nicht beantwortet werden. Bemerkenswert ist es jedoch festzuhalten, dass es im posttraumatischen Verlauf zu einer, zumindest nach Verbrennungsverletzung signifikanten, prozentualen Expansion von zytotoxischen CD4+ T-Zellen kommt, die proapoptotische Effektormoleküle in Form von Perforin und Granzym-B enthalten. Inwieweit diese CD4+ CTL Zellen tatsächlich immunregulatorische Eigenschaften ausüben oder lediglich als diagnostische Marker die posttraumatische Aktivierung des Immunsystems anzeigen, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, zumal in vorliegender Arbeit keine funktionellen Untersuchungen durchgeführt wurden.

6. Literaturverzeichnis

- Alzona M, Jäck HM, Fisher RI, Ellis TM.
IL-12 activates IFN-gamma production through the preferential activation of CD30+ T cells.
J Immunol. 1995 Jan 1;154(1):9-16.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR.
Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care.
Crit Care Med. 2001 Jul;29(7):1303-10.
- Antonacci AC, Reaves LE, Calvano SE, Amand R, De Riesthal HF, Shires GT.
Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations after thermal injury in human beings.
Surg Gynecol Obstet. 1984 Jul;159(1):1-8.
- Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, Easterbrook P, Grey P, Smith D, McMichael AJ, Cooper DA, Rowland-Jones SL, Kelleher AD.
Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo.
J Immunol. 2002 Jun 1;168(11):5954-8.
- Assenmacher M, Löhning M, Scheffold A, Richter A, Miltenyi S, Schmitz J, Radbruch A.
Commitment of individual Th1-like lymphocytes to expression of IFN-gamma versus IL-4 and IL-10: selective induction of IL-10 by sequential stimulation of naive Th cells with IL-12 and IL-4.
J Immunol. 1998 Sep 15;161(6):2825-32.
- Ayala A, Wang P, Ba ZF, Perrin MM, Ertel W, Chaudry IH.
Differential alterations in plasma IL-6 and TNF levels after trauma and hemorrhage.
Am J Physiol. 1991 Jan;260(1 Pt 2):R167-71.
- Bachmann MF, Sebzda E, Kündig TM, Shahinian A, Speiser DE, Mak TW, Ohashi PS.
T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds.
Eur J Immunol. 1996 Sep;26(9):2017-22.
- Berke G.
The CTL's kiss of death.
Cell. 1995 Apr 7;81(1):9-12. Review.
- Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Ulloa L, Yang H, Sudan S, Czura CJ, Ivanova SM, Tracey KJ.
Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway.
J Exp Med. 2002 Mar 18;195(6):781-8.
- Biron CA.
Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of, virus infection.
Curr Opin Immunol. 1994 Aug;6(4):530-8. Review.

Björkman AJ, Binnie RA, Zhang H, Cole LB, Hermodson MA, Mowbray SL. Probing protein-protein interactions. The ribose-binding protein in bacterial transport and chemotaxis. *J Biol Chem.* 1994 Dec 2;269(48):30206-11.

Blazar BA, Rodrick ML, O'Mahony JB, Wood JJ, Bessey PQ, Wilmore DW, Mannick JA. Suppression of natural killer-cell function in humans following thermal and traumatic injury. *J Clin Immunol.* 1986 Jan;6(1):26-36.

Bochud PY, Glauser MP, Calandra T; International Sepsis Forum. Antibiotics in sepsis. *Intensive Care Med.* 2001;27 Suppl 1:S33-48. Review.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:749-95. Review.

Böhrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jllmer T, Männel D, Böttiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martin E, Nawroth PP. Role of NFκB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest.* 1997 Sep 1;100(5):972-85.

Bone RC:
Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS.
Crit Care Med 1996; 24(7): 1125-8.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992 Jun;101(6):1644-55. Review.

Borgerson KL, Bretz JD, Baker JR Jr. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease. *Autoimmunity.* 1999;30(4):251-64. Review.

Brown DM, Kamperschroer C, Dilzer AM, Roberts DM, Swain SL. IL-2 and antigen dose differentially regulate perforin- and FasL-mediated cytolytic activity in antigen specific CD4+ T cells. *Cell Immunol.* 2009;257(1-2):69-79. Epub 2009 Mar 31.

Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl 1:S64-74. Review.

Brunda MJ, Herberman RB, Holden HT. Inhibition of murine natural killer cell activity by prostaglandins. *J Immunol.* 1980 Jun;124(6):2682-7.

Brunkhorst FM.
[Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]
Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther. 2006 Jan;41(1):43-4.

Brunn GJ, Platt JL.
The etiology of sepsis: turned inside out.
Trends Mol Med. 2006 Jan;12(1):10-6. Epub 2005 Nov 18.

Carreno BM, Collins M.
The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses.
Annu Rev Immunol. 2002;20:29-53. Epub 2001 Oct 4. Review.

Catalfamo M, Henkart PA.
Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway.
Curr Opin Immunol. 2003 Oct;15(5):522-7. Review.

Chambers CA, Allison JP.
Costimulatory regulation of T cell function.
Curr Opin Cell Biol. 1999 Apr;11(2):203-10. Review.

Cheadle WG.
The human leukocyte antigens and their relationship to infection.
Am J Surg. 1993 Feb;165(2A Suppl):75S-81S. Review.

Cheadle WG, Pemberton RM, Robinson D, Livingston DH, Rodriguez JL, Polk HC Jr.
Lymphocyte subset responses to trauma and sepsis.
J Trauma. 1993 Dec;35(6):844-9.

Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G.
Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions.
J Immunol. 2001 Apr 1;166(7):4312-8.

Cullen SP, Martin SJ.
Mechanisms of granule-dependent killing.
Cell Death Differ. 2008 Feb;15(2):251-62. Epub 2007 Nov 2. Review.

Dayyani F, Belge KU, Frankenberger M, Mack M, Berki T, Ziegler-Heitbrock L.
Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes.
J Leukoc Biol. 2003 Jul;74(1):33-9.

DeCamp MM, Demling RH.
Posttraumatic multisystem organ failure.
JAMA. 1988 Jul 22-29;260(4):530-4. Review.

Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S.
Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production.
J Immunol. 1993 Jan 15;150(2):353-60.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE.
Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.
J Exp Med. 1991 Nov 1;174(5):1209-20.

de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE.
Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression.
J Exp Med. 1991 Oct 1;174(4):915-24.

Ditschkowski M, Kreuzfelder E, Majetschak M, Obertacke U, Schade UF, Grosse-Wilde H.
Reduced B cell HLA-DR expression and natural killer cell counts in patients prone to sepsis after injury.
Eur J Surg. 1999 Dec;165(12):1129-33.

el-Sameea ER, Metwally SS, Mashhour E, el-Bendary A, Hassan AM, el-Sharkawy H, el-Shennaway FA.
Evaluation of natural killer cells as diagnostic markers of early onset neonatal sepsis: comparison with C-reactive protein and interleukin-8.
Egypt J Immunol. 2004;11(1):91-102.

Ertel W, Faist E.
[Immunologic monitoring after severe trauma]
Unfallchirurg. 1993 Apr;96(4):200-12. Review.

Ertel W, Keel M, Ungethüm U, Trentz O.
[Endotoxin inhibits apoptosis of neutrophilic granulocytes via tyrosine phosphorylation]
Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd. 1998;115(Suppl I):397-8. German.

Faist E, Kupper TS, Baker CC, Chaudry IH, Dwyer J, Baue AE.
Depression of cellular immunity after major injury. Its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation.
Arch Surg. 1986 Sep;121(9):1000-5.

Faist E, Mewes A, Baker CC, Strasser T, Alkan SS, Rieber P, Heberer G.
Prostaglandin E2 (PGE2)-dependent suppression of interleukin alpha (IL-2) production in patients with major trauma.
J Trauma. 1987 Aug;27(8):837-48.

Faist E, Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, Von Donnersmarck GH, Schildberg FW.
Inadequate interleukin-2 synthesis and interleukin-2 messenger expression following thermal and mechanical trauma in humans is caused by defective transmembrane signalling.
J Trauma. 1993 Jun;34(6):846-53; discussion 853-4.

Faist E.
The mechanisms of host defense dysfunction following shock and trauma.
Curr Top Microbiol Immunol. 1996;216:259-74. Review.

- Faist E, Wichmann MW.
[Immunology in the severely injured]
Chirurg. 1997 Nov;68(11):1066-70. Review. German.
- Feeney C, Bryzman S, Kong L, Brazil H, Deutsch R, Fritz LC.
T-lymphocyte subsets in acute illness.
Crit Care Med. 1995 Oct;23(10):1680-5.
- Filipovich AH.
Hemophagocytic lymphohistiocytosis and related disorders.
Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2006 Dec;6(6):410-5. Review.
- Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HW.
The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients.
Blood. 1993 Nov 15;82(10):3170-6.
- Finnerty CC, Herndon DN, Przkora R, Pereira CT, Oliveira HM, Queiroz DM, Rocha AM, Jeschke MG.
Cytokine expression profile over time in severely burned pediatric patients.
Shock. 2006 Jul;26(1):13-9.
- Friedman P, Haimovitz R, Markman O, Roberts MF, Shinitzky M.
Conversion of lysophospholipids to cyclic lysophosphatidic acid by phospholipase D.
J Biol Chem. 1996 Jan 12;271(2):953-7.
- Fukuzuka K, Edwards CK 3rd, Clare-Salzer M, Copeland EM 3rd, Moldawer LL, Mozingo DW.
Glucocorticoid and Fas ligand induced mucosal lymphocyte apoptosis after burn injury.
J Trauma. 2000 Oct;49(4):710-6.
- Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, Strecker W, Kinzl L, Brückner UB.
Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans?
Arch Surg. 2000 Mar;135(3):291-5.
- Gold JA, Parsey M, Hoshino Y, Hoshino S, Nolan A, Yee H, Tse DB, Weiden MD.
CD40 contributes to lethality in acute sepsis: in vivo role for CD40 in innate immunity.
Infect Immun. 2003 Jun;71(6):3521-8.
- Green DR, Faist E.
Trauma and the immune response.
Immunol Today. 1988 Sep;9(9):253-5.
- Greenspan L, McLellan BA, Greig H.
Abbreviated Injury Scale and Injury Severity Score: a scoring chart.
J Trauma. 1985 Jan;25(1):60-4.
- Greisman SE, Young EJ.
Mechanisms of endotoxin tolerance. VI. Transfer of the "anamnestic" tolerant response with primed spleen cells.
J Immunol. 1969 Dec;103(6):1237-41.

Grewal IS, Flavell RA.
The CD40 ligand. At the center of the immune universe?
Immunol Res 1997; 16:59-70.

Groux H, Sornasse T, Cottrez F, de Vries JE, Coffman RL, Roncarolo MG, Yssel H.
Induction of human T helper cell type 1 differentiation results in loss of IFN-gamma receptor beta-chain expression.
J Immunol. 1997 Jun 15;158(12):5627-31.

Guo Z, Kavanagh E, Zang Y, Dolan SM, Kriynovich SJ, Mannick JA, Lederer JA.
Burn injury promotes antigen-driven Th2-type responses in vivo.
J Immunol. 2003 Oct 15;171(8):3983-90.

Hahn S, Gehri R, Erb P.
Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity.
Immunol Rev. 1995 Aug;146:57-79. Review.

Hannet, I., Erkeller-Yuksel, F., Lydyard, P., Deneys, V., DeBruyère, M.
Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations.
Immunol. Today 1992, 13, 215-218.

Härter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M.
Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis.
Shock. 2004 Nov;22(5):403-9.

Heidecke CD, Hensler T, Weighardt H, Zantl N, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B.
Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection.
Am J Surg. 1999 Oct;178(4):288-92.

Henkart PA.
Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules.
Immunity. 1994 Aug;1(5):343-6. Review.

Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC Jr. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient.
Br J Surg. 1990 Feb;77(2):204-7.

Holub M, Klucková Z, Helcl M, Príhodov J, Rokyta R, Beran O.
Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis.
Clin Microbiol Infect. 2003 Mar;9(3):202-11.

Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM,
Buchman TG, Karl IE.
Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction.
Crit Care Med. 1999 Jul;27(7):1230-51.

Hoyt DB, Ozkan AN, Ninnemann JL, Hansbrough JF, Pinney E, Wormsley S.
Trauma peptide induction of lymphocyte changes predictive of sepsis.
J Surg Res. 1988 Oct;45(4):342-8.

Hsieh YC, Athar M, Chaudry IH.

When apoptosis meets autophagy: deciding cell fate after trauma and sepsis.

Trends Mol Med. 2009 Mar;15(3):129-38. Epub 2009 Feb 21.

Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH.

Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells.

J Exp Med. 2000 Nov 6;192(9):1213-22.

Ju ST, Cui H, Panka DJ, Ettinger R, Marshak-Rothstein A.

Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T cells.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 May 10;91(10):4185-9.

Kerr JF.

Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death.

J Pathol. 1971 Sep;105(1):13-20.

Kienzle N, Buttigieg K, Groves P, Kawula T, Kelso A.

A clonal culture system demonstrates that IL-4 induces a subpopulation of noncytolytic T cells with low CD8, perforin, and granzyme expression.

J Immunol. 2002 Feb 15;168(4):1672-81.

Koren HS, Ax W, Freund-Moelbert E.

Morphological observations on the contact-induced lysis of target cells.

Eur J Immunol. 1973 Jan;3(1):32-7.

Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin KM.

Regulation of apoptosis in the immune system.

Curr Opin Immunol. 1994 Apr;6(2):279-89. Review.

Lanier LL, Serafini AT, Ruitenberg JJ, Cwirla S, Federspiel NA, Phillips JH, Allison JP, Weiss A.

The gamma T-cell antigen receptor.

J Clin Immunol. 1987 Nov;7(6):429-40. Review.

Lantz M, Gullberg U, Nilsson E, Olsson I.

Characterization in vitro of a human tumor necrosis factor-binding protein. A soluble form of a tumor necrosis factor receptor.

J Clin Invest. 1990 Nov;86(5):1396-1402.

Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA.

The effects of injury on the adaptive immune response.

Shock. 1999 Mar;11(3):153-9. Review.

Livingston DH, Appel SH, Wellhausen SR, Sonnenfeld G, Polk HC Jr.

Depressed interferon gamma production and monocyte HLA-DR expression after severe injury.

Arch Surg. 1988 Nov;123(11):1309-12.

Livingston DH, Malangoni MA.

Interferon-gamma restores immune competence after hemorrhagic shock.

J Surg Res. 1988 Jul;45(1):37-43.

Mabrouk A, Maher A, Nasser S.

An epidemiologic study of elderly burn patients in Ain Shams University Burn Unit, Cairo, Egypt.

Burns. 2003 Nov;29(7):687-90.

Madden KS, Sanders VM, Felten DL.

Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness.

Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1995;35:417-48. Review.

Maggi E, Giudizi MG, Biagiotti R, Annunziato F, Manetti R, Piccinni MP, Parronchi P, Sampognaro S, Giannarini L, Zuccati G, Romagnani S.

Th2-like CD8+ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection.

J Exp Med. 1994 Aug 1;180(2):489-95.

Markewitz A, Faist E, Lang S, Hültner L, Weinhold C, Reichart B.

An imbalance in T-helper cell subsets alters immune response after cardiac surgery.

Eur J Cardiothorac Surg. 1996;10(1):61-7.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr.

A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.

Nature. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.

Mosmann TR, Coffman RL.

TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.

Annu Rev Immunol. 1989;7:145-73. Review.

Motyka B, Korbutt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M, Barry M, Shostak I, Sawchuk T, Holmes CF, Gauldie J, Bleackley RC.

Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis.

Cell. 2000 Oct 27;103(3):491-500.

Munford RS, Pugin J.

Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive.

Am J Respir Crit Care Med. 2001 Feb;163(2):316-21. Review.

Nakata M, Kawasaki A, Azuma M, Tsuji K, Matsuda H, Shinkai Y, Yagita H, Okumura K. Expression of perforin and cytolytic potential of human peripheral blood lymphocyte subpopulations.

Int Immunol. 1992 Sep;4(9):1049-54.

Namekawa T, Wagner UG, Goronzy JJ, Weyand CM.

Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis.

Arthritis Rheum. 1998 Dec;41(12):2108-16.

Neidhardt R, Keel M, Steckholzer U, Safret A, Ungethuem U, Trentz O, Ertel W. Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. *J Trauma*. 1997 May;42(5):863-70; discussion 870-1.

Newton S, Ding Y, Chung CS, Chen Y, Lomas-Neira JL, Ayala A. Sepsis-induced changes in macrophage co-stimulatory molecule expression: CD86 as a regulator of anti-inflammatory IL-10 response. *Surg Infect (Larchmt)*. 2004 Winter;5(4):375-83.

Niiya H, Sakai I, Lei J, Azuma T, Uchida N, Yakushijin Y, Hato T, Fujita S, Yasukawa M. Differential regulation of perforin expression in human CD4+ and CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Exp Hematol*. 2005 Jul;33(7):811-8.

Nyström PO. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J Antimicrob Chemother*. 1998 Jan;41 Suppl A:1-7. Review.

Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J*. 2001 Apr;15(6):879-92. Review.

O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DH, Mannick JA, Rodrick ML. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg*. 1995 Oct;222(4):482-90; discussion 490-2.

Patenaude J, D'Elia M, Hamelin C, Garrel D, Bernier J. Burn injury induces a change in T cell homeostasis affecting preferentially CD4+ T cells. *J Leukoc Biol*. 2005 Feb;77(2):141-50. Epub 2004 Nov 12.

Porakishvili N, Kardava L, Jewell AP, Yong K, Glennie MJ, Akbar A, Lydyard PM. Cytotoxic CD4+ T cells in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia kill via a perforin-mediated pathway. *Haematologica*. 2004 Apr;89(4):435-43.

Quattrocchi KB, Frank EH, Miller CH, Amin A, Issel BW, Wagner FC Jr. Impairment of helper T-cell function and lymphokine-activated killer cytotoxicity following severe head injury. *J Neurosurg*. 1991 Nov;75(5):766-73.

Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*. 1998 Jun 4;393(6684):474-8.

Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, Bloom BR. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*. 1991 Oct 11;254(5029):279-82.

Scherberich JE.

Proinflammatory blood monocytes: main effector and target cells in systemic and renal disease; background and therapeutic implications.

Int J Clin Pharmacol Ther. 2003 Oct;41(10):459-64. Review.

Scherberich JE, Nockher WA.

CD14++ monocytes, CD14+/CD16+ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy.

Clin Chem Lab Med. 1999 Mar;37(3):209-13. Review.

Schlüter B, König B, Bergmann U, Müller FE, König W.

Interleukin 6--a potential mediator of lethal sepsis after major thermal trauma: evidence for increased IL-6 production by peripheral blood mononuclear cells.

J Trauma. 1991 Dec;31(12):1663-70.

Schlüter B, König W, Köller M, Erbs G, Müller FE.

Differential regulation of T- and B-lymphocyte activation in severely burned patients.

J Trauma. 1991 Feb;31(2):239-46.

Shimonkevitz R, Northrop J, Harris L, Craun M, Bar-Or D.

Interleukin-16 expression in the peripheral blood and CD8 T lymphocytes after traumatic injury.

J Trauma. 2005 Feb;58(2):252-8.

Shinde S, Wu Y, Guo Y, Niu Q, Xu J, Grewal IS, Flavell R, Liu Y.

CD40L is important for induction of, but not response to, costimulatory activity. ICAM-1 as the second costimulatory molecule rapidly up-regulated by CD40L.

J Immunol. 1996 Oct 1;157(7):2764-8.

Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE.

CD80 and CD86 are not equivalent in their ability to induce the tyrosine phosphorylation of CD28.

J Biol Chem. 1999 Jan 29;274(5):3116-24.

Stalder T, Hahn S, Erb P.

Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity.

J Immunol. 1994 Feb 1;152(3):1127-33.

Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 2006 für die Bundesrepublik Deutschland.
4 A.D.

Stuhler G, Walden P.

Collaboration of helper and cytotoxic T lymphocytes.

Eur J Immunol. 1993 Sep;23(9):2279-86.

Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S.

Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage.

J Immunol. 1995 Apr 15;154(8):3806-13.

Sugimoto K, Galle C, Preiser JC, Creteur J, Vincent JL, Pradier O.

Monocyte CD40 expression in severe sepsis.

Shock. 2003 Jan;19(1):24-7.

Tamang DL, Redelman D, Alves BN, Vollger L, Bethley C, Hudig D.
Induction of granzyme B and T cell cytotoxic capacity by IL-2 or IL-15 without antigens:
multiclonal responses that are extremely lytic if triggered and short-lived after cytokine
withdrawal.

Cytokine. 2006 Nov;36(3-4):148-59. Epub 2006 Dec 22.

Teodorczyk-Injeyan JA, Cembrzynska-Nowak M, Lalani S, Peters WJ, Mills GB.
Immune deficiency following thermal trauma is associated with apoptotic cell death.
J Clin Immunol. 1995 Nov;15(6):318-28.

Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH.
Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis.
Science. 1989 Jul 21;245(4915):301-5.

Tschaikowsky K, Hedwig-Geissling M, Schiele A, Bremer F, Schywalsky M, Schüttler J.
Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis:
Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression,
procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative
patients.

Crit Care Med. 2002 May;30(5):1015-23.

van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frölich M.
Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients.
Lancet. 1998 Mar 28;351(9107):950-3.

Vassalli P.
The pathophysiology of tumor necrosis factors.
Annu Rev Immunol. 1992;10:411-52. Review.

Vassalli P, Grau GE, Piguet PF.
TNF in autoimmune diseases, graft-versus-host reactions, and pulmonary fibrosis.
Immunol Ser. 1992;56:409-30. Review.

Vaux DL, Haecker G, Strasser A.
An evolutionary perspective on apoptosis.
Cell. 1994 Mar 11;76(5):777-9. Review.

Verret CR, Firmenich AA, Kranz DM, Eisen HN.
Resistance of cytotoxic T lymphocytes to the lytic effects of their toxic granules.
J Exp Med. 1987 Nov 1;166(5):1536-47.

Vincent JL, Mercan D.
Dear Sirs, what is your PCT?
Intensive Care Med. 2000 Sep;26(9):1170-1.

Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I.
Immunosuppressive effects of apoptotic cells.
Nature. 1997 Nov 27;390(6658):350-1.

Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA.
Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis.
Nat Rev Immunol. 2006 Dec;6(12):940-52. Review.

Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM.
Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes.
Blood. 2000 Jan 1;95(1):231-40.

Williams NS, Engelhard VH.
Identification of a population of CD4+ CTL that utilizes a perforin- rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism.
J Immunol. 1996 Jan 1;156(1):153-9.

Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ.
Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery.
Br J Surg. 1993 Feb;80(2):205-9.

Wanner GA, Keel M, Steckholzer U, Beier W, Stocker R, Ertel W.
Relationship between procalcitonin plasma levels and severity of injury, sepsis, organ failure, and mortality in injured patients.
Crit Care Med. 2000 Apr;28(4):950-7.

Waydhas C, Nast-Kolb D, Trupka A, Zettl R, Kick M, Wiesholler J, Schweiberer L, Jochum M.
Posttraumatic inflammatory response, secondary operations, and late multiple organ failure.
J Trauma. 1996 Apr;40(4):624-30; discussion 630-1.

Weiner HL.
Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells.
Microbes Infect. 2001 Sep;3(11):947-54. Review.

Yadav K, Zehtabchi S, Nemes PC, Miller AC, Azher M, Durkin H, Sinert R.
Early immunologic responses to trauma in the emergency department patients with major injuries.
Resuscitation. 2009 Jan;80(1):83-8. Epub 2008 Nov 7.

Yonehara S, Ishii A, Yonehara M.
A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor.
J Exp Med. 1989 May 1;169(5):1747-56.

Zedler, Siegfried (2003):
Phänotypische und funktionelle Charakterisierung lymphozytärer Subpopulationen nach ausgedehnter Verbrennungsverletzung.
Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät

Zedler S, Faist E, Ostermeier B, von Donnersmarck GH, Schildberg FW.
Postburn constitutional changes in T-cell reactivity occur in CD8+ rather than in CD4+ cells.

J Trauma. 1997 May;42(5):872-80; discussion 880-1.

Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH, Faist E.
T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns.
Crit Care Med. 1999 Jan;27(1):66-72.

Zedler S, Faist E.
The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation.
Curr Opin Crit Care. 2006 Dec;12(6):595-601. Review.

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

7. Abkürzungen

| | |
|-----------------|--|
| Aq. inject. | Aqua ad injectabilia |
| ANOVA | analysis of variance |
| APC | antigen presenting cell |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| BID | BH3-interacting domain death agonist |
| BT | Burn trauma |
| °C | Grad Celsius |
| Ca 2+ | Calcium |
| CARS | compensatory anti-inflammatory response syndrome |
| CD | cluster of differentiation |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CTL | cytotoxic T-lymphocyte |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| EDTA | Ethyldiamintetraessigsäure |
| FADD | Fas associated protein with death domain |
| FACS | Fluorescence activated cell sorter |
| Fas | Fibroblast associated |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| g | Gramm |
| GM-CSF | granulocyte-macrophage-colony stimulating factor |
| HEPES | (N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansäure)) |
| HLA | human leucocyte antigen |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IRAK | IL-2-Rezeptor assoziierte Kinase |
| ISS | Injury Severity Score |
| Ko | Kontrolle |
| kDa | Kilodalton |
| KOF | Körperoberfläche |

| | |
|------------------|------------------------------------|
| LPS | Lipopolsaccharid |
| μ | mikro |
| m | milli |
| ml | Milliliter |
| MFI | mittlere Fluoreszenz Intensität |
| MHC | major histocompatibility complex |
| Mn | mean |
| MOV | Multiorganversagen |
| NaN ₃ | Natriumazid |
| NF κ B | nuclear factor-kappa B |
| NK | natural killer |
| PARP | poly ADP ribose polymerase |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cells |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PC5 | Phycoerythrin-Cyan 5 |
| PGE | Prostaglandin E |
| PT | Polytrauma |
| SF | Standardfehler |
| Tc | T-cytotoxic |
| Th | T-helper |
| TCR | T-cell-receptor |
| TLR | Toll-like-receptor |
| TGF | Tissue growth factor |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| vs. | versus |
| U | units |

8. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zur Realisierung dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Eugen Faist gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des außerordentlich interessanten Themas dieser Arbeit.

Besonderen Dank bin ich auch Herrn Dr. rer. biol. hum. Siegfried Zedler verpflichtet, der durch seine engagierte Betreuung sowohl während des experimentellen Teiles der Arbeit, als auch während dessen Fertigstellung mich tatkräftig unterstützte.

Frau Maren Klein, MTA, möchte ich zudem für die freundliche Unterstützung während des Messens der Proben am Durchflusszytometer danken.

Herrn Oberarzt Dr. med. G. Henkel von Donnersmark, Herrn Prof. Dr. med. Mühlbauer und Herrn Prof. Dr. med. M. Ninkovic (Abteilung für Plastische, Rekonstruktive und Handchirurgie - Zentrum für Schwerbrandverletzte des Städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen) danke ich für die tatkräftige Unterstützung während des klinischen Teiles der Studie.

Herrn Prof. Dr. med. K.-W. Jauch (Chirurgische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians Universität München, Klinikum Großhadern) danke ich für die tatkräftige Unterstützung während des klinischen Teiles der Studie.

Herrn Prof. Dr. med. W. Mutschler Chirurgische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians Universität München, Klinikum Innenstadt danke ich für die tatkräftige Unterstützung während des klinischen Teiles der Studie.

Herrn Dr. med. E. F. J. Höcherl (Klinik für Unfallchirurgie des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing) danke ich für die tatkräftige Unterstützung während des klinischen Teiles der Studie.

9. Lebenslauf

Daniel Johannes Noss

Geboren: 11.09.1976 in Freiburg im Breisgau

Eltern: Johanna Noss-Tramontin
Dr. med. Ulrich Noss (Frauenarzt)

Geschwister: Lisa Noss, geb.1.3.1981
Lena Noss, geb.22.9.1983

Grundschule: St.Canisius in München 1984-1987

Gymnasium: Ludwigsgymnasium und Theresiengymnasium in München

Abitur: 1997

Zivildienst: Klinikum Grosshadern 1997-1998

Immatrikulation: 1998 Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät für Humanmedizin

Physikum: 2000 an der LMU

1. Staatsexamen: 2001 an der LMU

2. Staatsexamen: 2003 an der LMU

Praktisches Jahr: Chirurgie Universitätsklinikum München Grosshadern
(Direktor: Prof. Dr. med. Jauch)

Innere Medizin: Universitätsspital Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. Follath)

Frauenheilkunde: Universitätsklinikum München Grosshadern
(Direktor: Prof. Dr. med. Hepp)

3. Staatsexamen: 2004 an der LMU

Assistenzarztausbildung: 10/2005-2/2007 Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe
der Klinik vom Roten Kreuz München
(Direktor: Prof. Dr. med. Eiermann)

seit 3/2007 Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität Regensburg
(Direktor: Prof. Dr. med. Ortmann)