

Aus der Klinik für Nephrologie und Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Quantifizierung und detaillierte Charakterisierung von low-
density granulocytes in systemischen Vaskulitiden und
Inflammationen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tom Philipp Jäger

aus Königs Wusterhausen

Datum der Promotion: 18.09.2020

Inhaltsverzeichnis

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung.....	9
Abstract	11
1. Einleitung	13
1.1 Die Rolle von Granulozyten im Immunsystem.....	13
1.2 Wirkmechanismen von Granulozyten	14
1.3 Neutrophile Heterogenität	14
1.4 Der Terminus „low-density granulocytes“	15
1.5 Herkunft und Charakterisierung von LDGs	15
1.6 LDGs in Autoimmunerkrankungen	17
1.6.1 ANCA-assoziierte Vaskulitiden	17
1.6.1.1 Geschichte und aktuelle Nomenklatur.....	17
1.6.1.2 Die Rolle von ANCA in der Pathogenese von AAV.....	18
1.6.1.3 Die Mögliche Rolle von LDGs in der Pathogenese von AAV	20
1.7 LDGs in systemischen Inflammationen	21
1.7.1 Kriterien und Bedeutung von SIRS und Sepsis	21
1.7.2 Pathogenese von systemischen Inflammationen	22
1.7.3 Die Rolle von LDGs in der Pathogenese von systemischen Inflammationen	23
2. Ziel der Arbeit.....	24
3. Methodik.....	25
3.1 Material	25
3.1.1 Geräte.....	25
3.1.2 Verbrauchsmaterial.....	25
3.1.3 Reagenzien.....	26
3.1.4 Antikörper.....	27
3.1.5 Software	27
3.2 Auswahl der Patienten	27
3.2.1 Zeitraum und Setting	27
3.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien	28
3.2.2.1 Kontrollgruppe	28
3.2.2.2 Vaskulitis-Gruppe	28
3.2.2.3 Sepsis-Gruppe	29
3.2.3 Resultierendes Patientenkollektiv.....	29
3.2.3.1 Kontrollgruppe	29
3.2.3.2 Vaskulitis-Gruppe	30
3.2.3.3 SIRS/Sepsis-Gruppe.....	30
3.3 Gewinnung von Blutproben	32
3.3.1 Kontrollgruppe	32
3.3.2 Vaskulitis-Gruppe.....	32
3.3.3 SIRS/Sepsis-Gruppe	32
3.4 Bluttransport, Dokumentation und Aufbereitung der Blutproben	33
3.4.1 Bluttransport	33
3.4.2 Dokumentation	33
3.4.3 Isolation humaner Blutzellen	33
3.4.4 Bestimmung der Zellzahl	34
3.4.5 Prinzipien der direkten Immunfluoreszenzfärbung.....	35
3.4.6 Herstellung der Antikörper-Verdünnung.....	35

3.4.7 Anwendung der Immunfluoreszenzfärbung	36
3.5 Durchflusszytometrische Messung	37
3.5.1 Funktionsweise des FACS	37
3.5.2 Durchführung des FACS-Messung und Datenerhebung	40
3.5.3 Datenerhebung über SAP und Copra	43
3.6 In vitro Stimulation („Spiking“)	44
3.7 Statistische Datenauswertung.....	45
4. Ergebnisse	47
4.1 Patientencharakteristika.....	47
4.1.1 Kontrollgruppe	47
4.1.2 Vaskulitis-Gruppe.....	47
4.1.3 SIRS/Sepsis-Gruppe	49
4.2 Vergleich der LDG-Anteile an den PBMCs (nach FSC-SSC).....	50
4.2.1 Vergleich Kontrollgruppe versus Vaskulitis-Gruppe	51
4.2.2 Vergleich Kontrollgruppe versus SIRS/Sepsis-Gruppe	51
4.3 Vergleich der LDG-Fraktion an den PBMCs (nach FSC-SSC und CD66b).....	52
4.3.1 Vergleich Kontrollgruppe versus Vaskulitis-Gruppe	52
4.3.2 Vergleich der Gruppen mit aktiver versus inaktiver Vaskulitis	53
4.3.3 Vergleich Kontrollgruppe versus SIRS/Sepsis-Gruppe.....	54
4.4 Vergleich der Rezeptorexpression von LDGs und PMNs in den untersuchten Gruppen.....	55
4.4.1 Kontrollgruppe	55
4.4.1.1 Anteile von Rezeptor-positiven PMNs versus LDGs	55
4.4.1.2 MFI	57
4.4.2 Vaskulitis-Gruppe.....	58
4.4.2.1 Anteile von Rezeptor-positiven PMNs versus LDGs	58
4.4.2.2 MFI	60
4.4.3 SIRS/Sepsis-Gruppe	61
4.4.3.1 Anteile von Rezeptor-positiven PMNs versus LDGs	61
4.4.3.2 MFI	62
4.5 Vergleich der Rezeptorexpression von PMNs	62
4.5.1 Kontrollgruppe versus Vaskulitis-Gruppe	63
4.5.1.1 Anteile von Rezeptor-positiven PMNs	63
4.5.1.2 MFI	64
4.5.2 Inaktive versus aktive Vaskulitis	65
4.5.2.1 Anteile von Rezeptor-positiven PMNs	65
4.5.2.2 MFI	66
4.5.3 Kontrollgruppe versus SIRS/Sepsis-Gruppe.....	67
4.5.3.1 Anteile von Rezeptor-positiven PMNs	67
4.5.3.2 MFI	68
4.6 Vergleich der Rezeptorexpression von LDGs	70
4.6.1 Kontrollgruppe versus Vaskulitis-Gruppe	70
4.6.1.1 Anteile von Rezeptor-positiven LDGs.....	70
4.6.1.2 MFI	71
4.6.2 Inaktive versus aktive Vaskulitis	72
4.6.2.1 Anteile von Rezeptor-positiven LDGs.....	72
4.6.2.2 MFI	73
4.6.3 Kontrollgruppe versus SIRS/Sepsis-Gruppe.....	74
4.6.3.1 Anteile von Rezeptor-positiven LDGs.....	74
4.6.3.2 MFI	75
4.7 Übersicht der Rezeptorexpressionen.....	77
4.8 Korrelationen zwischen Rezeptorexpression und klinischen Parametern	78
4.8.1 Vaskulitis-Gruppe.....	78

4.8.1.1 PMN	78
4.8.1.2 LDGs	79
4.8.2 SIRS/Sepsis-Gruppe	83
4.8.2.1 PMNs	83
4.8.2.2 LDGs	84
4.9 Stimulation von LDGs	87
5. Diskussion	89
5.1 Vorkommen von LDGs	89
5.2 Charakterisierung des Oberflächenprofils von LDGs	90
5.3 Einfluss von systemischen Vaskulitiden auf die Rezeptorexpression von PMNs und LDGs	92
5.4 Einfluss systemischer Inflammation auf die Rezeptorexpression von PMNs und LDGs	93
5.5 Korrelationen zwischen klinischen Parametern und der Rezeptorexpression von LDGs in Vaskulitiden	93
5.6 Korrelationen zwischen klinischen Parametern und der Rezeptorexpression von LDGs in systemischen Inflammationen	95
5.7 Herkunft von LDGs	96
5.8 Limitationen	97
5.9 Fazit und Ausblick	97
6. Literaturverzeichnis	99
Eidesstattliche Versicherung	105
Tabellarischer Lebenslauf	106
Danksagung	107

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Geräteverzeichnis	25
Tabelle 2: Verzeichnis der Verbrauchsmaterialien.....	25
Tabelle 3: Verzeichnis der Reagenzien	26
Tabelle 4: Verzeichnis der Antikörper.....	27
Tabelle 5: Softwareverzeichnis.....	27
Tabelle 6: Eigenschaften und Wirkweisen der verwendeten Laser modifiziert nach BD FACS CANTO II Brochure Research	39
Tabelle 7: Pipettierschema der in vitro Stimulation („Spiking“) von Vollblut-Proben.....	45
Tabelle 8: Übersicht der Geschlechterverteilung in den Studiengruppen	47
Tabelle 9: Übersicht der Altersverteilung in den Studiengruppen.....	47
Tabelle 10: Übersicht der erfassten numerischen klinischen Parameter in der Vaskulitis-Gruppe	48
Tabelle 11: Häufigkeiten der erfassten nominalen Parameter in der Vaskulitis-Gruppe.....	48
Tabelle 12: Übersicht der erfassten numerischen klinischen Parameter in der SIRS/Sepsis-Gruppe	49
Tabelle 13: Übersicht der erfassten nominalen Parameter in der SIRS/Sepsis-Gruppe	50
Tabelle 14: Vergleich des LDG-Anteils an PBMCs zwischen Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe.....	51
Tabelle 15: Vergleich des LDG-Anteils an PBMCs zwischen Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe	52
Tabelle 16: Vergleich des Anteils CD66b-positiver LDGs an PBMCs zwischen Kontroll- und Vaskulitis- Gruppe	53
Tabelle 17: Vergleich des Anteils CD66b-positiver LDGs an PBMCs zwischen inaktiven und aktiven Vaskulitiden.....	54
Tabelle 18: Vergleich des Anteils CD66b-positiver LDGs an PBMCs zwischen Kontroll- und SIRS/Sepsis- Gruppe	54
Tabelle 19: Anteil Rezeptor-positiver PMNs und LDGs an der Gesamtpopulation der Kontrollgruppe.....	56
Tabelle 20: MFI von PMNs und LDGs in der Kontrollgruppe nach Rezeptoren	58
Tabelle 21: Anteil Rezeptor-positiver PMNs und LDGs an der Gesamtpopulation der Vaskulitis-Gruppe	59
Tabelle 22: MFI von PMNs und LDGs in der Vaskulitis-Gruppe nach Rezeptoren	60
Tabelle 23: Anteil Rezeptor-positiver PMNs und LDGs an der Gesamtpopulation der SIRS/Sepsis- Gruppe	61
Tabelle 24: MFI von PMNs und LDGs in der SIRS/Sepsis-Gruppe nach Rezeptoren	62
Tabelle 25: Anteil Rezeptor-positiver (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) PMNs an der Gesamtpopulation von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe	63
Tabelle 26: MFI der PMNs von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe nach Rezeptoren.....	64
Tabelle 27: Anteil Rezeptor-positiver (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) PMNs an der Gesamtpopulation bei inaktiven und aktiven Vaskulitiden.....	65
Tabelle 28: MFI von PMNs in inaktiven und aktiven Vaskulitiden nach Rezeptoren.....	66
Tabelle 29: Anteil Rezeptor-positiver (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) PMNs an der Gesamtpopulation von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe	68
Tabelle 30: MFI der PMNs von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe nach Rezeptoren.....	69
Tabelle 31: Anteil Rezeptor-positiver (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) LDGs an der Gesamtpopulation von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe	70
Tabelle 32: MFI der LDGs von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe nach Rezeptoren	71
Tabelle 33: Anteil Rezeptor-positiver (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) LDGs an der Gesamtpopulation bei inaktiven und aktiven Vaskulitiden	72
Tabelle 34: MFI von LDGs in inaktiven und aktiven Vaskulitiden nach Rezeptoren	73
Tabelle 35: Anteil Rezeptor-positiver (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) LDGs an der Gesamtpopulation von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe	75
Tabelle 36: MFI der LDGs von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe nach Rezeptoren	76
Tabelle 37: Korrelationen zwischen Rezeptorexpression der PMN -Population und klinischen Parametern in der Vaskulitis-Gruppe.....	81
Tabelle 38: Korrelationen zwischen Rezeptorexpression der LDG-Population und klinischen Parametern in der Vaskulitis-Gruppe.....	82
Tabelle 39: Korrelationen zwischen Rezeptorexpression der PMN -Population und klinischen Parametern in der SIRS/Sepsis-Gruppe.....	85
Tabelle 40: Korrelationen zwischen Rezeptorexpression der LDG -Population und klinischen Parametern in der SIRS/Sepsis-Gruppe.....	86
Tabelle 41: Vergleich des Anteils von LDGs an PBMCs in % nach verwendeter Methode	87

Abbildung 1: Flussdiagramm der eingeschlossenen Patienten in der Kontrollgruppe, der Vaskulitis-Gruppe und der SIRS/Sepsis-Gruppe	31
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Ablaufs der Immunfluoreszenzfärbung	37
Abbildung 3: Verwendete Kompensationen in der Messung.....	40
Abbildung 4: FSC-SSC Dot Plot: vorgenommenes Gating von PMBCs an einem Bspl. in der Kontrollgruppe.....	41
Abbildung 5: FSC-SSC Dot Plot: weiteres Gating von PMBCs an einem Bspl. in der Kontrollgruppe.....	41
Abbildung 6: Dot Plot: APC (CD14) – APC/H7 (CD16) vorgenommenes Gating von PMBCs an einem Beispiel in der Kontrollgruppe	42
Abbildung 7: Vergleich des LDG-Anteils von Kontroll- und Vaskulitisgruppe.....	51
Abbildung 8: Vergleich des LDG-Anteils von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe.....	52
Abbildung 9: Vergleich des Anteils von CD66b-positiven LDGs zwischen Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe	53
Abbildung 10: Vergleich des Anteils von CD66b-positiven LDGs zwischen inaktiven und aktiven Vaskulitiden.....	54
Abbildung 11: Vergleich des Anteils von CD66b-positiven LDGs zwischen Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe	55
Abbildung 12: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) LDGs und PMNs an ihrer Gesamtpopulation in der Kontrollgruppe.....	57
Abbildung 13: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) auf PMNs und LDGs der Kontrollgruppe	58
Abbildung 14: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) LDGs und PMNs an ihrer Gesamtpopulation in der Vaskulitis-Gruppe	59
Abbildung 15: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) auf PMNs und LDGs der Vaskulitis-Gruppe	60
Abbildung 16: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) LDGs und PMNs an ihrer Gesamtpopulation in der SIRS/Sepsis-Gruppe	61
Abbildung 17: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) auf PMNs und LDGs der SIRS/Sepsis-Gruppe	62
Abbildung 18: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) PMNs an ihrer Gesamtpopulation von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe	64
Abbildung 19: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) von PMNs von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe.....	65
Abbildung 20: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) PMNs an ihrer Gesamtpopulation bei inaktiven und aktiven Vaskulitiden	66
Abbildung 21: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) von PMNs bei inaktiven und aktiven Vaskulitiden.....	67
Abbildung 22: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) PMNs an ihrer Gesamtpopulation von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe	68
Abbildung 23: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) von PMNs von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe.....	69
Abbildung 24: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) LDGs an ihrer Gesamtpopulation von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe	71
Abbildung 25: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) von LDGs von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe	72
Abbildung 26: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) LDGs an ihrer Gesamtpopulation bei inaktiven und aktiven Vaskulitiden	73
Abbildung 27: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) von LDGs bei inaktiven und aktiven Vaskulitiden	74
Abbildung 28: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) LDGs an ihrer Gesamtpopulation von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe	75
Abbildung 29: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) von LDGs von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe	76
Abbildung 30: Schematischer Vergleich des Oberflächenprofils von PMNs und LDGs in Kontroll- und Vaskulitisgruppe.....	77
Abbildung 31: Schematischer Vergleich des Oberflächenprofils von PMNs und LDGs in Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe.....	77
Abbildung 32: LDG-Anteil an PBMCs nach vorangegangener Stimulationsmethode Gruppenvergleich Kontrolle 4°C vs. 37°C, TNF α , α PR3, α MPO	88

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
®	Registered Trade Mark
AAV	ANCA (anti-neutrophile cytoplasmatische Antikörper)-assoziierte Vaskulitiden
ACCP/SCCM	American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine
ANCA	Anti-neutrophile cytoplasmatische Antikörper
APACHE II	Scoringsystem zur Evaluation von Intensivpatienten (engl. Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II)
APC	Allophycocyanin
BVAS	Birmingham Vasculitis Aktivitätsscore (engl. Birmingham Vasculitis Activity Score)
C5a	Komplementkomponente C5a
cANCA	IgG-Antikörper gegen Proteinase 3
CD	Cluster of Differentiation
CHCC	Chapel Hill Consensus Conference
CRP	C-reaktives Protein
Cy7	Cyanin 7
EA	Ethikantrag
ECRC	Experimental and Clinical Research Center Berlin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGPA	eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis
EK	Ethikkommission
FACS	Durchflusszytometrie
FC	FC-Fragment eines Antikörpers
FITC	Fluorescein
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter)
G	Gauge
G-MDSCs	von myeloiden Zellen abgeleitete granulozytische Suppressorzellen (engl. granulocytic myeloid-derived suppressor cells)
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HBSS++	Hanks' balanced salt solution (mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺)
HLA	humanes Leukozyten-Antigen (engl. human leukocyte antigen)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
K	Kelvin
LDG	Granulozyten geringer Dichte (engl. low-density granulocytes)
LDN	neutrophile Granulozyten geringer Dichte (engl. low-density neutrophils)
mAb	monoklonaler Antikörper (engl. monoclonal antibody)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Mo-MDSCs	monozytisch-myeloide Suppressorzellen (engl. monocytic myeloid-derived suppressor cells)
MPA	mikroskopische Polyangiitis
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NaCl	Natriumchlorid

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NB1	mit GPI-verankertes N-glycosyliertes Zelloberflächenglycoprotein
NDG	Granulozyten normaler Dichte (engl. normal-density granulocytes)
NETs	neutrophile extrazelluläre Fasernetzwerke (engl. neutrophil extracellular traps)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pANCA	IgG-Antikörper gegen Myeloperoxidase
PBMC	mononukleäre peripheren Blutzellen (engl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
pCO2	Kohlendioxidpartialdruck
PE	Phycoerythrin
PMN	Polymorphkernige Granulozyten, neutrophile Granulozyten
PR3	Proteinase 3
r	Korrelationskoeffizienten nach Pearson
ROS	reaktive Sauerstoffradikale
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
SAPS II	Scoringsystem zur Evaluation von Intensivpatienten (engl. simplified Acute Physiology Score II)
SIRS	Syndrom der systemischen inflammatorischen Immunantwort (engl. systemic inflammatory response syndrom)
SLE	Systematischer Lupus erythematodes
SOFA	Bewertung des Organversagens bei Sepsis (engl. Sepsis-related Organ Failure Assessment)
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter)
TISS-28	Scoringsystem zur Evaluation von Intensivpatienten anhand therapeutischer Maßnahmen (engl. Therapeutic Intervention Scoring System)
TM	Trade Mark
TNF α	Tumornekrosefaktor α
WG	Wegenersche Granulomatose
ZNS	zentrales Nervensystem
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten (PMNs) bilden eine essentielle Komponente des angeborenen Immunsystems, sie wirken hauptsächlich proinflammatorisch. Granulozyten kommen nicht homogen in Funktionen und Eigenschaften vor, wodurch der Begriff „neutrophile Heterogenität“ geprägt wurde. Eine Subpopulation stellen Granulozyten geringer Dichte, sog. „Low-density-Granulocytes“ (LDGs), dar. Eine erhöhte Anzahl an LDGs konnten u.a. in Autoimmunerkrankungen und Sepsis nachgewiesen werden, ihnen wurden sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Im systemischen Lupus erythematodes (SLE) korreliert der LDG-Anteil mit der Krankheitsaktivität und der Prävalenz von Vaskulitiden. Auch bei Sepsis konnten Zusammenhänge zwischen LDGs und Krankheitsschwere gezeigt werden. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Zusammenhänge zwischen LDGs und systemischen Vaskulitiden sowie zwischen LDGs und systemischen Inflammationen näher zu beleuchten. Die genaue Charakterisierung und Quantifizierung von LDGs soll dabei auch Hinweise auf den bisher unklaren Ursprung von LDGs liefern.

Es wurden Vollblutproben von Testpersonen mit systemischen Vaskulitiden und systemischer Inflammation gewonnen und mit denen einer gesunden Kontrollkohorte verglichen. Hierfür erfolgte die Trennung von PMNs und PBMCs, welche LDGs enthalten, mittels Dichtegradientenzentrifugation. Beide Ansätze wurden danach mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD14, CD16, CD86, CD66b, CD177 und HLA-DR gefärbt. Abschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Rezeptorexpression und die statistische Auswertung der Daten.

Es konnte demonstriert werden, dass LDGs in systemischen Vaskulitiden und Inflammationen vermehrt vorkommen. Gegenüber PMNs kommt es auf LDGs generell zu einer gesteigerten Expression von CD14, CD16 und HLA-DR. Das Vorliegen von systemischen Vaskulitiden und Inflammationen resultiert in einer verminderten Expression von CD16, zudem ist das Vorkommen CD14-positiver LDGs in systemischen Vaskulitiden erhöht.

In systemischen Inflammationen liegt eine negative Korrelation zwischen LDG-Anteil und CRP, Krankheitsaktivität sowie Mortalität vor. In vitro Stimulationen von Vollblut gesunder Probanden führten zu einer Erhöhung des LDG-Anteils.

Ein erhöhter LDG-Anteil ist ein Merkmal systemischer Vaskulitiden und Inflammationen und daher Hinweis auf erhöhte Immunaktivität. Hohe LDG-Anteile stellen sich in systemischen Inflammationen als günstiger Marker für Krankheitschwere und Mortalität dar, damit könnte der LDG-Anteil einen Wert als Prognosemarker haben. Die erhöhte Expression von CD14, CD16 und HLA-DR scheint ein inhärentes Merkmal von LDGs gegenüber PMNs zu sein, sie tritt in allen Testgruppen unabhängig auf. Dahingehend weisen LDGs Ähnlichkeit zu Monozyten auf. In systemischen Inflammationen und Vaskulitiden zeigt sich eine geringere Expression von CD16 auf LDGs, dies kann als Hinweis auf eine immunsuppressive Funktion gesehen werden. Durch in vitro-Stimulation von Vollblut lässt sich ein erhöhter LDG-Anteil provozieren. Dies spricht dafür, dass es sich bei LDGs nicht um Vorläuferzellen, sondern um ausgereifte, eventuell degranulierte Granulozyten handelt.

Abstract

Neutrophil granulocytes (PMNs) are an essential in innate immunity, they act primarily proinflammatory. Granulocytes are not homogeneous in functions and characteristics, therefore the term "neutrophilic heterogeneity" has been created.

There is a distinct subpopulation of low-density granulocytes (LDGs). LDGs were isolated in autoimmune diseases and sepsis, they have been attributed both pro- and anti-inflammatory characteristics. In systemic lupus erythematosus (SLE), the proportion of LDG correlates with disease activity and the prevalence of vasculitis. In sepsis associations between LDGs and disease severity were found. The aim of this work is to analyse the relationships between LDGs and systemic vasculitis as well as between LDGs and systemic inflammations. The exact characterization and quantification of LDGs should also provide information on the unclear origin of LDGs.

Whole blood samples of test persons with systemic vasculitis and systemic inflammation were taken and compared with those from healthy controls. Density gradient centrifugation has been used to separate PMNs from PBMCs, which contain LDGs. Both were stained with fluorescently labelled antibodies against surface antigens of CD14, CD16, CD86, CD66b, CD177 and HLA-DR. Then the receptor expression was measured by flow cytometry. The resulting data were statistically analysed.

We found increased LDG levels in patients with systemic vasculitis and inflammation. Compared to PMNs, LDGs generally show increased expressions of CD14, CD16 and HLA-DR. The presence of systemic vasculitis and inflammation results in decreased expressions of CD16. The incidence of CD14-positive LDGs in systemic vasculitis is increased.

In systemic inflammations, a negative correlation between LDG level and CRP, disease activity, and mortality was found. In vitro stimulation of whole blood from healthy individuals caused increased LDG levels.

Increased LDG levels are a characteristic of systemic vasculitis and inflammation, so it could indicate increased immune activity. High LDG levels in systemic inflammations represent a more favourable prognosis regarding disease severity and mortality, therefore the LDG level could be a potential prognostic marker. The increased expression of CD14, CD16 and HLA-DR appears to be an inherent feature of LDGs over PMNs,

occurring independently in all test groups. In this regard, LDGs have similarities to monocytes. In systemic inflammations and vasculitis, lower expression of CD16 were shown on LDGs, which may be considered an indication of immunosuppressive functions. In vitro stimulation of whole blood can provoke higher LDG levels. This indicates that LDGs are not progenitor cells but mature, possibly degranulated granulocytes.

1. Einleitung

1.1 Die Rolle von Granulozyten im Immunsystem

Erste Beschreibungen des Begriffs „Granulozyt“ sind zurückzuführen auf Gottlieb Gluge (1812-1898), der mit Granula gefüllte „Granulatzellen“ im entzündlichen Exsudat beschrieb, sowie auf Julius Vogel (1814-1880), Professor für Pathologie in Göttingen, der inflammatorisch veränderte Organe mikroskopierte und darin Zellen, die Granula enthielten, beschrieb. Der Brite Thomas Wharton Jones (1808-1891) etablierte 1846 den Begriff „granulare Blutzellen“, die er in verschiedenen Spezies darstellen konnte. Die von Paul Ehrlich (1854-1915) 1879 etablierte Technik der Färbung von Trockenpräparaten schaffte die Grundlage für die Unterteilung der Granulozyten nach ihrer Färbbarkeit in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten (1).

Wegen ihrer länglichen Kernstrukturen werden sie auch als polymorphkernige Leukozyten (PML) oder englisch „polymorphonuclear leukocytes“ (PMNs) bezeichnet.

Granulozyten gehören wie Mastzellen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, Monozyten und Makrophagen zu den Zellen des angeborenen Immunsystems und sind in der akuten Entzündungsreaktion von essentieller Bedeutung. Mastzellen und dendritische Zellen, die in Haut und Schleimhäuten ortständig vorhanden sind, geraten als erste in Kontakt mit eindringenden Krankheitserregern oder anderen Reizen und geben Zytokine ab. Auch Bindegewebszellen wie z.B. Fibroblasten sezernieren bei Kontakt mit Erregern Entzündungsmediatoren, hierbei ist IL-8 von besonderer Wichtigkeit. Hohe IL-8-Spiegel sorgen für die chemotaktische Rekrutierung von Leukozyten insbesondere neutrophilen Granulozyten und deren Einwanderung in das betroffene Inflammationsgewebe (2, 3).

Neutrophile Granulozyten stellen ca. 60% aller Leukozyten dar. In physiologischem Zustand befinden sich wenige Granulozyten im Gewebe, nach der Initiierung einer Entzündungsreaktion wandert jedoch eine Vielzahl von Granulozyten in das betroffene Gewebe ein (2, 4-6). Das Knochenmark eines erwachsenen Menschen produziert täglich ca. 1×10^{11} Neutrophile, je nach Bedarf variiert die Bildung allerdings deutlich und kann sich auf bis zu 2×10^{11} Neutrophile pro Tag verdoppeln (6, 7). Neutrophile Granulozyten sind vergleichsweise kurzlebige Zellen, im Blut beträgt ihre Überlebensdauer Stunden bis wenige Tage. Cheratakis et al. konnten 2006 eine Halbwertszeit von im Blut zirkulierenden Neutrophilen von acht Stunden und eine Halbwertszeit von in Leber- und Milzgewebe eingewanderten Zellen von zwei bis sechs Tagen in Mäusen zeigen (8).

Pillay et al. zeigten in einer in vivo Studie eine durchschnittliche Lebensspanne von 5,4 Tagen für humane neutrophile Granulozyten (9). Eosinophile Granulozyten, die eine besondere Relevanz in der Immunabwehr von Parasiten haben, stellen ca. 2,7% aller Leukozyten und somit einen wesentlich geringeren Anteil als die Neutrophilen dar. Der Anteil der basophilen Granulozyten ist mit ca. 0,5% an der Gesamtpopulation der Leukozyten nochmals geringer. Daher wird der Begriff „Granulozyten“ häufig mit „neutrophilen Granulozyten“ gleichgesetzt, da diese den Hauptanteil der Granulozyten bilden (2, 5, 10).

1.2 Wirkmechanismen von Granulozyten

Neutrophile Granulozyten können pathogene Mikroorganismen mittels verschiedener Mechanismen sowohl intra- als auch extrazellulär unschädlich machen. Zum einen können detektierte Pathogene phagozytiert und anschließend mit Hilfe von ROS (reaktive Sauerstoffspezies) NADPH-Oxidase-abhängig eliminiert werden. Zum anderen können antibakterielle Proteine (z.B. Cathepsin, Laktoferrin, Defensine und Lysozyme) aus den Granula der Neutrophilen in das Phagosom oder nach extrazellulär sezerniert werden, um dadurch pathogene Mikroorganismen unschädlich zu machen (7, 11, 12). Darüber hinaus besitzen hochgradig aktivierte Neutrophile die Fähigkeit zur Bildung von „neutrophil extracellular traps“ (NETs). Hierbei sezernieren PMNs nukleäres Chromatin, das Fasern bildet und mit Histonen, Granulaproteinen und Enzymen in Verbindung steht, in den extrazellulären Raum, um dort eindringende Erreger zu stoppen und zu eliminieren. Dieser Vorgang wird als „NETose“ bezeichnet (12-14). Neben diesen klassisch proinflammatorischen Eigenschaften konnte Serhan 2014 zeigen, dass Neutrophile, sobald sie die Freisetzung von Eicosanoiden beenden und mit der Freisetzung von Lipoxinen beginnen, an der Einleitung der Beendigung der akuten Entzündungsreaktion beteiligt sind (15, 16). Darüber hinaus konnte im Zebrafisch gezeigt werden, dass Neutrophile zur reversen Transmigration fähig sind, d.h. sie sind in der Lage, nachdem sie aus der Blutbahn ins Gewebe migriert sind, dieses wieder zu verlassen und erneut in den Blutkreislauf einzutreten (12, 17).

1.3 Neutrophile Heterogenität

Aufgrund der Tatsache, dass sich Eigenschaften und Funktionen von Neutrophilen nicht homogen und unveränderbar darstellen, wurde der Begriff „Neutrophile Heterogenität“

geprägt (14, 16). In Tumorerkrankungen, bei MRSA-Infektionen und bei Sepsis konnten zelluläre Subgruppen mit der Morphologie von Granulozyten identifiziert werden, deren Funktionen sich stark unterscheiden. Es wurden sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Granulozyten-ähnliche Subgruppen beschrieben (14, 18-20). Denny et al. konnten bei Patient*innen mit systemischem Lupus Erythematoses (SLE) eine proinflammatorische Subgruppe beschreiben, die verglichen mit der Mehrheit der Neutrophilen eine geringere Dichte aufwies und morphologisch an unreife Granulozyten erinnerte (21). Auch andere Untersuchungen zeigten Subpopulationen, die eine für Granulozyten untypische Dichte aufwiesen. Diese konnten nach Dichtegradientenzentrifugation von Vollblut unter den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, engl.: peripheral blood mononuclear cells) detektiert werden.

1.4 Der Terminus „low-density granulocytes“

Scapini und Casatella wählten für alle Zellen, die sich nach Zentrifugation in der PBMC-Fraktion zeigten, eine Neutrophilen-ähnliche Morphologie aufwiesen und zudem CD66b-positiv waren, den Überbegriff „low-density neutrophils“ (LDN) (16). In anderen Publikationen wurde derartige Subpopulationen ihrer immunsuppressiven Funktion nach als „granulocytic myeloid-derived suppressor cells“ (G-MDSCs, engl. von myeloiden Zellen abgeleitete granulozytische Suppressorzellen) bezeichnet. Proinflammatorische Subpopulationen mit morphologischer Ähnlichkeit zu Granulozyten, die in den PBMCs von Personen mit den Autoimmunerkrankungen SLE und Psoriasis entdeckt wurden, wurden als „low-density granulocytes“ (LDGs) definiert (14, 16, 22-24). Die Terminologie zur Beschreibung von Neutrophilen-ähnlichen Zellen geringer Dichte ist somit nicht einheitlich. Da sich diese Dissertationsarbeit insbesondere mit ANCA-assoziierten Vaskulitiden beschäftigt, wird der bei Autoimmunerkrankungen geprägte Terminus „low-density granulocytes“ (LDGs) in dieser Ausarbeitung als Überbegriff für alle in der PBMC-Fraktion vorhandenen Zellen, die eine Neutrophilen-ähnliche Morphologie aufweisen, verwendet.

1.5 Herkunft und Charakterisierung von LDGs

LDGs unterscheiden sich abhängig von der Art der Erkrankung, in der sie vorkommen, bezüglich ihres Phänotyps, ihres Reifegrades und ihrer Funktion (16). Dies wirft die Frage

nach der Entstehung bzw. Herkunft der LDGs auf. Carmona-Rivera und Kaplan verglichen mittels Transmission-Elektronenmikroskopie die Kernmorphologie von LDGs mit der von Granulozyten mit normaler Dichte (NDG, normal-density granulocytes) bei Patient*innen mit systemischen Lupus erythematoses (SLE). Dabei stellten sie fest, dass die Nuclei der LDGs weniger stark segmentiert waren, dass eine gute Abgrenzbarkeit von Eu- und Heterochromatin zu erkennen war und dass verschiedenste Granula im Zytoplasma vorhanden waren. Diese Eigenschaften legen die Vermutung nahe, dass es sich bei LDGs um unreife Granulozyten handeln könnte. Auch Genanalysen von SLE-LDGs zeigten, dass insbesondere Gene vermehrt abgelesen wurden, die für proinflammatorische Proteine und Enzyme wie Serinproteasen kodieren. Da die mRNA Expression von Serinproteasen in reifen Granulozyten herabreguliert werden, werten Carmona-Rivera die vermehrte Expression als Hinweis auf die Unreife von LDGs (14). Andere Ergebnisse stützen die These, dass es sich bei LDGs um aktivierte Neutrophile handelt. In einer SLE-Kohorte konnten LDGs gezeigt werden, die sich in Form und Funktion wie gewöhnliche Neutrophile darstellten, deren Phagozytosefähigkeit jedoch signifikant eingeschränkt war, was als Hinweis auf bereits aktivierte Neutrophile gewertet werden kann. Das Expressionsprofil der Oberflächenrezeptoren dieser LDGs deutet zudem auf einen hohen Aktivierungsgrad hin (14, 21). Es sind insbesondere die auf LDGs nachgewiesenen Oberflächenmarker, welche die These von LDGs als aktivierte oder degranulierte Granulozyten stützen. Mittels Durchflusszytometrie (FACS) konnte eine deutliche Expression von CD10 und CD16 auf LDGs gezeigt werden, beide Oberflächenrezeptoren findet man auf ausgereiften Granulozyten. CD33, das auf unreifen Granulozyten zu finden ist, zeigte sich hingegen nur schwach exprimiert. Auch weitere Oberflächenmarker wie CD34 und Flt3, die charakteristisch für Vorläuferzellen von Granulozyten sind, zeigten sich nur gering exprimiert. Auch die Granulozyten-spezifische Marker CD66b und CD11b wurden verstärkt auf LDGs nachgewiesen, dies spricht zusätzlich für die These von LDGs als aktivierte, reife Granulozyten (14, 21, 25). Neben Hinweisen auf die Entstehung der LDGs, kann eine Analyse ihrer Rezeptorexpression auch Hinweise auf die genaue Abgrenzung von LDGs gegenüber Granulozyten mit normaler Dichte, Monozyten und anderer Subpopulationen liefern. Im Allgemeinen wird CD14 als Marker für Monozyten, CD15 als Marker für Granulozyten und CD66b als exklusiver Marker für Granulozyten beschrieben. So zeigen immunsuppressive G-MDSCs, die die Kriterien für LDGs erfüllen und daher als eine Ausprägung von LDGs gesehen werden können, eine Oberflächenexpression, die positiv

für CD11b, CD15, CD33 und negativ für Lin-Rezeptoren ist. Es konnte zudem gezeigt werden, dass G-MDSCs aus von myeloiden Zellen abgeleiteten monozytischen Suppressorzellen (Mo-MDSCs, engl. monocytic myeloid-derived suppressor cells“) hervorgehen können, die ihrerseits über eine CD14-Rezeptor-positive und HLA-DR-Rezeptor-negative Oberfläche definiert sind und nicht zu den LDGs gerechnet werden. HLA-DR dient auch als Marker für Immunsuppression (14, 26-28). Der für die Kostimulation von T-Zellen bedeutsame Rezeptor CD86 wurden von Denny et al. 2010 als Abgrenzungsmarker von Monozyten gegenüber LDGs verwendet (21).

1.6 LDGs in Autoimmunerkrankungen

Einerseits stellen Granulozyten eine essentielle Komponente der angeborenen Immunantwort gegen pathogene Erreger und der damit verbundenen Inflammation dar, andererseits könnten Subpopulationen wie LDGs eine Rolle bei ungezielten Aktivitäten des Immunsystems, wie sie etwa in Autoimmunerkrankungen vorkommen, spielen. Hacbarth und Kajdacsy, die 1986 als erste Granulozyten mit geringer Dichte in der PBMC-Fraktion von SLE-Patienten beschrieben, stellten fest, dass der Anteil der LDGs an der Gesamtpopulation von PBMCs mit der Aktivität der SLE-Erkrankung korreliert (14, 29). Eine 2010 durchgeführte Studie konnte diese Ergebnisse bestätigen. Man konnte zeigen, dass der Anteil der LDGs an den isolierten PBMCs mit der Prävalenz von Hauterscheinungen und Vaskulitis bei Patientinnen und Patienten mit SLE korreliert (14, 21). Dies wirft die Frage auf, ob LDGs auch in anderen Autoimmunerkrankungen wie Vaskulitiden eine Rolle in der Pathogenese spielen könnten.

1.6.1 ANCA-assoziierte Vaskulitiden

1.6.1.1 *Geschichte und aktuelle Nomenklatur*

Unsere Arbeitsgruppe (AG Schreiber und AG Kettritz) beschäftigt sich insbesondere mit ANCA (anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper)-assoziierten Vaskulitiden (AAV), dazu zählen die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, früher: Wegenersche Granulomatose), die eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA, früher: Churg-Strauss-Syndrom), die mikroskopische Polyangiitis (MPA) und die „renal-limitierte“ AAV (30). Ihre gemeinsamen Merkmale sind das Auftreten von nekrotisierenden Entzündungen der kleinen Gefäße und der positive Nachweis von ANCA. Der erste Fallbericht einer generalisierten Vaskulitis erfolgte 1866 durch Kussmaul und Mayer, die

mittels Autopsie das Auftreten einer knötchenartigen Verdickung der Gefäße in einem Patienten beschreiben konnten. Sie beschrieben die „Periarteritis nodosa“, den Vorläufer der heutigen Bezeichnung “Polyarteritis nodosa”, einer Vaskulitis der mittelgroßen Gefäße (31, 32).

Die erste Erwähnung einer Erkrankung, die heute als AAV klassifiziert wird, dem klinischen Bild nach eine GPA, fand 1897 durch den schottischen Arzt McBride statt, der schwerwiegende Entzündungen im Gesichtsbereich beschrieb, eine infektiöse Genese jedoch ausschließen konnte (33, 34). In den 1930er Jahren berichtete Friedrich Wegener in einigen Publikationen über eine granulomatöse Erkrankung, bei der er neben Hauterscheinungen auch entzündliche Gefäßveränderungen beobachtete. Aufgrund der Bedeutung seiner Arbeiten etablierten Godman und Churg 1954 die Bezeichnung Wegenersche Granulomatose (WG) für das von Wegener beschriebene Krankheitsbild. Die aktuelle Nomenklatur sieht die Bezeichnung GPA vor. Die Namensänderung erfolgte nicht zuletzt wegen Wegeners umstrittener Rolle während der nationalsozialistischen Diktatur zwischen 1933 und 1945 (34-36).

Wohlwill berichtete 1923 als Erster vom Bild einer MPA, während Churg und Strauss erst 1951 das nach ihnen benannte Syndrom, welches heute als EGPA bezeichnet wird, beschrieben (34, 37). Die Einteilung und die Kriterien der AAV sind dem zeitlichen Wandel unterworfen. Das American College of Rheumatology formulierte 1990 erstmalig eine primär für die Forschung entwickelte Nomenklatur für Vaskulitiden (38). Die Chapel Hill Consensus Conference (CHCC) führte 1994 eine Einteilung der Vaskulitiden nach der Größe der betroffenen Gefäße ein wie sie bis heute etabliert ist. Zudem wurde die Bestimmung von ANCA als diagnostisches Hilfsmittel empfohlen, wenngleich der Nachweis von ANCA nicht als Kriterium für AAV definiert wurde (34, 39). Die Chapel Hill Consensus Conference 2012 aktualisierte die Nomenklatur und führte die Einteilung nach pathologischen Gesichtspunkten fort. AAV werden darin als nekrotisierende Vaskulitiden der kleinen Gefäße beschrieben, die mit spezifischen ANCA gegen Myeloperoxidase (MPO-ANCA) oder Proteinase 3 (PR3-ANCA) assoziiert sind, aber auch ANCA-negativ sein können (30).

1.6.1.2 Die Rolle von ANCA in der Pathogenese von AAV

Die Bedeutung von ANCA für die Pathogenese von AAV ist Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion, es gibt jedoch überzeugende Hinweise aus in vitro Experimenten und in vivo Tiermodellen, die eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese

der Erkrankung nahelegen. Davies et al. berichteten 1982 erstmalig im Zusammenhang mit segmental nekrotisierenden Glomerulonephritiden über antineutrophile Antikörper (40). Ein Zusammenhang zwischen AAV und ANCA wurde zuerst bei Personen mit GPA berichtet. Mit ihrer bahnbrechenden Arbeit zeigten Van der Woude et al., dass IgG-Antikörper gegen Granulozyten in der aktiven GPA wesentlich häufiger vorkamen als im inaktiven Krankheitszustand und dass besagte Antikörper bessere Marker für die Krankheitsaktivität darstellten als andere Laborparameter (41, 42). Eine dänische Forschungsgruppe konnte jedoch zeigen, dass ANCA auch in Gesunden nicht selten nachweisbar sind. Sie konnten darüber hinaus einen Einfluss des Lebensalters feststellen, indem sie zeigten, dass bei Hundertjährigen im Vergleich zu Gesunden unter 60 Jahren häufiger ANCA-IgG nachweisbar waren (43). Infolge der weiteren Forschungsbemühungen konnten MPO und PR3 als Zielantigene der ANCA ausgemacht werden, diese Antigene befinden sich größtenteils in den Granula von Neutrophilen, aber auch an deren Oberfläche und werden so zirkulierenden Antikörpern zugänglich gemacht (34, 44-47).

Die zentrale Bedeutung von ANCA in der Pathogenese von Vaskulitiden konnte letztlich in vivo an Mäusen dargestellt werden. Xiao et al. konnten zeigen, dass Anti-MPO IgG, die von MPO-immunisierten MPO-Knockout-Mäusen stammten und in B- und T-Zell-defiziente Mäuse übertragen wurden, in hohen Dosen systemische nekrotisierende Vaskulitiden auslösen konnten (48). Ein ähnlicher Versuch mit murinen PR3-ANCA, die in wildtypische Mäuse transferiert wurden, konnte keinen signifikanten Einfluss von übertragenen PR3-ANCA auf die Entwicklung von Inflammationen in Lunge und Niere nachweisen (49). Auch im Menschen wurde der pathogene Effekt der Übertragung von MPO-ANCA berichtet. Es existiert ein Fallbericht über ein Neugeborenes, bei dessen Mutter unter der Geburt erhöhte MPO-ANCA Titer nachweisbar waren. Das Neugeborene zeigte kurz nach der Geburt pulmonale Hämorrhagien und eine Nierenschädigung, die man auf transplazentar übertragene MPO-ANCA zurückführte (50).

In vitro konnte gezeigt werden, dass Neutrophile durch ANCA aktiviert werden können, wenn diese vorher ein Priming durch TNF α erfahren hatten. Aus der Aktivierung resultierte eine verstärkte Induktion von ROS, Degranulation und eine gesteigerte Adhäsionsfähigkeit an Endothelzellen (47, 51, 52). Zudem haben degranulierte, von Endothelzellen internalisierte MPO und PR3 eine eigenständig schädigende Wirkung auf das Gewebe (53).

Bei GPA stellt die auf der Zellmembran exprimierte PR3 (mPR3) das Hauptziel der ANCA dar. Der Grad der Expression auf Neutrophilen ist interindividuell sehr variabel, wohingegen das Verhältnis zwischen mPR3-positiven und mPR3-negativen Neutrophilen in einem Individuum konstant bleibt (54, 55). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Patient*innen mit GPA sowohl einen erhöhten Anteil mPR3-positiver Neutrophiler als auch einen erhöhten Expressionsgrad von mPR3 auf Neutrophilen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe aufwiesen und dass eine erhöhte mPR3-Expression außerdem signifikant mit dem Rezidivrisiko bei GPA korreliert (56). Dabei zeigt sich, dass die Membranexpression von PR3 durch den Rezeptor CD177 (NB1), ein GPI-verankerter Oberflächenrezeptor, als PR3-bindendes Protein vermittelt wird. Von Vietinghoff et al. konnten den Einfluss von CD177 auf die Membranexpression des PR3-Rezeptors zeigen. Sie entfernten CD177 enzymatisch von der Zelloberfläche und konnten so eine Reduktion der PR3-Expression auf der Oberfläche verursachen. Dabei ist der Anteil von Neutrophilen, die CD177 exprimieren, identisch zu den mPR3-exprimierenden und liegt zwischen 0% und 100% (57, 58) (59, 60).

Neuere Erkenntnisse schreiben auch dem Komplementsystem, genauer der Komplementkomponente C5a eine zentrale Bedeutung in der Aktivierung von Neutrophilen zu. So konnte gezeigt werden, dass aus der Bindung von C5a am C5a-Rezeptor des Neutrophilen eine Verstärkung der Aktivierung des Neutrophilen resultiert (61).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MPO- und PR3-ANCA pathophysiologisch relevant werden, indem sie Neutrophile und Monozyten aktivieren, die ihrerseits schädigend auf Endothelzellen wirken und eine inflammatorische Kaskade in Gang setzen (62). Dieser Schädigung folgt eine inflammatorische Funktionsschädigung der kleinen Gefäße, die wiederum in der Insuffizienz des betroffenen Organs enden kann.

1.6.1.3 Die Mögliche Rolle von LDGs in der Pathogenese von AAV

Trotz zahlreicher Publikationen sind die Mechanismen der Entstehung von AAV nicht hinreichend geklärt, was den Fokus auf bisher weniger beachtete mögliche Einflussfaktoren der Pathogenese lenkt. Ein solcher Einflussfaktor könnte das Vorhandensein von LDGs in AAV sein. Eine erste Arbeit zur Rolle von LDGs in AAV wurde 2015 von Grayson et al. publiziert. Darin wurden Patient*innen mit aktiver AAV danach unterschieden, ob sie nach sechsmonatiger Glucocorticoidtherapie eine klinische Remission erreichten (Responder) oder keine Remission erreichten (Non-Responder).

Anschließend wurde im Vollblut und in der PBMC-Fraktion beider Gruppen nach einer Granulozyten-assoziierten Gensignatur gesucht. Diese wurde mit Granulozyten-assoziierten Signaturen, die bereits in AAV in der PBMC-Fraktion und in SLE in LDGs gefunden wurden, verglichen. Es zeigte sich eine deutliche Überschneidung. Die besagte Gensignatur lag sowohl im Vollblut als auch in der PBMC-Fraktion vor, somit konnten die in der PBMC-Fraktion enthaltenen LDGs als wahrscheinlichste Quelle dieser Gensignatur bestimmt werden (63-65). Der Gruppenvergleich in dieser Studie ergab, dass eine hohe Expression dieser Gene mit einer starken Aktivität der Erkrankung assoziiert war und dass Patientinnen und Patienten weniger wahrscheinlich eine Remission erreichten, also wahrscheinlicher Non-Responder waren, wenn eine starke Expression dieser Gensignatur vorlag. In dieses Bild passt auch, dass bei Non-Respondern eine 17-fache Erhöhung der PR3-Expression in der PBMC-Fraktion im Vergleich zu Respondern nachgewiesen wurde (63).

In der AAV zeigen sich LDGs also als Quelle für Gene, die für Proteine kodieren, denen eine kritische Bedeutung in der Pathogenese von AAV zugeschrieben wird. Das quantitative Vorhandensein dieser Gene in AAV ist assoziiert mit der Krankheitsaktivität und dem Therapieerfolg. Diese ersten Erkenntnisse deuten auf einen Einfluss von LDGs auf die Pathogenese von AAV hin. Ob LDGs in AAV vermehrt vorliegen, ob sie sich von LDGs in Gesunden unterscheiden und welche Funktionen ihnen in Bezug auf die Pathogenese von AAV zuzuschreiben sind, ist nach derzeitigem wissenschaftlichen Stand unklar.

1.7 LDGs in systemischen Inflammationen

Neben ihrem potentiellen Einfluss auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen wie AAV oder SLE, wird die Bedeutung von LDGs auch in primär nicht autoimmun-vermittelten systemischen Entzündungsreaktion wie der Sepsis diskutiert.

1.7.1 Kriterien und Bedeutung von SIRS und Sepsis

Die Sepsis wurde 1991 durch die ACCP/SCCM Consensus Conference als ein „systemic inflammatory response syndrom“ (SIRS, engl. Syndrom der systemischen inflammatorischen Immunantwort) aufgrund einer Infektion definiert. Ein SIRS liegt vor, wenn mindestens zwei SIRS-Kriterien erfüllt sind, dazu zählen Veränderungen der Körpertemperatur, der Herz- und Atemfrequenz sowie der Leukozyten im Blutbild (66).

Im Jahr 2016 wurde die Definition der Sepsis durch die „Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)“ bedeutend vereinfacht. Eine Sepsis wird danach als lebensbedrohliche Organdysfunktion durch eine fehlregulierte Immunantwort des Wirts auf eine Infektion definiert (67). Das „Sepsis-related Organ Failure Assessment“ (SOFA, engl. Bewertung des Organversagens bei Sepsis) dient als Werkzeug zur Identifikation eines Organversagens, dabei wird ein Score erhoben, der die Funktionseinschränkung von Lunge, Niere, Leber, Herz-Kreislaufsystem, Gerinnungssystem und ZNS abbildet. Jedes dieser Organsysteme kann mit 0 (keine Einschränkung) bis 4 Punkten (maximale Einschränkung) bewertet werden (68). Eine Organdysfunktion liegt bei einer akuten Erhöhung des SOFA-Scores um mindestens 2 Punkte vor (67).

Eine Metaanalyse von Fleischmann et al. untersuchte die weltweite Inzidenz der Sepsis im letzten Jahrzehnt, man ermittelte eine Inzidenz von 437 pro 100.000 Einwohner für die Sepsis und eine Inzidenz von 270 pro 100.000 Einwohner für die schwere Sepsis. Die Krankenhausletalität von Personen mit Sepsis lag in diesem Zeitraum bei 17%, bei schwerer Sepsis bei 26% (69). Diese Daten unterstreichen den lebensbedrohlichen Charakter systemischer Inflammationsreaktionen und die globale Dimension des Krankheitsbildes der Sepsis.

1.7.2 Pathogenese von systemischen Inflammationen

Trotz intensiver wissenschaftlicher Bemühungen in den letzten Jahrzehnten ist die Pathogenese von SIRS und Sepsis nur begrenzt verstanden.

Als häufigste Auslöser einer Sepsis mit septischem Schock wurden Infektionen der Atemwege, des Abdomens und des Urogenitaltraktes beschrieben (70). Gramnegative und grampositive Bakterien stellen gefolgt von Pilzen die häufigsten Erreger intensivpflichtiger Infektionen dar (71).

Ihre Pathogenität erreichen grampositive Bakterien durch die Produktion von Exotoxinen und Bestandteile ihrer Zellwand, gramnegative Bakterien durch Lipopolysaccharide auf ihrer Membran (72). Die Erreger werden im menschlichen Körper mit verschiedenen Abwehrmechanismen konfrontiert. Auf zellulärer Ebene stellen Erythrozyten die Hauptakteure der Immunabwehr innerhalb des Blutkreislaufes dar. In die Blutbahn eingedrungene Mikroorganismen können an der Oberfläche von Erythrozyten binden und so die Abgabe von an Oxyhämoglobin gebundenem Sauerstoff stimulieren. Der Kontakt mit dem abgegebenen Sauerstoff oxidiert die Mikroorganismen und macht sie so

unschädlich.

Im Gewebe übernehmen Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten die Rolle der zelluläre Abwehr (72). Zytokine dienen dabei als Mediatoren für die Rekrutierung weiterer Leukozyten an den Ort des Entzündungsgeschehens, diese Leukozyten können ihrerseits weitere Zytokine bilden. Da es sich bei einer Sepsis um eine systemische Entzündungsreaktion handelt, wird eine sich selbst verstärkende Kaskade der Zytokinproduktion eingeleitet, der sogenannte Zytokinsturm (73). Konsequenz dieser überschießenden proinflammatorischen Zytokinproduktion ist eine Gewebeschädigung des Wirts. In der Folge werden auch antiinflammatorische Mediatoren wie z.B. IL-10 freigesetzt, um die Immunreaktion zu begrenzen (70). Auch Neutrophile können sowohl proinflammatorische, als antiinflammatorische Zytokine sezernieren (74). Neutrophile Granulozyten übernehmen so eine zentrale Rolle in der Einleitung und Aufrechterhaltung der systemischen Entzündungsreaktion und scheinen an der Beendigung dieser beteiligt zu sein.

1.7.3 Die Rolle von LDGs in der Pathogenese von systemischen Inflammationen

Welche Rolle den Subpopulationen von Neutrophilen in die Pathogenese von systemischen Inflammationen zukommt, ist bisher kaum bekannt. Janols et al. konnten LDGs bei Patient*innen mit Sepsis zeigen. Sie identifizierten eine CD14^{low}-LDG -Population, deren Phänotyp bezüglich Funktion und Oberfläche bedeutende Ähnlichkeiten zu immunsuppressiven G-MDSCs aufwies. Ferner zeigten sie, dass diese LDG-Population in der Sepsis-Gruppe, insbesondere bei grampositiver Sepsis, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe verstärkt vorkam. Die durch grampositive Erreger ausgelöste Sepsis hat die schlechteste Prognose und ist besonders mit dem Vorkommen von LDGs assoziiert, dadurch erscheint die Frage nach der Funktion und der Charakteristik von LDGs in SIRS und Sepsis von besonderer Relevanz zu sein (26).

2. Ziel der Arbeit

Low-density-Granulozyten (LDGs) stellen eine Subgruppe von Neutrophilen in systemischen Autoimmunerkrankungen dar, denen eine potentielle Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen zugeschrieben wird (14). Erste Erkenntnisse deuten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen LDGs und AAV an (63). Auch bei systemischen Inflammationen scheinen LDGs verstärkt vorzukommen (26). In der vorliegenden Arbeit wurde die Quantifizierung und detaillierte Charakterisierung von LDGs bei Patient*innen mit systemischen Vaskulitiden, insbesondere AAV sowie mit SIRS und Sepsis vorgenommen. Dabei sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Unterscheidet sich der Anteil von LDGs im Blut der Patient*innen mit systemischen Vaskulitiden bzw. systemischer Inflammation im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe?
2. Wie sind LDGs hinsichtlich ihrer Oberflächenrezeptoren zu charakterisieren?
3. Wie unterscheiden sich LDGs bezüglich ihrer Oberflächenrezeptoren von PMNs und welchen Einfluss haben systemische Vaskulitiden bzw. systemische Inflammationen auf die Rezeptorexpression?
4. Bestehen Korrelationen zwischen klinischen Parametern und der Expression bestimmter Oberflächenrezeptoren auf LDGs?
5. Kann die Quantifizierung und detaillierte Charakterisierung von LDGs Hinweise auf deren Entstehung geben?

3. Methodik

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräteverzeichnis

Gerätetyp	Herstellerbezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II Flow Cytometer	BD, Franklin Lakes, USA
Zentrifuge 4°C	Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 4°C klein	Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Pipette	Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Sterilwerkbank	LaminAir HB 2448	Heraeus Instruments, Hanau
Elektrische Pipette	Integra Pipetboy	Integra Biosciences, Zizers, CH
Zellzähler	Beckman Coulter Z2 Coulter® Particle Count and Size Analyzer	Beckman-Coulter, Brea, USA
Vortexer	REAX 2000	Heidolph, Schwabach

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verzeichnis der Verbrauchsmaterialien

Materialtyp	Herstellerbezeichnung	Hersteller
Butterfly-Kanüle (21G)	Multifly®	Sarstedt, Nümbrecht
Butterfly-Kanüle (21G)	Vacutainer Butterfly Safety Lok®	BD, Franklin Lakes, USA
Luer Adapter	BD Vacutainer Luer-Adapter	BD, Franklin Lakes, USA
Plastikhalter für Blutentnahmeröhrchen	BD Vacutainer Plastikhalter	BD, Franklin Lakes, USA
BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blutentnahmeset		BD, Franklin Lakes, USA
Verschlussstopfen	Kombi Stopfen LL	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Blutentnahmeröhrchen (Heparin, 10ml)	BD Vacutainer®	BD, Franklin Lakes, USA
Einmalspritze (5ml)	Injekt®Luer Solo	B.Braun, Melsungen
Einmalspritze (20ml)	Injekt®Luer Solo	B.Braun, Melsungen
Einmalspritze (50ml)	Omnifix® 50 ml	B.Braun, Melsungen
Einmal-Injektions-Kanüle (19G)	Sterican®	B.Braun, Melsungen
Desinfektionsmittel	Cutasept F	Bode, Hamburg

Konische Zentrifugenröhrchen 50ml	Röhre 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Konische Zentrifugenröhrchen 15ml	Röhre 15ml	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfgefäße (1,5ml)	Safe-Lock Tubes 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Pasteurpipette, Einweg, steril	Pasteurpipette 3ml, Polyethylen	Kartell Labware, Noviglio, ITA
Pasteurpipette	Pasteurpipette, 230mm, Glas	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipettenspitzen 10µl	Pipettenspitzen 10µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 200µl	Pipettenspitzen 200µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 100-1000µl	Pipettenspitzen Standard UNIVERSAL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Serologische Pipette für elektrische Pipette	Sarstedt Serological Pipette 25ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellfilter	Corning® Cell Strainer 70µm Nylon	Corning, Corning, USA
FACS-Röhrchen	BD Flacon™ 5ml Rundbodenröhrchen	BD, Franklin Lakes, USA

3.1.3 Reagenzien

Tabelle 3: Verzeichnis der Reagenzien

Reagenz	Herstellerbezeichnung	Hersteller
Heparin-Natrium Injektionslösung	Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm, Ulm
Dextran für 4% Dextran-Lösung		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Histopaque®-1077	Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
PBS	PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin
Aqua dest.	aus Milli-Q®-Aufbereitungsanlage	
Natriumchlorid für 3,6% NaCl-Lösung	Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Z-Pak Fluid	Z-PAK™	Beckman-Coulter, Brea, USA
HBSS++	Hanks' Salt Solution	Biochrom GmbH, Berlin
Cellwash	CellWASH	BD, Franklin Lakes, USA
FACS-Clean		BD, Franklin Lakes, USA
FACS-Rinse		BD, Franklin Lakes, USA
FACS-Flow		BD, Franklin Lakes, USA

3.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Verzeichnis der Antikörper

Antikörper	Herstellerbezeichnung	Hersteller
anti-CD14 (APC)	APC anti-human CD14	BioLegend, San Diego, USA
anti-CD16 (APC/Cy7)	APC/Cy7 anti-human CD16	BioLegend, San Diego, USA
anti-CD66b (FITC)	FITC anti-human CD66b	Beckman Coulter, Brea, USA
anti-CD86 (Brilliant Violet)	Brilliant Violet™ anti-human CD86	BioLegend, San Diego, USA
anti-CD177 (PE)	PE anti-human CD177	Beckman Coulter, Brea, USA
anti-HLA-DR (Pacific Blue)	Pacific Blue™ anti-human HLA-DR	BioLegend, San Diego, USA
Human BD Fc Block™	Human BD Fc Block™	BD, Franklin Lakes, USA

3.1.5 Software

Tabelle 5: Softwareverzeichnis

Software	Hersteller
BD FACSDiva™	BD, Franklin Lakes, USA
FlowJo 10.2	FlowJo, Ashland, USA
IMB® SPSS® Statistics Version 24.0.0.1	IBM, Armonk, USA
Microsoft® Excel für Mac Version 15.28	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft® Word für Mac Version 15.27	Microsoft, Redmond, USA
Endnote X8	Thomson Reuters, London, GB

3.2 Auswahl der Patienten

3.2.1 Zeitraum und Setting

Der Einschluss von Patient*innen fand vom 30.03.2015 bis zum 28.09.2015 statt. Insgesamt wurden 94 Patient*innen rekrutiert. Die Probandinnen und Probanden der Kontrollgruppe wurden aus der Klinik für Nephrologie und Intensivmedizin inklusive Transplantationsambulanz des Virchow Klinikums der Charité – Universitätsmedizin Berlin, aus der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie des Virchow Klinikums der Charité – Universitätsmedizin Berlin und aus dem Experimental and Clinical Research Centers Berlin (ECRC) rekrutiert.

Die Patient*innen der Vaskulitis-Gruppe wurden aus der Vaskulitis-Sprechstunde und den Stationen der Klinik für Nephrologie und Intensivmedizin des Virchow Klinikums der Charité – Universitätsmedizin Berlin und der Klinik und Poliklinik für Kardiologie und Nephrologie des Helios-Klinikums Berlin-Buch in die Studie aufgenommen.

In der SIRS/Sepsis-Gruppe handelte es sich um Patient*innen der Intensivstation der Klinik für Nephrologie und Intensivmedizin des Virchow Klinikums der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Die Genehmigung der zuständigen Ethikkommission für die Durchführung der Studie lag vor (EK-Nr.: EA 1/144/10 und EA 1/277/11).

3.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Da die vorliegende Dissertationsarbeit einen Vergleich der Oberflächeneigenschaften von LDGs in verschiedenen Patientenpopulationen beleuchten soll, ist es wichtig präzise Ein- und Ausschlusskriterien für jede Gruppe festzulegen um die Gruppen eindeutig zu definieren und eventuelle Überschneidungen in den Zugehörigkeiten zu vermeiden.

3.2.2.1 Kontrollgruppe

Einschlusskriterien

- Alter > 18 Jahre
- Einverständnis zur Teilnahme an der Studie

Ausschlusskriterien:

- Vaskulitis in der Vorgeschichte
- Vorliegen einer Infektionskrankheit
- schwerwiegende Erkrankungen
- beschädigte oder lysierte Blutprobe
- Zeit zwischen Blutentnahme bis zum Beginn der labortechnischen Aufbereitung > 3 Stunden

3.2.2.2 Vaskulitis-Gruppe

Einschlusskriterien:

- gesicherte Diagnose einer Vaskulitis
(dokumentiert in Patientenmanagement-System SAP CSP IS-H)
- Alter > 18 Jahre
- Einverständnis zur Teilnahme an der Studie

Ausschlusskriterien:

- zeitgleiches Vorliegen einer Infektionserkrankung
- beschädigte oder lysierte Blutprobe
- Zeit zwischen Blutentnahme bis zum Beginn der labortechnischen Aufbereitung > 3 Stunden

3.2.2.3 Sepsis-Gruppe

Einschlusskriterien:

- gesicherte Diagnose eines SIRS oder einer Sepsis (dokumentiert in Patientenmanagement-System COPRA 5)
- Alter > 18 Jahre
- Einverständnis zur Teilnahme an der Studie

Ausschlusskriterien:

- zeitgleiches Vorliegen einer Vaskulitis
- beschädigte oder lysierte Blutprobe
- Zeit zwischen Blutentnahme bis zum Beginn der labortechnischen Aufbereitung > 3 Stunden

3.2.3 Resultierendes Patientenkollektiv

Eine Übersicht des resultierenden Patientenkollektivs ist in Abbildung 1 dargestellt.

3.2.3.1 Kontrollgruppe

In die Kontrollgruppe wurden zunächst 33 Personen eingeschlossen, davon wurden jedoch vier Proben ausgeschlossen. Eine Probe wurde aufgrund des zeitgleichen Vorliegens einer Infektionserkrankung mit erhöhten Entzündungsparametern ausgeschlossen. Eine weitere Probe wurde nicht berücksichtigt, da bei der Person durch eine terminale Niereninsuffizienz eine schwere gesundheitliche Einschränkung vorlag. Somit war die Einordnung dieser Probe in die Kontrollgruppe nicht sinnvoll. Eine dritte Probe wurde ausgeschlossen, da in der Vorgeschichte der Person eine Vaskulitis berichtet wurde und somit keine klare Zuordnung zur Kontrollgruppe möglich war. Eine vierte Probe wurde ausgeschlossen, da die Person zwar alle Voraussetzungen für den Einschluss in die Kontrollgruppe erfüllte, die Blutprobe in der

durchflusszytometrischen Messung aber größtenteils lysierte Zellen zeigte, sodass keine korrekte Betrachtung der Ergebnisse möglich war. Somit reduzierte sich die Anzahl der Proben, die berücksichtigt wurden, auf n=29.

3.2.3.2 Vaskulitis-Gruppe

In die Vaskulitis-Gruppe wurden zunächst 36 Personen eingeschlossen. Drei Proben wurden ausgeschlossen, da bei den entsprechenden Personen keine gesicherte Vaskulitis nachgewiesen wurde.

Eine weitere Probe wurde nicht berücksichtigt, da auch hier in der durchflusszytometrischen Messung sichtbar wurde, dass die meisten untersuchten Zellen lysiert waren, womit eine sinnvolle Analyse dieser Probe nicht mehr möglich war.

Somit resultierte die Anzahl der berücksichtigten Proben in n=32.

3.2.3.3 SIRS/Sepsis-Gruppe

Für die SIRS/Sepsis-Gruppe wurden 25 Personen rekrutiert, davon musste jedoch eine Person ausgeschlossen werden, da die Diagnose SIRS bzw. Sepsis nicht sicher gestellt werden konnte. Daher wurde in dieser Gruppe 24 Proben berücksichtigt und analysiert.

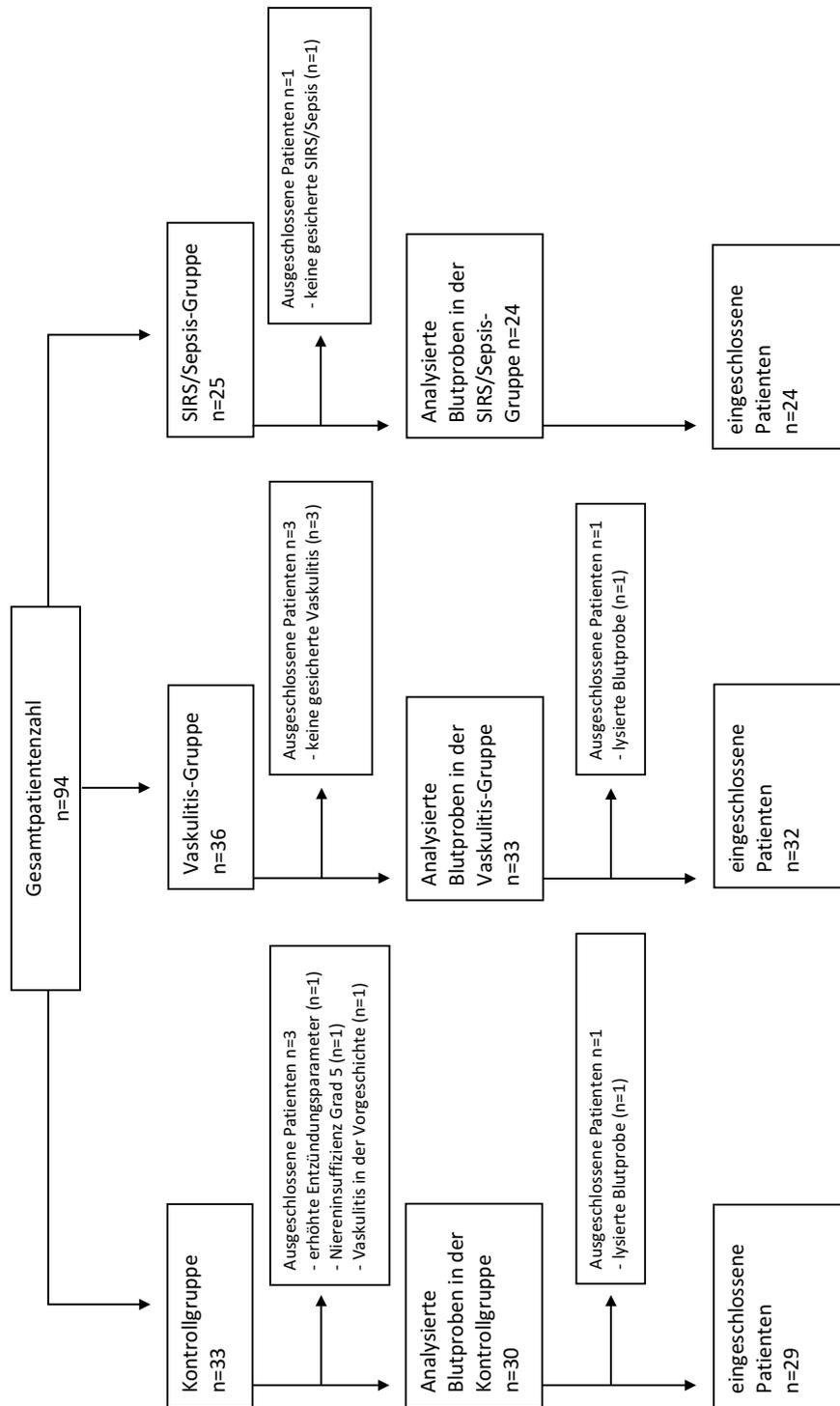


Abbildung 1: Flussdiagramm der eingeschlossenen Patienten in der Kontrollgruppe, der Vaskulitis-Gruppe und der SIRS/Sepsis-Gruppe

3.3 Gewinnung von Blutproben

Zur Gewinnung der Blutproben fand bei den ausgewählten Probanden eine Blutentnahme statt.

3.3.1 Kontrollgruppe

Bei den nicht hospitalisierten Patienten der Kontrollgruppe wurde nach venöser Stauung mittels Stauschlauch und Desinfektion der Einstichstelle am Unterarm für die Punktion eine Butterfly-Kanüle (21G) verwendet, die an eine heparinisierte Einmalspritze (50ml) angeschlossen wurde. Unter leichtem manuellem Aufzug der Einmalspritze (50ml) füllte sich diese mit dem Blut der Testperson und diente somit als Sammelbehältnis. Anschließend wurde die Kanüle entfernt und die Spritze mit einer Verschlusskappe verschlossen.

Die Einstichstelle wurde mit einem Wundpflaster versorgt. Bei hospitalisierten Patienten der Kontrollgruppe wurde das gleiche Vorgehen wie in der Vaskulitis-Gruppe angewendet. Pro Entnahme wurden 9-20ml Blut abgenommen.

3.3.2 Vaskulitis-Gruppe

In der Vaskulitis-Gruppe wurde nach venöser Stauung mittels Stauschlauch und Desinfektion der Einstichstelle am Unterarm für die Blutentnahme das sogenannte Safety-Lok™-System verwendet. Die Punktion erfolgte dabei mit einer Butterfly-Kanüle (21G), die über einen Adapter mit einem Heparin-Blutentnahmeröhrchen (10ml) verbunden wurde. Durch einen vorhandenen negativen Druck in den Entnahmeröhrchen füllten sich diese autark mit dem Blut der Probanden. Nach Beendigung der Blutentnahme wurde jede Einstichstelle mit einem Wundpflaster versorgt. Es wurden 6-18 ml Blut pro Entnahme abgenommen.

3.3.3 SIRS/Sepsis-Gruppe

Im Fall der SIRS/Sepsis-Gruppe wurde ein bei allen Probanden vorhandener peripherer Venenverweilkatheter für die venöse Blutentnahme genutzt. Um Verdünnungseffekte durch ggf. stattfindende Infusionen auszuschließen wurden nach Entfernung der Verschlusskappe und Rotation des Drei-Wege-Hahns zuerst 5ml Blut mittels Einmalspritze über dem Zugang entnommen um diese zu verwerfen.

Danach wurde ein Safety-Lok™-Adapter an den Zugang angeschlossen und darüber ein Heparin-Blutentnahmeröhrchen (5ml) befüllt. Nachdem das Befüllen des Entnahmeröhrchens beendet wurde, wurde der Adapter wieder entfernt und der Zugang mit steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) gespült. Der Drei-Wege-Hahn wurde wieder in Ausgangstellung rotiert, der Zugang desinfiziert und mit einer neuen Verschlusskappe verschlossen. Im Anschluss wurde erneut mit steriler Kochsalzlösung gespült.

Es wurden 4-12 ml Blut pro Entnahme abgenommen.

3.4 Bluttransport, Dokumentation und Aufbereitung der Blutproben

3.4.1 Bluttransport

Die Blutproben wurden in einem durch Kühlelemente gekühlten Styroporbehälter transportiert. Die Zeitdauer zwischen Blutentnahme und dem Beginn der labortechnischen Aufbereitung betrug maximal drei Stunden.

3.4.2 Dokumentation

Mittels Microsoft® Excel für Mac wurde für jede der drei Gruppen eine Liste der Spenderinnen und Spender erstellt. Jeder Blutprobe wurde gruppenübergreifend eine pseudonymisierte Identifikationsnummer zugeteilt. Beginnend mit dem ersten Spender wurden die Nummern fortlaufend vergeben um eine eindeutige und chronologische Zuordnung zu gewährleisten. Außerdem erhielt jede Spenderin bzw. jeder Spender eine eigene Nummer innerhalb ihrer bzw. seiner Gruppe. Wurde das Blut einer Spenderin bzw. eines Spenders zu mehreren Zeitpunkten untersucht, so wurde die gruppeneigene Nummerierung fortlaufend um einen Buchstaben ergänzt. Darüber hinaus wurden das Alter und das Geschlecht jeder Spenderin bzw. jedes Spenders, sowie das Datum der Blutentnahme und ggf. Besonderheiten dokumentiert.

3.4.3 Isolation humaner Blutzellen

Zur Gewinnung von Zellen aus den Blutproben wurde das Vollblut aus den Heparin-Röhrchen mittels Kanüle (19G) in eine Einmalspritze (20ml) überführt. Die Proben der Kontrollgruppe, die sich bereits in Einmalspritzen (50ml) befanden, wurden darin belassen.

Das Patientenvollblut wurde nun im Verhältnis 3:1 mit Dextran 4% gemischt (z.B. 9ml Vollblut mit 3ml Dextran 4%). Beide Anteile wurden durch vorsichtiges, dreimaliges

Schwenken der Einmalspritze vermischt. Anschließend wurden die Spritzen aufrecht hingestellt und zur Erythrozytensedimentation 30 Minuten bei Raumtemperatur in diesem Zustand belassen. Nach Ablauf der Zeit wurde der entstandene Überstand durch leichten Druck auf die Spritze mit Hilfe einer Butterfly-Kanüle (19G) in ein auf Eis befindliches Zentrifugenröhrchen (50ml) überführt. Um eine Dichtegradientenzentrifugation durchführen zu können, wurde der Überstand mit 7ml Histopaque®-1077, einer gebrauchsfertigen Copolymer-Trennlösung auf Polysucrose- und Natrium-Amidotrizoatbasis, unterschichtet. Hierfür wurde eine elektronische Pipettierhilfe mit Messpipette (20ml) verwendet. Die Zentrifugation der Röhrchen (50ml) erfolgte bei 1200 rpm, nach 15 Minuten wurde ohne die Zentrifugation zu unterbrechen auf 1050 rpm reduziert. Von den entstandenen vier Schichten wurde zuerst die dritte Schicht, die sich direkt unterhalb der Trennlösung befindet und als Interphase bezeichnet wird, mittels Pasteur-Pipette in ein weiteres Zentrifugenröhrchen (50ml) überführt, das bereits 20ml PBS enthielt und auf Eis gelagert wurde, um daraus mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) inklusive LDGs zu isolieren. Dieser Ansatz erhielt die Bezeichnung „PBMCs (Interphase)“. Im nächsten Schritt wurden die übrigen Schichten mit Hilfe einer Absaugvorrichtung entfernt und verworfen, allein die vierte Schicht, ein Zellpellet am konischen Ende des Röhrchens, wurde belassen und auf Eis gelagert um daraus polymorphkernige Leukozyten (engl. polymorphonuclear leukocytes, PMNs) zu gewinnen. Zur Erythrozytenlyse wurde das Zentrifugenröhrchen mit 10 ml destilliertem Wasser aufgefüllt und das Zellpellet für 20 Sekunden resuspendiert, danach wurden 3,3 ml einer 3,6%-prozentigen Natrium-Chlorid-Lösung hinzugefügt um die Probe im Röhrchen wieder zu isotonisieren.

Dieser Ansatz erhielt die Bezeichnung „PMNs“. Die Zentrifugenröhrchen beider Ansätze, PBMCs und PMN, wurden nochmals für zehn Minuten mit 1050 rpm zentrifugiert. Bei beiden zentrifugierten Röhrchen wurde an einer sterilen Werkbank mittels Absaugung der Überstand dekantiert und erneut nur ein Zellpellet belassen. Dem Zellpellet wurde in beiden Ansätzen kalte HBSS++ zugegeben, es folgte eine Durchmischung mittels Vortexmischer, die Zelldichte wurde anschließend mit Hilfe eines Zellzählers bestimmt.

3.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Um die Vergleichbarkeit der Versuche sicherzustellen wurde eine Zellzahl von 500.000 Zellen pro 100µl angestrebt, was einer Zelldichte von 5×10^7 Zellen/ml entspricht.

Für die Bestimmung der Zelldichte wurden 20µl eines Ansatzes in ein Probegefäß pipettiert, in dem sich bereits die neutrale Testflüssigkeit ZPak befand. Nach zweimaligem Schwenken wurde das Probegefäß in die Zählkammer überführt und die automatische Messung der Zelldichte begonnen. Der Messbereich lag bei 5-15µm, d.h. alle Zellen und Partikel dieser Größe wurden gezählt. Den Ansätzen wurde wiederholt HBSS++ hinzugegeben bis eine gemessene Zelldichte von circa 5×10^7 Zellen/ml erreicht wurde.

3.4.5 Prinzipien der direkten Immunfluoreszenzfärbung

Die im Folgenden beschriebene Markierung der Zielproteine beruht auf dem Prinzip der direkten Immunfluoreszenzfärbung. Hierfür finden Antikörper Verwendung, an welche direkt ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Diese Antikörper können an spezifische Epitope eines Oberflächenantigens binden und sie somit über den gebundenen Farbstoff markieren. Nur durch diese Fluoreszenzmarkierung wird ein Oberflächenprotein für das FACS detektierbar.

3.4.6 Herstellung der Antikörper-Verdünnung

Um Pipettierfehler aufgrund zu kleiner pipettierter Volumina zu vermeiden, wurde eine Antikörperstammverdünnung aus fünf fluoreszenzmarkierten Antikörpern hergestellt. Hierfür wurden in einem gekühlten 1,5ml-Eppendorf-Gefäß 95µl HBSS++ vorgelegt, um anschließend je 1µl des jeweiligen Antikörpers hinzuzufügen. Alle Antikörperbehälter wurden auf Eis gelagert. Es wurden folgende Antikörper hinzugegeben:

- CD14 (APC)
- CD16 (APC/Cy7)
- CD66b (FITC)
- CD86 (Brilliant Violet)
- HLA-DR (Pacific Blue)

Die Antikörper wurden in der Reihenfolge ihrer Nennung in das HBSS++ pipettiert, sodass sich nach Hinzufügen aller genannten Antikörper ein Gesamtvolumen von 100µl pro Verdünnung ergab. Wegen der Lichtinstabilität der Fluoreszenzantikörper war der Arbeitsraum abgedunkelt, auch das verwendete Eppendorf-Gefäß wurde aus diesem Grund mit Aluminiumfolie ummantelt. Aus jeder Vollblut-Probe ergaben sich nach der Zellisolation zwei mit Antikörpern zu markierende Ansätze, zu markierende PBMCs und zu markierende PMNs (siehe Abb. 2). Da jeder dieser Ansätze mit 20µl der Antikörper-

Verdünnung gefärbt wurde, wurden pro Blutprobe 40µl eben dieser verwendet, somit musste für jede dritte Probe eine neue Antikörper-Verdünnung hergestellt werden. Nicht verwendete Verdünnungen wurden lichtundurchlässig bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.4.7 Anwendung der Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 300µl der isolierten PBMCs in ein gekühltes 1,5ml Eppendorf-Gefäß übertragen. Auch 300µl der PMNs wurden in ein separates Eppendorf-Gefäß überführt. Beiden Ansätzen wurde 3µl Fc Block™, welches zur Reduktion nicht-spezifischer Bindungen von Immunglobulinen an Fc-Rezeptoren dient (75), zugegeben. Danach wurden sie für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Beide Ansätze wurden im weiteren Verlauf auf je zwei neue Eppendorf-Gefäße aufgeteilt, sodass sich insgesamt zwei Ansätze, die PBMCs enthielten, und zwei Ansätze, die PMNs enthielten, ergaben. Jedes dieser vier Eppendorf-Gefäße enthielt 100µl des jeweiligen Ansatzes und somit circa 500.000 Zellen.

Die Aufteilung diente dazu an je 100µl PBMCs und PMNs eine Immunfluoreszenzfärbung vorzunehmen und die anderen 100µl als ungefärbte Negativkontrolle zu verwenden. Für die Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden zunächst der unverdünnte Antikörper CD177 PE und die vorbereitete Antikörper-Verdünnung, die gemäß den Herstellerempfehlungen oder nach vorangegangener Titration vorbereitet wurde, auf Eis bereitgestellt (siehe Herstellung der Antikörper-Verdünnung). Mit Hilfe einer manuellen Mikroliterpipette wurden zuerst 1µl des CD177 PE –Antikörpers und danach 20µl der Antikörper- Verdünnung vorsichtig in die entsprechenden Eppendorf-Gefäße pipettiert. Denjenigen Ansätzen, die als Negativkontrollen dienen sollten, wurden keine Antikörper hinzugegeben. Auch dieser Arbeitsschritt wurde aufgrund der lichtinstabilen Antikörper bei abgedunkeltem Raumlicht durchgeführt. Zur Inkubation wurden die Zellen aller Ansätze für 20 Minuten ohne Lichteinstrahlung auf Eis gelagert, im Anschluss mit 200µl CellWASH gewaschen und resuspendiert. Um die Analyse der Zellen im Durchflusszytometer zu ermöglichen, mussten diese in kompatible FACS-Tubes pipettiert werden. Der Transport der Zellen zum Durchflusszytometer erfolgte auf Eis in einem lichtundurchlässigen Styroporbehälter.

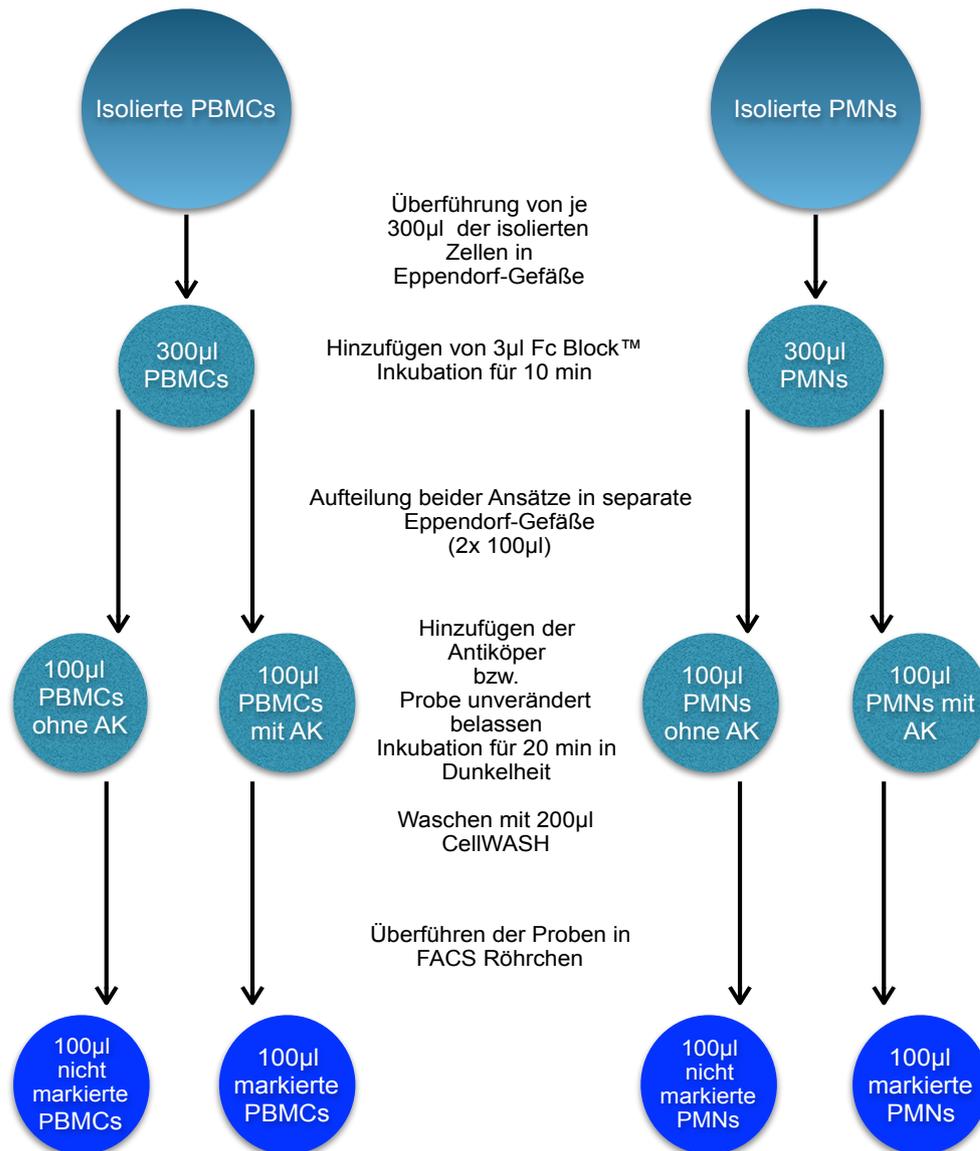


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Ablaufs der Immunfluoreszenzfärbung

3.5 Durchflusszytometrische Messung

Die im Folgenden beschriebenen Zellanalysen wurden mit Hilfe eines FACSCanto II™ - Durchflusszytometers (BD), analog zu dieser Darstellung durchgeführt.

3.5.1 Funktionsweise des FACS

Die Darstellung der Funktionsweise stützt sich auf die Produkthinweise der Firma BD Biosciences für das BD FACSCanto II Flow Cytometer. Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, bei dem Zellen bezüglich ihrer Größe, Granularität und Zellkerne in kurzer Zeit einzeln analysiert werden können. Aufgrund dieser Charakteristika lassen sich die einzeln gemessenen Zellen einer Zellreihe zuordnen.

FACS (engl. **f**luorescence-**a**ctivated **c**ell **s**orting, fluoreszenzaktivierte Zellsortierung) stellt eine häufig verwendete Form der Durchflusszytometrie dar, dabei werden neben optischen Charakteristika auch Fluoreszenzeigenschaften ermittelt. Nach vorangegangener Fluoreszenzfärbung der Zellen wird die Ausprägung ausgewählter Oberflächenantigene anhand der Fluoreszenzintensität daran gebundener spezifischer Farbstoffe gemessen.

Das FACS-Gerät ist eine Funktionseinheit aus folgenden Bestandteilen: einem Flüssigkeitssystem zum Transport der Proben, Lasern, einem optischen System mit Detektoren und einem Computer zur elektronischen Datenverarbeitung.

Um die vollautomatische Messung zu beginnen, muss das Proberöhrchen sachgemäß im FACS-Gerät platziert werden. Eine Hüllflüssigkeit wird mit positivem Druck durch einen Messkanal gepumpt, hierdurch entsteht der sogenannte Hüllstrom. Die Probeflüssigkeit wird aus dem FACS-Röhrchen mit höherem Druck in diesen Hüllstrom eingespritzt und dabei mit Hüllflüssigkeit umspült, dies geschieht in der sogenannten Durchflusszelle. Aufgrund des höheren Injektionsdrucks der Probeflüssigkeit bewegt sich diese schneller als die Hüllflüssigkeit, daher findet keine Vermischung der Flüssigkeiten statt, sondern eine Zentrierung der Zellen in der Probeflüssigkeit. Hierdurch bewegen sich die Zellen einzeln und mittig durch den Messkanal (hydrodynamische Fokussierung). Diese Fokussierung ist notwendig, damit sich Zellen am sog. „interrogation point“ einzeln durch die Laserstrahlen bewegen und damit angeregt werden können.

Die verwendete Anregungsoptik besteht aus drei Lasern: einem blauen (488nm) und einem violetten (405nm) Festkörperlaser, sowie aus einem roten Helium-Neon-Laser (633 nm). Über Glasfaserleitungen werden die Laserstrahlen zu bündelnden Prismen und danach zu achromatischen Linsen gelenkt, dadurch werden fokussierte Laserstrahlen erzeugt, die räumlich getrennt auf jede sich durch den Messkanal bewegende Zelle treffen. Sobald ein Laserstrahl auf eine Zelle trifft, wird das Licht des Lasers gestreut. Man unterscheidet hierbei Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter, FSC), dessen Intensität sich proportional zur Zellgröße verhält und Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter, SSC), dessen Intensität abhängig von der Granularität der durchleuchteten Zelle ist. Anhand dieser beiden Lichtstreuungen kann man jede Zelle einer bestimmten Population zuordnen.

Auch Fluoreszenzfarbstoffe und somit die damit verbundenen Oberflächenrezeptoren können auf ähnliche Weise erfasst werden. Hierbei regt ein Laser mit spezifischer Wellenlänge einen an die Zelle gebundenen Farbstoff an, dessen Absorptionsspektrum

die Wellenlänge des Lasers beinhaltet. Durch die vom Farbstoff aufgenommene Lichtenergie werden dessen Elektronen auf einen höheren Energiezustand gehoben, fallen aber unter Aussendung von Licht einer spezifischen Wellenlänge wieder in ihren Ausgangszustand zurück (Fluoreszenz). Je mehr Fluoreszenzfarbstoff an einer Zelle gebunden hat, umso höher ist die ausgesendete Lichtintensität. Die Wellenlänge des vom Farbstoff emittierten Lichts entspricht nicht der Wellenlänge des Absorptionsmaximums, sondern ist länger und spezifisch für jeden Farbstoff (Emissionsspektrum). Somit können verschiedene Farbstoffe, die durch den gleichen Laser angeregt wurden, gleichzeitig verwendet werden, da sie ggf. zwar überlappenden Emissionsspektren aufweisen, anhand ihres charakteristischen Emissionspeaks aber eindeutig unterschieden werden können.

Bei den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen handelte es sich um: Allophycocyanin (APC), Allophycocyanin /Cyanin 7 (APC/Cy7), Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Brilliant Violet™, Phycoerythrin (PE) und Pacific Blue™.

Die erzeugten Lichtsignale gelangen, nachdem sie ein System von Sammellinsen, Spiegeln und Filtern passiert haben, über Glasfaserkabel zu Detektoren. Im Falle der FSC handelt es sich dabei um eine Photodiode, im Falle der SSC und der Fluoreszenz um einen Photomultiplier. Die Detektoren entsprechen dem ersten Schritt der elektronischen Verarbeitung, da hier die Lichtsignale in elektrische Impulse umgewandelt werden. Die Impulse werden quantifiziert, verstärkt und in digitale Signale überführt. Diese Signale werden im Messcomputer gespeichert und bilden die Basis für die Analyse der Daten in der Auswertungssoftware (76, 77).

Tabelle 6: Eigenschaften und Wirkweisen der verwendeten Laser modifiziert nach BD FACS CANTO II Brochure Research

Lasertyp	Wellenlänge des Lasers	Fluoreszenzkanal	Fluoreszenzfarbstoff
blauer Festkörperlaser	488nm	grün	FITC
		gelb	PE
Helium-Neon-Laser	633nm	rot	APC
		infrarot	APC/Cy7
violetter Festkörperlaser	405nm	blau	Brilliant Violet™
			Pacific Blue™

3.5.2 Durchführung des FACS-Messung und Datenerhebung

Die Bedienung des Durchflusszytometers FACSCanto II™ erfolgte mit der Herstellersoftware FACSDIVA™, über diese wurden die Voreinstellungen vorgenommen. Da die Fluoreszenzen simultan gemessen wurden und sich die Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe überschneiden, musste eine Kompensation durchgeführt werden. Dabei wird der Teil des Fluoreszenzsignals einer Fluoreszenz, das fälschlicherweise vom Detektor einer zweiten Fluoreszenz erkannt wird, vom Fluoreszenzsignal der zweiten Fluoreszenz subtrahiert. Dies erfolgt digital, nachdem das unveränderte Messsignal den Computer erreicht. Eine solche Anpassung musste bei allen verwendeten fluoreszenzgekoppelten Antikörpern durchgeführt werden und blieb für alle Messungen unverändert

Es wurden jeweils 10.000 Zellen von jedem der vier Ansätze einer Probe gemessen.

	FITC-A	PE-A	PerCP-A	PE-Cy7-A	APC-A	APC-H7-A	Pacific Blue-A	AmCyan-A
FITC-A	100	18,074	3,885	1,014	0,48	0	0,62	9,452
PE-A	2,177	100	22,862	3,824	0,302	0,101	0,195	0,39
PerCP-A	0	0	100	0	0	0	0	0
PE-Cy7-A	0	0	0	100	0	0	0	0
APC-A	0	0	0	0	100	3,241	0,194	0
APC-H7-A	0	0	0	5,987	17,198	100	0	0
Pacific Blue-A	0	0	0	0	0	0	100	28,676
AmCyan-A	0	0	0	0	0	0	28,774	100

Abbildung 3: Verwendete Kompensationen in der Messung

Anschließend wurden die gesammelten Daten in die Auswertungssoftware FlowJo (Version 10.2.0) übertragen um das sogenannte Gating durchzuführen. Da jede Zelle ein spezifisches Verhalten bezüglich Seitwärts- und Vorwärtsstreulicht (SSC, FSC) aufweist, wurden alle gemessenen Zellen (Ereignisse) eines Ansatzes anhand dieser Eigenschaften in einem SSC-FSC-Dot Plot dargestellt. Zellen deren Seitwärtsstreulicht <40-50 K entsprach, wurden als Debris klassifiziert und nicht weiter berücksichtigt, somit reduzierte sich die absolute Zellzahl, die für die Analyse herangezogen wurde. Zellen mit ähnlichen Eigenschaften bezüglich Seitwärts - und Vorwärtsstreulicht lagen somit im Dot Plot nah beieinander und konnten bestimmten Zelltypen zugeordnet werden. Die Fläche, in der sich die Zellen eines bestimmten Zelltyps befanden, wurde als Gate für ebendiese Zelltypen definiert (siehe Abbildung 4). Hierbei wurde zwischen Lymphozyten (Lymphocytes), Monozyten (Monocytes) und Granulozyten (Granulocytes) im PMNs-

Ansatz bzw. LDG (low density granulocytes) im PMBCs-Ansatz (Interphase) unterschieden (siehe Abb. 5 (rechts)).

In der weiteren Betrachtung wurden ausschließlich die als Granulozyten im PMNs-Ansatz

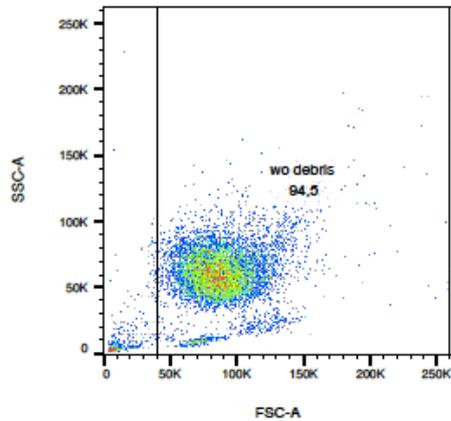


Abbildung 4 (links): FSC-SSC Dot Plot: vorgenommenes Gating von PMBCs an einem Bspl. in der Kontrollgruppe bei 40K um Debris auszuschließen. Im Verlauf wird nur das eingeschlossene Gate „wo debris“ (without debris, ohne Debris) berücksichtigt.

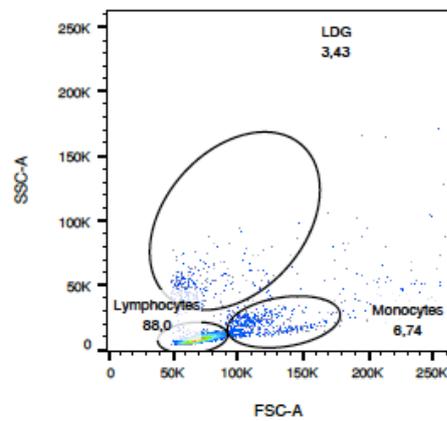


Abbildung 5 (rechts): FSC-SSC Dot Plot: weiteres Gating von PMBCs an einem Bspl. in der Kontrollgruppe

bzw. die als LDGs klassifizierten Zellen im PMBCs-Ansatz (Interphase) genauer betrachtet. Da es verschiedene Möglichkeiten gibt Granulozyten im FACS-Dot Plot zu definieren, wurden die Granulozyten beider Ansätze zunächst allein über ihr charakteristisches Streuverhalten definiert und so der Granulozyten-Anteil eines Ansatzes bestimmt. Für die eigentlichen Berechnungen des Granulozyten-Anteils beider Ansätze und die genaue Analyse der Rezeptorexpression wurden Granulozyten als diejenigen Zellen definiert, die das charakteristische Streuverhalten von Granulozyten aufwiesen und zudem CD66b-positiv gewertet wurden. Da es sich bei CD66b um einen Granulozyten-spezifische Marker handelt (28), konnte sehr selektiv eine Analyse der Granulozyten (inkl. LDGs) durchgeführt werden.

Die nächsten Gates wurden so gewählt, dass alle CD66b-positiven Zellen auf das Vorhandensein der Marker für CD14, CD16, CD86, CD177 und HLA-DR geprüft wurden. Da jeder Fluoreszenzfarbstoff an einen Antikörper gegen einen bestimmten Oberflächenrezeptor gebunden ist, lässt sich über die Fluoreszenzintensität eine quantitative Aussage über das Vorhandensein eben dieses Oberflächenrezeptors ableiten. Somit bedeutet eine hohe Fluoreszenzintensität eines bestimmten Farbstoffs auch ein hohes Vorhandensein eines bestimmten Oberflächenrezeptors.

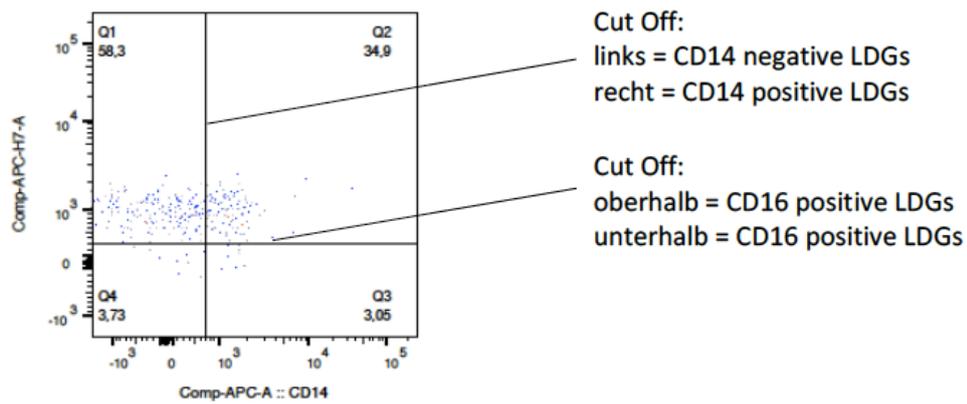


Abbildung 6: Dot Plot: APC (CD14) – APC/H7 (CD16) Gating
 vorgenommenes Gating von PMBCs an einem Beispiel in der Kontrollgruppe
 Q1= CD14 negative, CD16 positive LDGs; Q2= CD14 positive, CD16 positive LDGs
 Q3= CD14 positive, CD16 negative LDGs; Q4= CD14 negative, CD16 negative LDGs

Hierfür wurde in Dot Plots die Fluoreszenzintensität der gemessenen Granulozyten bezüglich eines bestimmten Farbstoffs dargestellt. Die Stärke der Fluoreszenzintensität von CD14, CD16, CD86 und HLA-DR wurde für jeden Granulozyten bestimmt und für jeden Ansatz jeder Probe in eine resultierende mittlere Fluoreszenzstärke (MFI) zusammengefasst. Außerdem wurden für die Fluoreszenzintensitäten der verwendeten Farbstoffe, und damit die Menge der vorhandenen Antikörper und Oberflächenrezeptoren, Cut-Off-Werte bestimmt. Zur Bestimmung der Cut-Offs wurden markierte PMNs bzw. LDGs nicht markierten gegenübergestellt. Für jeden gemessenen Fluoreszenzfarbstoff wurden die Cut-Offs oberhalb der gemessenen Fluoreszenzintensität angesetzt, die bei nicht markierten Granulozyten der jeweiligen Gruppe gemessen wurde, sodass die zufälligen Emissionen nicht markierter Granulozyten keinen Einfluss auf die Messung nehmen konnten. Lag die Fluoreszenzintensität eines Granulozyten oberhalb des bestimmten Cut-Offs, so lag auch der dazugehörige Oberflächenmarker vermehrt vor und der Granulozyt wurde als Oberflächenrezeptor-positiv (z.B. CD14 positiv) klassifiziert (siehe Abbildung 4). Lag die Fluoreszenzintensität eines Granulozyten unterhalb des bestimmten Cut-Offs, so wurde dieser als Oberflächenrezeptor-negativ gewertet. Dieses Procedere wurde für CD14, CD16, CD86, CD177 und HLA-DR durchgeführt, sodass jeder gemessene Granulozyt als positiv bzw. negativ für das jeweilige „Cluster of Differentiation (CD)“ charakterisiert werden konnte und somit ein spezifisches Rezeptorprofil erhielt. Diese Charakterisierung jedes Granulozyten jeder Stichprobe bildete den grundlegenden Datensatz und damit die Basis für die qualitative und quantitative Analyse der Oberflächenrezeptoren von PMNs und LDGs in allen drei Gruppen der Studie.

3.5.3 Datenerhebung über SAP und Copra

Um die labortechnisch erhobenen Daten mit klinischen Parametern vergleichen zu können, mussten neben den grundlegenden Personeninformationen weitere klinische Parameter erfasst werden. Die Informationen über die Probandinnen und Probanden der Vaskulitis-Gruppe wurden über das Patientenmanagement-System SAP CSP IS-H der Charité Berlin bezogen. Dabei wurden die Diagnosen und Nebendiagnosen der Patient*innen notiert und falls dokumentiert, folgende Laborparameter erfasst: CRP im Serum, Leukozyten (EDTA-Blut), Kreatinin im Serum, glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Harnstoff im Serum, cANCA im Serum und pANCA im Serum. Darüber hinaus wurden aus den Patientenakten folgende Informationen übernommen: Aktivitätszustand der Vaskulitis, aktuelle Medikation.

Um eine präzisere Einschätzung vom Aktivitätszustand der Vaskulitis zu erhalten, wurde für alle Probandinnen und Probanden auf Basis ihrer dokumentierten Symptome der Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) erhoben, dies erfolgte mit Hilfe des BVAS Online Tools der University of Oxford (78, 79). Die Informationen über die Probandinnen und Probanden der Sepsis-Gruppe wurden über das Patientenmanagement-System COPRA 5 der Charité Berlin bezogen. Auch hier wurden sowohl Diagnosen und Nebendiagnosen der Patient*innen als auch Vital- und Laborparameter erfasst. Folgende Vitalparameter wurden notiert: Körpertemperatur in °C, Herzfrequenz pro Minute, Atemfrequenz pro Minute, pCO₂ in mmHg sowie systolischer und diastolischer Blutdruck in mmHg. Folgende Laborparameter wurden notiert: CRP im Serum, Leukozyten (EDTA-Blut), Kreatinin im Serum, Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) sowie Harnstoff im Serum. Darüber hinaus wurde erfasst, ob zur Zeit der Blutentnahme eine Therapie mit Vasopressoren durchgeführt wurde, ob ein Erreger im Blut nachgewiesen werden konnte und falls dies zutreffend war, um welchen Erreger es sich handelte und ob die Patientin bzw. der Patienten bis zum Ende der Datenerhebung verstorben ist. Auch in der Sepsis-Gruppe wurden, um eine genauere Einschätzung des Gesundheitszustandes der Patientin bzw. des Patienten zu erhalten, Scores erfasst, die bereits vom ärztlichen Personal erhoben wurden und in COPRA 5 dokumentiert waren. Hierbei handelte es sich um folgende Scores: SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), TISS-28 (Therapeutic Intervention Scoring System), APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation) und SAPS II (Simplified Acute Physiology Score).

3.6 In vitro Stimulation („Spiking“)

Um den Einfluss stimulierender Signalstoffe und erhöhter Temperaturen auf die Quantität von LDGs zu bestimmen, wurde eine in vitro Stimulation von Vollblut durchgeführt. Hierfür wurden je 5ml des Vollbluts einer gesunden Testperson (Kontrollgruppe) in fünf 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die fünf Zentrifugenröhrchen stellen die folgenden fünf Versuchsansätze dar:

1. unstimulierte Kontrolle, gelagert auf Eis
2. unstimulierte Probe, gelagert bei 37°C
3. mit TNF α stimulierte Probe, inkubiert bei 37°C
4. mit TNF α und α PR3 mAb kostimulierte Probe, inkubiert bei 37°C
5. mit TNF α und α MPO mAb kostimulierte Probe, inkubiert bei 37°C

Dem Vollblut aller Ansätze wurde zunächst PBS nach Pipettierschema (siehe Tabelle 7) hinzugegeben. Der unstimulierte Versuchsansatz (1) wurde so belassen und für 60min auf Eis gelagert. Ein weiterer unstimulierter Ansatz (2) wurde für 60min bei 37°C im Brutschrank gelagert. Dem nächsten Ansatz (3) wurde TNF α hinzugegeben, anschließend erfolgte für 60min die Inkubation bei 37°C. Dem α PR3 mAb - (4) und dem α MPO-Versuchsansatz (5) wurden TNF α hinzugegeben, danach folgte eine Inkubation für 15min bei 37°C. Dieses „Priming“ mit TNF α ist notwendig, um die Neutrophilen für die Aktivierung durch PR3- bzw. MPO-Antikörper zugänglich machen (80). Im Anschluss wurden dem α PR3-Ansatz die PR3-Antikörper, dem α MPO-Ansatz die MPO-Antikörper hinzugefügt und erneut für 45min bei 37°C inkubiert. Die Inkubation bzw. Lagerung aller Proben erfolgte in Dunkelheit. Nach Ablauf der Inkubations- bzw. Lagerungszeit wurde das nun stimulierte Vollblut aller Ansätze wie in 3.4 und 3.5 beschrieben, labortechnisch aufbereitet und im Durchflusszytometer analysiert.

Tabelle 7: Pipettierschema der in vitro Stimulation („Spiking“) von Vollblut-Proben

Nummer	Ansatz	Vollblut	PBS	TNF	Antikörper	Dauer der Inkubation	Temperatur
1	unstimulierte Kontrolle	5000µl	100µl	/	/	60 min	auf Eis
2	unstimuliert bei 37°C	5000µl	100µl	/	/	60 min	37°C
3	TNFα	5000µl	49µl	51µl	/	60 min	37°C
4	αPR3 mAb	5000µl	35,03µl	51µl (1:50)	13,97µl	15 min TNF 45min αPR3	37°C
5	αMPO mAb	5000µl	26,08µl	51µl (1:50)	22,92	15 min TNF 45min αMPO	37°C

3.7 Statistische Datenauswertung

Die mittels FlowJo (Version 10.2.0) ermittelten Daten wurden zuerst in Microsoft® Excel für Mac (Version 15.28) ausgegeben und anschließend zur Durchführung statistischer Tests in IBM SPSS Statistics® (Version 24) übertragen. Ziel der statistischen Testungen war es LDGs in den verschiedenen Gruppen quantifizieren und ihr Oberflächenrezeptorprofil mit dem der Granulozyten aus dem PMNs-Ansatz zu vergleichen. Dafür wurden die Profile der Granulozyten der verschiedenen Gruppen innerhalb eines Ansatzes, PMNs oder PBMCs (LDGs), miteinander verglichen. Außerdem wurden die Oberflächenprofile der Granulozyten der verschiedenen Ansätze innerhalb einer Gruppe verglichen, also PMNs gegen LDGs innerhalb einer Patientengruppe.

Bevor die Testungen auf signifikante Gruppenunterschiede durchgeführt werden konnten, wurden zuerst die statistischen Merkmale der zu vergleichenden Stichproben überprüft. Die Normalverteilung der Stichproben wurde mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft, da dieser Test für kleine Stichproben ($n < 50$) eine hohe Teststärke aufweist (81). Eine Verteilung in einer Gruppe wurde als nicht normalverteilt klassifiziert, wenn sie sich signifikant ($p < 0,05$) von der Normalverteilung unterschied. Die Varianzgleichheit zweier Stichproben wurde mit Hilfe des Levene-Test der Varianzgleichheit geprüft, auch hier wurden die Varianzen als ungleich klassifiziert, wenn sie sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander unterschieden. Lagen bei beiden zu vergleichenden Stichproben sowohl eine Normalverteilung, als auch eine Varianzgleichheit vor, so waren die Bedingungen für die Anwendung des T-Test für die Mittelwertgleichheit erfüllt und dieser wurde

durchgeführt. War mindestens eine dieser Bedingungen nicht erfüllt, so wurde der Mann-Whitney-U Test angewendet, mit dem genauso wie mit dem T-Test ein Mittelwertvergleich durchgeführt werden kann, ohne dass die Voraussetzung der Normalverteilung oder der Varianzgleichheit erfüllt sein muss. Eine einfaktorielle ANOVA wurde nicht durchgeführt, da die notwendigen Voraussetzungen, Normalverteilung und Varianzgleichheit, nicht immer gegeben waren.

Die errechneten p-Werte wurden wie folgt differenziert: $p \leq 0,05$ wurde als signifikanter, $p \leq 0,01$ als sehr signifikanter und $p \leq 0,001$ als höchst signifikanter Gruppenunterschied definiert.

Um Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern und labortechnisch gemessenen Daten zu ermitteln, wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson und die dazugehörigen Signifikanzniveaus errechnet.

Die Gruppenunterschiede der in vitro Stimulation („Spiking“) wurden mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Scheffé-Test berechnet.

Für alle Berechnungen galt, dass ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ als signifikant gewertet wurde. Die Begriffe „Durchschnitt“ oder „Mean“ beschreiben den Mittelwert einer Stichprobe.

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde mit Microsoft® Word für Mac (Version 15.27) verfasst. Für die Erstellung des Literaturverzeichnisses und des Managements der Zitate wurde die Software Endnote X8 inklusive Microsoft® Word Plug-In verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

Die Patientencharakteristika bezüglich Geschlechts- und Altersverteilung aller Studiengruppen sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 8: Übersicht der Geschlechterverteilung in den Studiengruppen

Gruppe	Geschlecht	Häufigkeit	Anteil in %
Kontrolle	männlich	17	58,6
	weiblich	12	41,4
	Gesamt	29	100,0
Vaskulitis	männlich	18	56,3
	weiblich	14	43,8
	Gesamt	32	100,0
SIRS/Sepsis	männlich	17	70,8
	weiblich	7	29,2
	Gesamt	24	100,0

Tabelle 9: Übersicht der Altersverteilung in den Studiengruppen

Gruppe	N	Alter in Jahren			
		Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	29	20	78	48,5	21,2
Vaskulitis	32	24	83	55,5	14,9
SIRS/Sepsis	24	20	88	62,4	17,9

4.1.1 Kontrollgruppe

Insgesamt waren 29 Personen Teil der Kontrollgruppe, zwölf (41,4%) davon waren Frauen, 17 Männern (58,6%). Das Alter der untersuchten Personen lag zwischen 20 und 78 Jahren bei durchschnittlich 48,5 Jahren.

4.1.2 Vaskulitis-Gruppe

In die Vaskulitis-Gruppe wurden insgesamt 32 Personen eingeschlossen, wovon 14 (43,8%) weiblich und 18 (56,3%) männlich waren. Das Alter der untersuchten Personen reichte von 24 bis 83 Jahre, wobei ein Durchschnittsalter von 55,5 Jahren vorlag. Bei 28 Testpersonen dieser Gruppe wurde eine AAV diagnostiziert, um die Anzahl der Testpersonen zu erhöhen, wurden vier Testpersonen eingeschlossen, bei denen eine

systemische Vaskulitis anderer Genese, jedoch keine AAV diagnostiziert wurde. Die Minima, Maxima und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der erhobenen klinischen Parameter wurden in Tabelle 10 zusammengefasst. Diejenigen Stichproben, bei denen bestimmte klinische Parameter nicht erfasst wurden, wurden für die statistische Auswertung ebendieses Parameters nicht berücksichtigt.

Tabelle 10: Übersicht der erfassten numerischen klinischen Parameter in der Vaskulitis-Gruppe

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
BVAS	26	0	14	4,4	4,7
CRP in mg/dl	24	0,30	171,6	25,5	47,0
Kreatinin in mg/dl	25	0,7	2,8	1,3	0,6
eGFR in ml/min	25	22,0	90,0	62,9	23,5
Harnstoff in mg/dl	25	15,0	148,0	55,1	33,5
cANCA (PR3) in U/ml	22	1,1	154,5	36,8	53,3
pANCA (MPO) in U/ml	7	0,1	100,0	33,9	46,8
Leukozyten/nl	24	5,1	43,6	11,6	7,5

Erfasste nominale Parameter der Vaskulitis-Gruppe wurden in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Häufigkeiten der erfassten nominalen Parameter in der Vaskulitis-Gruppe

		Häufigkeit	Anteil in %
Art der Vaskulitis	AAV	28	87,5
	andere primäre Vaskulitis	4	12,5
	gesamt	32	100,0
Diagnose	GPA	16	50,0
	MPA	2	6,3
	EGPA	1	3,1
	renal-limitierte AAV	9	28,1
	Takayasu-Arteriitis	2	6,3
	hypokomplementäre Vaskulitis	1	3,1
	IgA-Vaskulitis	1	3,1
	gesamt	32	100,0
Aktivitätszustand der Vaskulitis	inaktiv	18	56,3
	aktiv	14	43,8
	gesamt	32	100,0

Immunsuppressive Therapie	kein Immunsuppressivum	18	56,3
	Cyclophosphamid	1	3,1
	Rituximab	2	6,3
	Mycophenolat-Mofetil	2	6,3
	Methotrexat	3	9,4
	keine Daten	6	18,8
	gesamt	32	100,0
Prednisolontherapie	kein Prednisolon	11	34,4
	Prednisolon < 60mg/d	7	21,9
	Prednisolon ≥ 60mg/d	8	25,0
	keine Daten	6	20,6
	gesamt	32	100,0

4.1.3 SIRS/Sepsis-Gruppe

In der SIRS/Sepsis-Gruppe wurden insgesamt 24 Personen berücksichtigt, 7 (29,3%) Frauen und 17 Männer (70,8%). Das Alter dieser Patientengruppe erstreckte sich von 20 bis 88 Jahre und lag im Durchschnitt bei 62,4 Jahren. Die Minima, Maxima und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der erhobenen klinischen Parameter wurden in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Übersicht der erfassten numerischen klinischen Parameter in der SIRS/Sepsis-Gruppe

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
CRP in mg/l	20	0,5	509,4	212,9	148,2
Kreatinin in mg/dl	23	0,6	4,3	1,7	1,0
eGFR in ml/min	23	15,0	90,0	51,8	26,5
Harnstoff in mg/dl	23	27,0	169,0	77,1	44,7
Leukozyten/nl	24	0,2	46,2	13,5	10,8
SOFA	22	1	19	10,3	4,7
TISS-28	22	19	44	33,1	7,1
APACHE 2	22	12	39	24,5	8,8
SAPS 2	22	20	87	58,0	20,6

Die erfassten nominalen Parameter der SIRS/Sepsis-Gruppe wurden in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Übersicht der erfassten nominalen Parameter in der SIRS/Sepsis-Gruppe

		Häufigkeit	Anteil in %
Wurden die SIRS-Kriterien erfüllt?			
SIRS?	ja	24	100,0
	gesamt	24	100,0
Wurde eine Sepsis diagnostiziert?			
Sepsis?	ja	15	62,5
	nein	9	37,5
	gesamt	24	100,0
Hat die Patientin/der Patient Vasopressoren erhalten?			
Vasopressoren erhalten?	nein	8	33,4
	ja	16	66,7
	gesamt	24	100,0
Erregernachweis und Gramverhalten des oder der Erreger			
	kein Erreger nachgewiesen	11	45,8
Gramverhalten des nachgewiesenen Erregers	positiv	5	20,8
	negativ	4	16,7
	Candida albicans (positiv)	1	4,2
	positiv und negativ	2	8,3
	positiv und Candida albicans	1	4,2
	Gesamt	24	100,0
	Ist die Patientin/der Patient verstorben?		
Patientin/Patient verstorben?	nein	17	70,8
	ja	7	29,2
	gesamt	24	100,0

4.2 Vergleich der LDG-Anteile an den PBMCs (nach FSC-SSC)

Um zu bestimmen, welchen Einfluss autoimmune Vaskulitiden bzw. systemische Inflammationen auf den Anteil der LDGs unter den PBMCs haben, wurden die LDG-Fractionen in den PBMCs (Interphase) für jede Gruppe quantifiziert. LDGs wurden anhand des charakteristischen Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts von Granulozyten klassifiziert, d.h. diejenigen Zellen, die in der FACS-Analyse der PBMCs

das typische Streuverhalten von Granulozyten in FSC und SSC aufwiesen – so wie es auch in PMNs vorliegt - wurden als LDGs definiert.

4.2.1 Vergleich Kontrollgruppe versus Vaskulitis-Gruppe

Der Anteil von LDGs an PBMCs stellte sich in der Vaskulitis-Gruppe signifikant erhöht (14,7% ± 2,6%, Mittelwert ± Standardfehler) im Vergleich zur Kontrollgruppe (2,7% ± 0,7%, ***p≤ 0,001) dar.

Tabelle 14: Vergleich des LDG-Anteils an PBMCs zwischen Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe

	Gruppe	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung
Anteil LDGs an PBMCs in %	Kontrolle	29	0,2	17,80	2,7	0,7	3,5
	Vaskulitis	32	2,1	58,90	14,7***	2,6	14,6

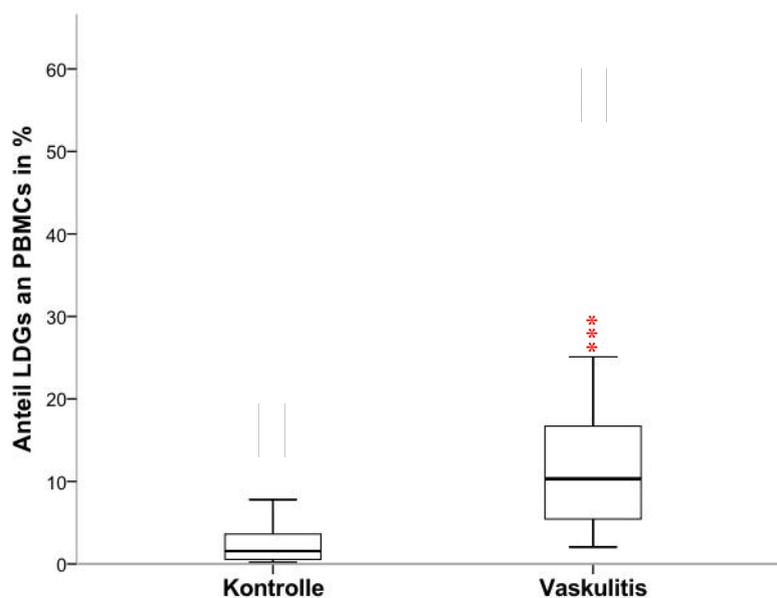


Abbildung 7: Vergleich des LDG-Anteils von Kontroll- und Vaskulitisgruppe

Der untere Balken kennzeichnet das Minimum, die untere Begrenzung der Box das erste Quartil, die Mittellinie den Median, die obere Begrenzung der Box das dritte Quartil und der obere Balken das Maximum für die entsprechende Gruppe. Sternchen geben signifikante Unterschiede an, * p≤ 0,05 (signifikant), ** p≤ 0,01 (sehr signifikant), *** p≤ 0,001 (höchst signifikant). n.s. = nicht signifikanter Gruppenunterschied.

4.2.2 Vergleich Kontrollgruppe versus SIRS/Sepsis-Gruppe

In der SIRS/Sepsis-Gruppe zeigt sich ein noch deutlicheres Bild, auch hier liegt der Anteil der LDGs an den gemessenen PBMCs signifikant erhöht (26,9% ± 4,6%) verglichen mit der Kontrollgruppe (2,7% ± 0,7%, ***p≤ 0,001).

Tabelle 15: Vergleich des LDG-Anteils an PBMCs zwischen Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe

	Gruppe	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung
Anteil LDGs an PBMCs in %	Kontrolle	29	0,2	17,8	2,7	0,7	3,5
	SIRS/Sepsis	24	2,6	87,6	26,9***	4,6	22,4

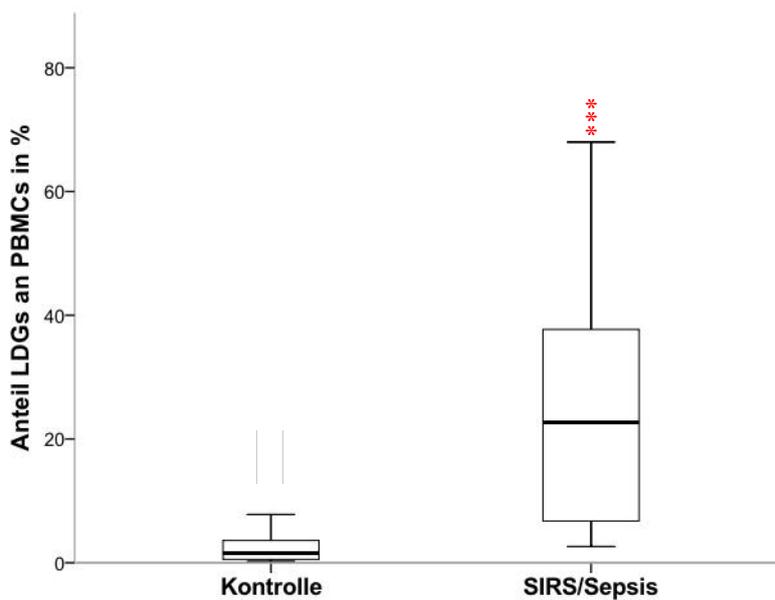


Abbildung 8: Vergleich des LDG-Anteils von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe

4.3 Vergleich der LDG-Fraktion an den PBMCs (nach FSC-SSC und CD66b)

Alternativ können als LDGs auch ausschließlich diejenigen Zellen definiert werden, die neben den charakteristischen Eigenschaften von Granulozyten in FSC und SSC zusätzlich CD66b positiv sind. Die nachfolgenden Ergebnisse berücksichtigen diese selektivere Definition.

4.3.1 Vergleich Kontrollgruppe versus Vaskulitis-Gruppe

Der Anteil von CD66b-positiven LDGs an PBMCs ist der Vaskulitis-Gruppe signifikant höher ($13,7\% \pm 2,6$) verglichen mit der Kontrollgruppe ($2,5\% \pm 0,6\%$, $***p \leq 0,001$).

Tabelle 16: Vergleich des Anteils CD66b-positiver LDGs an PBMCs zwischen Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe

	Gruppe	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung
Anteil CD66b-positiver LDGs an PBMCs in %	Kontrolle	29	0,1	16,8	2,5	0,6	3,4
	Vaskulitis	32	1,1	58,4	13,7***	2,6	14,5

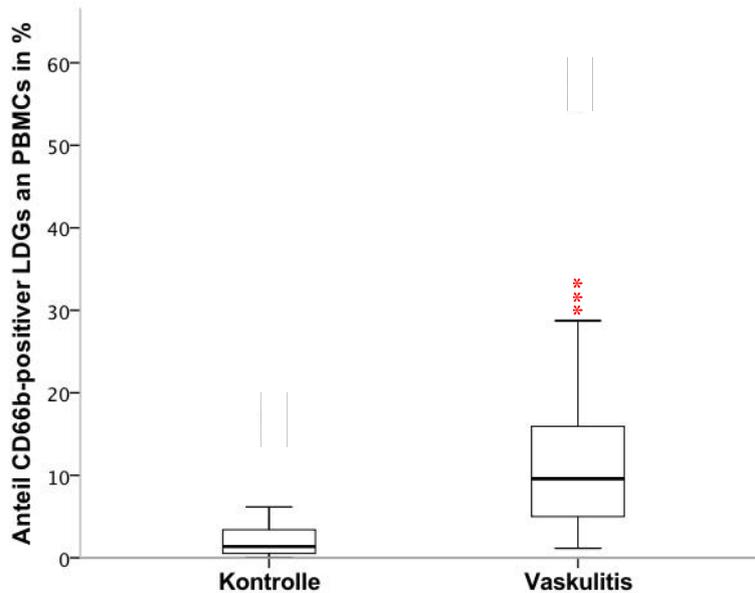


Abbildung 9: Vergleich des Anteils von CD66b-positiven LDGs zwischen Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe

4.3.2 Vergleich der Gruppen mit aktiver versus inaktiver Vaskulitis

Im nächsten Schritt wurde die Vaskulitis-Gruppe anhand des Aktivitätszustandes der Vaskulitis in eine inaktive und eine aktive Kohorte aufgeteilt. Der Vergleich dieser beiden Kohorten ergab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Anteils CD66b-positiver LDGs an PBMCs, dennoch zeigte sich im Trend eine erhöhte Fraktion CD66b-positiver LDGs in der aktiven Kohorte ($19,8\% \pm 5,2\%$) verglichen mit der inaktiven Kohorte ($8,9\% \pm 1,3\%$, $p > 0,05$)

Tabelle 17: Vergleich des Anteils CD66b-positiver LDGs an PBMCs zwischen inaktiven und aktiven Vaskulitiden

	Gruppe	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung
Anteil CD66b-positiver LDGs an PBMCs in %	inaktiv	18	1,1	19,3	8,9	1,3	5,7
	aktiv	14	2,0	58,4	19,8	5,2	19,6

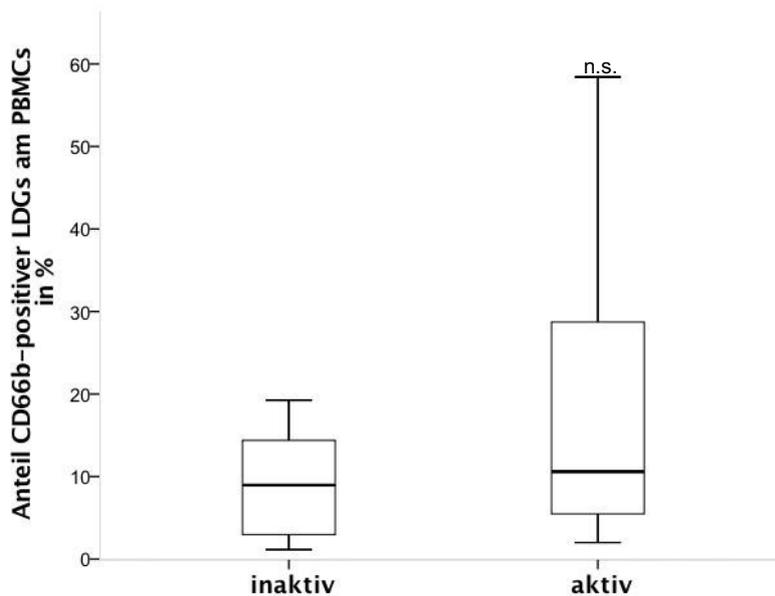


Abbildung 10: Vergleich des Anteils von CD66b-positiven LDGs zwischen inaktiven und aktiven Vaskulitiden

4.3.3 Vergleich Kontrollgruppe versus SIRS/Sepsis-Gruppe

In der SIRS/Sepsis-Gruppe zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Gruppenunterschied, hier liegt der Anteil der CD66b-positiven LDGs an den gemessenen PBMCs signifikant höher (22,3% ± 3,7%) verglichen mit der Kontrollgruppe (2,5% ± 0,6%, ***p ≤ 0,001).

Tabelle 18: Vergleich des Anteils CD66b-positiver LDGs an PBMCs zwischen Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe

	Gruppe	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung
Anteil CD66b-positiver LDGs an PBMCs in %	Kontrolle	29	0,1	16,8	2,5	0,6	3,4
	SIRS/Sepsis	24	1,5	66,0	22,3***	3,7	18,0

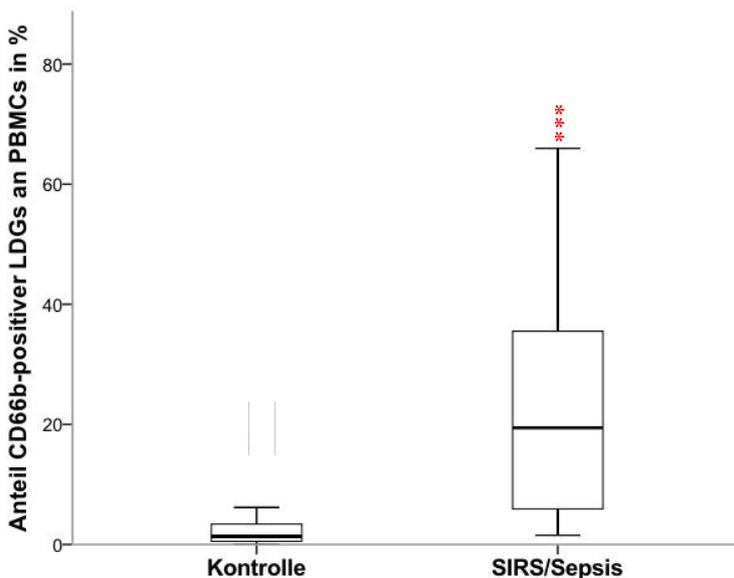


Abbildung 11: Vergleich des Anteils von CD66b-positiven LDGs zwischen Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe

4.4 Vergleich der Rezeptorexpression von LDGs und PMNs in den untersuchten Gruppen

Die folgenden Ergebnisse stellen eine detaillierte Charakterisierung der Oberflächenrezeptorexpression von LDGs dar. Im Folgenden wurden LDGs als Zellen gewertet, die im FSC und SSC das charakteristische Streuverhalten von Granulozyten aufwiesen und zudem CD66b positiv waren.

Um die prinzipiellen Unterschiede zwischen LDGs und PMNs hinsichtlich ihrer Oberflächenrezeptorexpression zu erfassen, wurden die LDGs jeder Testgruppe mit den PMNs der gleichen Testgruppe verglichen. Zum einen wurde jeweils der prozentuale Anteil von LDGs, die für einen bestimmten Rezeptor positiv gewertet wurden - also oberhalb des definierten Cut-Offs bezüglich der Rezeptorexpression lagen - mit dem prozentualen Anteil von PMNs, die für den gleichen Rezeptor positiv gewertet wurden, verglichen. Zum anderen wurde die MFI (engl. mean fluorescence intensity, mittlere Fluoreszenzintensität), als Maß für die Expressionsintensität des entsprechenden Antigenes, von LDGs und PMNs bestimmt und miteinander verglichen.

4.4.1 Kontrollgruppe

4.4.1.1 Anteile von Rezeptor-positiven PMNs versus LDGs

In der Kontrollgruppe wurde die Rezeptorexpression der PMNs mit jener der LDGs verglichen. Dabei zeigte sich, dass die LDGs in der Kontrollgruppe zu $49,4\% \pm 2,3\%$

CD14-positiv waren und damit signifikant häufiger als PMNs ($42,6\% \pm 1,5\%$, * $p \leq 0,05$). Zudem waren $24,4\% \pm 2,6\%$ der LDGs CD86-positiv, wohingegen nur $13,8\% \pm 1,1\%$ der PMNs CD86-positiv waren, was einen signifikanten Unterschied darstellt ($***p \leq 0,001$). Darüber hinaus lag der Anteil HLA-DR-positiver LDGs signifikant höher ($26,6\% \pm 3,4\%$) verglichen mit dem Anteil HLA-DR-positiver PMNs ($12,2\% \pm 1,2\%$, $***p \leq 0,001$). Bezüglich der Expression von CD16 und CD177 lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen LDGs und PMNs vor.

Tabelle 19: Anteil Rezeptor-positiver PMNs und LDGs an der Gesamtpopulation der Kontrollgruppe

Anteile		N	Min. (%)	Max. (%)	Mittelwert (%)	Standard- fehler (%)	Standard- abweichung (%)
CD14	PMN	29	20,0	59,7	42,6	1,5	8,0
	LDG	29	28,6	80,5	49,4*	2,3	12,5
CD16	PMN	29	1,1	83,5	22,1	4,2	22,7
	LDG	29	0,0	93,2	26,4	4,3	23,3
CD86	PMN	29	5,0	28,6	13,8	1,1	5,9
	LDG	29	0,0	67,9	24,4***	2,6	14,3
CD177	PMN	29	0,0	89,1	48,4	4,9	26,2
	LDG	29	1,2	74,2	40,3	4,3	23,0
HLA-DR	PMN	29	4,8	32,4	12,2	1,2	6,3
	LDG	29	1,9	78,2	26,6***	3,4	18,4

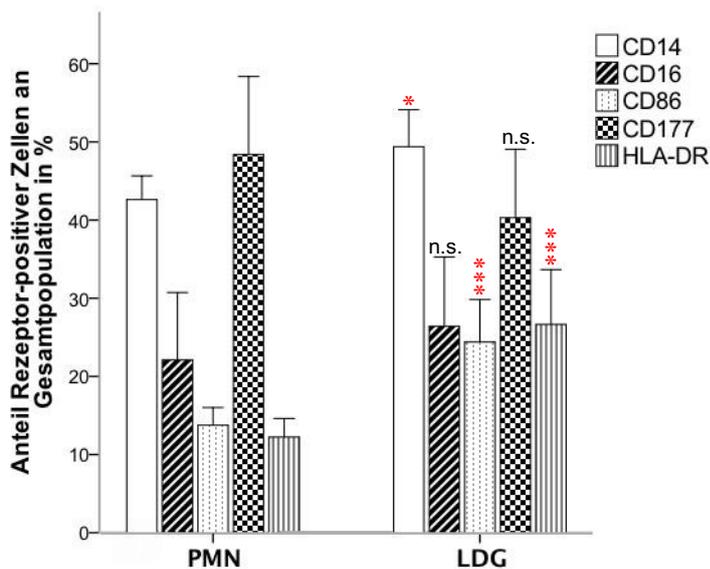


Abbildung 12: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) LDGs und PMNs an ihrer Gesamtpopulation in der Kontrollgruppe

Die obere Kante der Box kennzeichnet den Mittelwert, die Balken das Konfidenzintervall.

Sternchen geben signifikante Unterschiede an, * $p \leq 0,05$ (signifikant), ** $p \leq 0,01$ (sehr signifikant), *** $p \leq 0,001$ (höchst signifikant). n.s. = nicht signifikanter Gruppenunterschied.

4.4.1.2 MFI

Auch bezüglich der Stärke der Rezeptorexpression, die mittels MFI bestimmt wurde, konnten signifikante Unterschiede zwischen LDGs und PMNs in der Kontrollgruppe gezeigt werden. So zeigte sich CD14 auf LDGs signifikant höher exprimiert ($1734,8 \pm 298,7$) als auf PMNs ($633,1 \pm 28,4$; *** $p \leq 0,001$). Auch die Rezeptorexpression von CD16 stellt sich auf LDGs signifikant höher ($1019,7 \pm 578,3$) als auf PMNs ($183,5 \pm 31,2$; * $p \leq 0,05$) dar. Auch die MFI von CD86 zeigte sich auf LDGs signifikant höher ($2640,0 \pm 488,1$) als auf PMNs ($825,9 \pm 17,9$; *** $p \leq 0,001$), ebenso wie die MFI von HLA-DR, welche auf LDGs bei $1625,9 \pm 398,2$ und auf PMNs bei $294,6 \pm 11,3$ liegt (*** $p \leq 0,001$). Weitere signifikante Unterschiede konnten nicht gezeigt werden.

Tabelle 20: MFI von PMNs und LDGs in der Kontrollgruppe nach Rezeptoren

MFI		N	Min.	Max.	Mittelwert	Standard- fehler	Standard- abweichung
CD14	PMN	29	327,0	1081,0	633,2	28,4	152,7
	LDG	29	508,0	7700,0	1734,8***	298,7	1608,5
CD16	PMN	29	31,9	672,0	183,5	31,2	167,9
	LDG	29	19,9	16484,0	1019,7*	578,3	3114,3
CD86	PMN	29	669,0	1030,0	825,9	17,9	96,5
	LDG	29	610,0	8245,0	2640,0***	488,1	2628,3
HLA-DR	PMN	29	220,0	495,0	294,6	11,3	61,0
	LDG	29	184,0	7689,0	1625,9***	398,2	2144,6

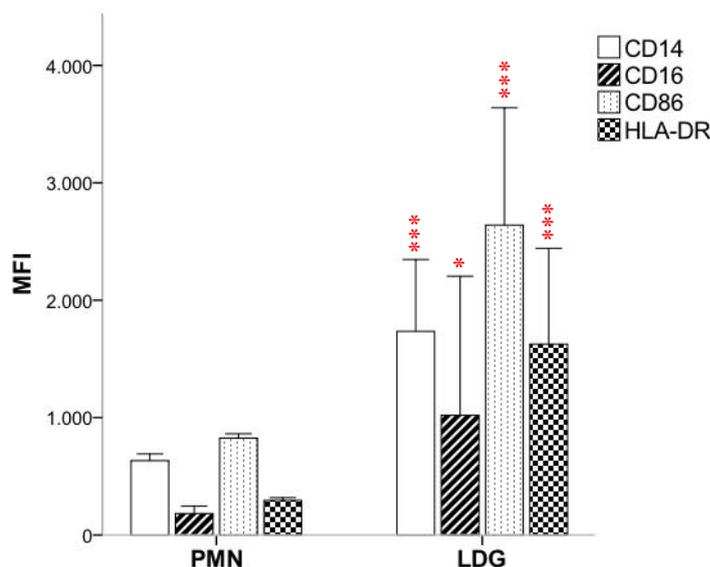


Abbildung 13: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) auf PMNs und LDGs der Kontrollgruppe

4.4.2 Vaskulitis-Gruppe

4.4.2.1 Anteile von Rezeptor-positiven PMNs versus LDGs

Auch in der Vaskulitis-Gruppe wurde die Rezeptorexpression der PMNs mit jener der LDGs verglichen. Dabei war zu erkennen, dass die LDGs in der Vaskulitis-Gruppe zu 52,0% ± 2,0% CD14-positiv waren und damit signifikant häufiger als die PMNs dieser Gruppe (45,1% ± 2,2%, * p ≤ 0,05). Es waren 26,6% ± 2,8% der LDGs CD86-positiv, wohingegen nur 18,7% ± 2,1% der PMNs CD86-positiv waren, dieser Unterschied ist signifikant (* p ≤ 0,05). Auch der Anteil HLA-DR-positiver LDGs war signifikant höher

(32,1% ± 2,8%) verglichen mit dem Anteil HLA-DR-positiver PMNs (21,2% ± 2,4%, **p≤ 0,01). Bezüglich CD16 und CD177 lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen LDGs und PMNs vor.

Tabelle 21: Anteil Rezeptor-positiver PMNs und LDGs an der Gesamtpopulation der Vaskulitis-Gruppe

Anteile		N	Min. (%)	Max. (%)	Mittelwert (%)	Standardfehler (%)	Standardabweichung (%)
CD14	PMN	32	11,0	63,9	45,1	2,2	12,4
	LDG	32	9,4	73,4	52,0*	2,0	11,3
CD16	PMN	32	0,2	68,3	26,7	4,2	23,9
	LDG	32	0,0	80,4	22,1	3,4	19,5
CD86	PMN	32	5,3	42,6	18,7	2,1	11,7
	LDG	32	8,4	75,5	26,6*	2,8	16,1
CD177	PMN	32	0,2	97,1	57,5	4,2	23,7
	LDG	32	0,5	95,0	51,4	4,1	23,3
HLA-DR	PMN	32	4,9	60,1	21,2	2,4	13,5
	LDG	32	12,7	76,5	32,1**	2,8	16,0

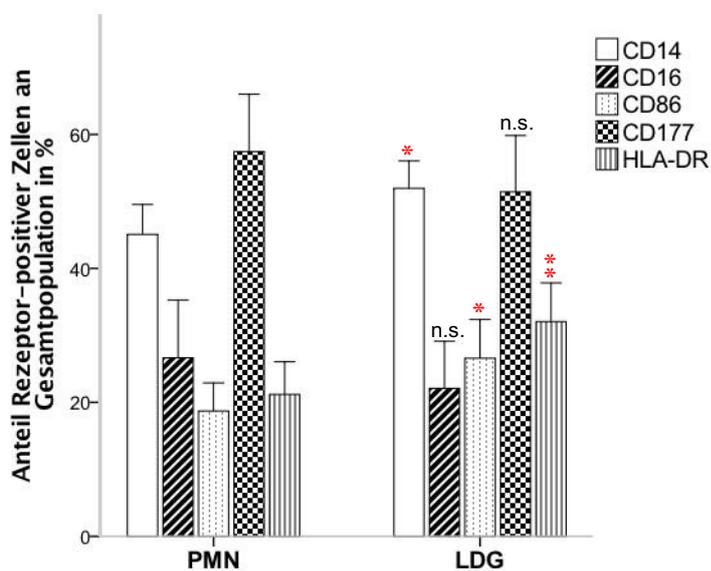


Abbildung 14: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) LDGs und PMNs an ihrer Gesamtpopulation in der Vaskulitis-Gruppe

4.4.2.2 MFI

Auch die Quantität der Rezeptorexpression unterscheidet sich zwischen PMNs und LDGs der Vaskulitis-Gruppe bezüglich CD14, CD86 und HLA-DR. So ist CD14 auf LDGs signifikant höher exprimiert ($1084,7 \pm 110,1$) als auf PMNs ($740,6 \pm 49,1$; $**p \leq 0,01$), auch die Expression von CD86 ist auf LDGs signifikant höher ($1258,6 \pm 88,1$) als auf PMNs ($940,1 \pm 60,5$; $**p \leq 0,01$). Die Expression von HLA-DR zeigte sich auf LDGs signifikant höher ($704,8 \pm 71,9$) als auf PMNs ($436,9 \pm 48,7$; $***p \leq 0,001$). Darüber hinaus zeigten sich keine Unterschiede.

Tabelle 22: MFI von PMNs und LDGs in der Vaskulitis-Gruppe nach Rezeptoren

MFI		N	Min.	Max.	Mittelwert	Standard- fehler	Standard- abweichung
CD14	PMN	32	331,0	1356,0	740,6	49,1	277,4
	LDG	32	354,0	3837,0	1084,7**	110,1	623,0
CD16	PMN	32	28,2	520,0	209,8	28,0	158,3
	LDG	32	20,9	869,0	201,3	32,9	186,1
CD86	PMN	32	597,0	2248,0	940,1	60,5	342,4
	LDG	32	654,0	2535,0	1258,6**	88,1	498,2
HLA-DR	PMN	32	239,0	1376,0	436,9	48,7	275,3
	LDG	32	285,0	1717,0	704,8***	71,9	407,0

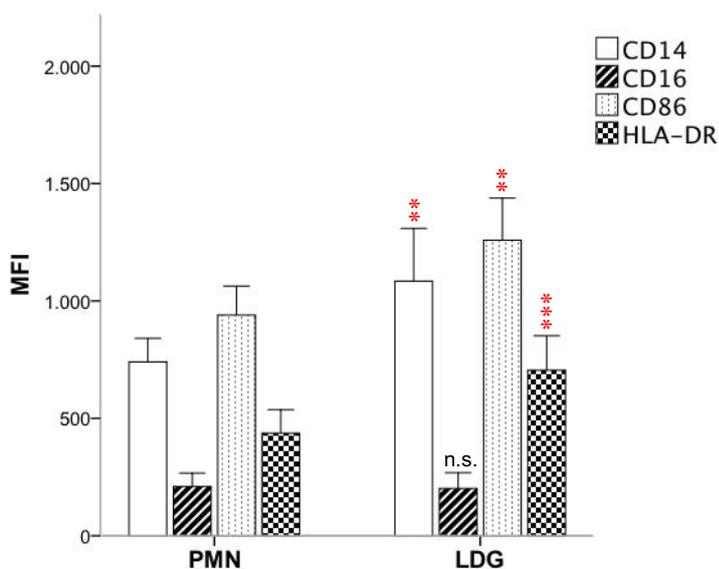


Abbildung 15: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) auf PMNs und LDGs der Vaskulitis-Gruppe

4.4.3 SIRS/Sepsis-Gruppe

4.4.3.1 Anteile von Rezeptor-positiven PMNs versus LDGs

In der SIRS/Sepsis-Gruppe ergab der Vergleich zwischen PMNs und LDGs bezüglich des Anteils CD14-, CD16-, CD86-, CD177- und HLA-DR-positiver Zellen keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 23: Anteil Rezeptor-positiver PMNs und LDGs an der Gesamtpopulation der SIRS/Sepsis-Gruppe

Anteile		N	Min. (%)	Max. (%)	Mittelwert (%)	Standardfehler (%)	Standardabweichung (%)
CD14	PMN	24	33,3	68,4	48,4	1,6	7,8
	LDG	24	21,2	81,6	51,9	2,4	11,6
CD16	PMN	24	3,2	42,1	14,0	2,3	11,1
	LDG	24	3,4	45,8	12,2	2,1	10,4
CD86	PMN	24	2,6	95,2	33,6	4,8	23,6
	LDG	24	7,0	95,8	39,4	4,0	19,8
CD177	PMN	24	0,3	98,4	56,5	6,7	32,6
	LDG	24	0,0	98,2	47,7	6,5	31,6
HLA-DR	PMN	24	8,7	84,7	26,0	3,6	17,5
	LDG	24	13,9	75,3	31,0	3,6	17,7

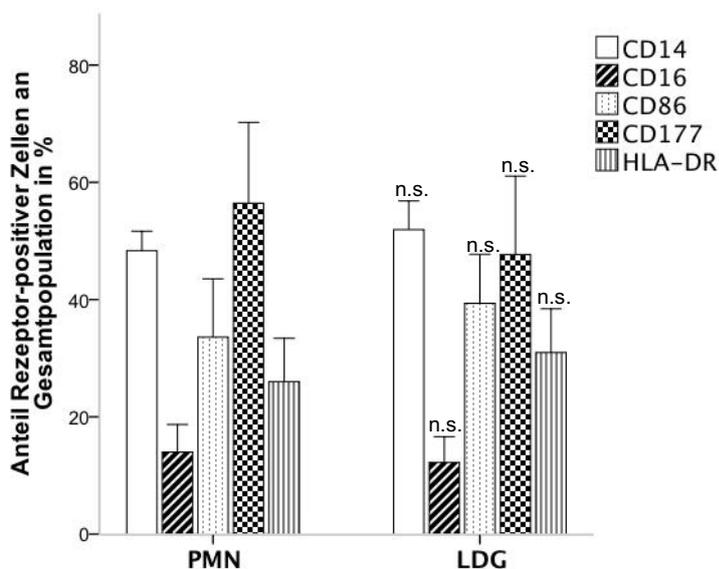


Abbildung 16: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) LDGs und PMNs an ihrer Gesamtpopulation in der SIRS/Sepsis-Gruppe

4.4.3.2 MFI

In der SIRS/Sepsis-Gruppe zeigen LDGs eine signifikant höhere Expression von HLA-DR (1202,6 ± 460,2) als die PMNs dieser Testgruppe (517,3 ± 126,5; *p≤ 0,05).

Tabelle 24: MFI von PMNs und LDGs in der SIRS/Sepsis-Gruppe nach Rezeptoren

MFI		N	Min.	Max.	Mittelwert	Standard- fehler	Standard- abweichung
CD14	PMN	24	447,0	1624,0	799,5	60,3	295,4
	LDG	24	480,0	9774,0	1424,8	393,2	1926,12
CD16	PMN	24	39,6	768,0	155,1	31,1	152,3
	LDG	24	27,7	1621,0	196,8	70,2	344,1
CD86	PMN	24	597,0	7488,0	1417,9	288,4	1412,9
	LDG	24	734,0	15654,0	2160,4	624,3	3058,3
HLA-DR	PMN	24	229,0	3360,0	517,3	126,5	620,0
	LDG	24	266,0	11258,0	1202,6*	460,2	2254,6

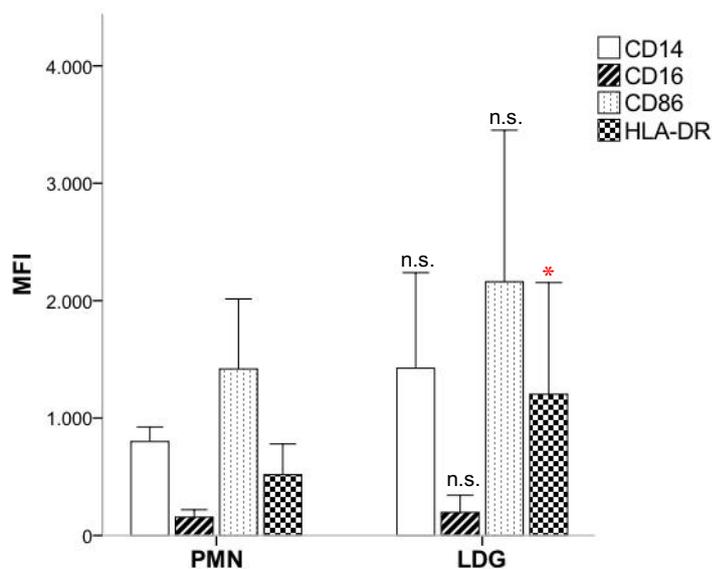


Abbildung 17: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) auf PMNs und LDGs der SIRS/Sepsis-Gruppe

4.5 Vergleich der Rezeptorexpression von PMNs

Die Rezeptorexpression der PMNs der Kontrollgruppe wurde mit jener der PMNs von Vaskulitis und SIRS/Sepsis-Gruppe verglichen.

4.5.1 Kontrollgruppe versus Vaskulitis-Gruppe

4.5.1.1 Anteile von Rezeptor-positiven PMNs

Der Vergleich der PMNs der Kontrollgruppe mit den PMNs der Vaskulitis-Gruppe ergab folgende Ergebnisse: Der Anteil der HLA-DR-positiven PMNs war in der Vaskulitis-Gruppe signifikant höher (21,2% ± 2,4%) verglichen mit der Kontrollgruppe (12,2% ± 1,2%, ** p≤ 0,01). Bezüglich der anderen Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, CD177) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Vaskulitis- und der Kontrollgruppe.

Tabelle 25: Anteil Rezeptor-positiver (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) PMNs an der Gesamtpopulation von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe

Rezeptor	Gruppe	N	Min. (%)	Max. (%)	Mittelwert (%)	Standardfehler (%)	Standardabweichung (%)
CD14	Kontrolle	29	20,1	59,7	42,6	1,5	8,0
	Vaskulitis	32	11,0	63,9	45,1	2,2	12,4
CD16	Kontrolle	29	1,1	83,5	22,1	4,2	22,7
	Vaskulitis	32	0,2	68,3	26,7	4,2	23,9
CD86	Kontrolle	29	5,0	28,6	13,8	1,1	5,9
	Vaskulitis	32	5,3	42,6	18,7	2,1	11,7
CD177	Kontrolle	29	0,0	89,1	48,4	4,9	26,2
	Vaskulitis	32	0,2	97,1	57,5	4,2	23,7
HLA-DR	Kontrolle	29	4,8	32,4	12,2	1,2	6,3
	Vaskulitis	32	4,9	60,1	21,2**	2,4	13,5

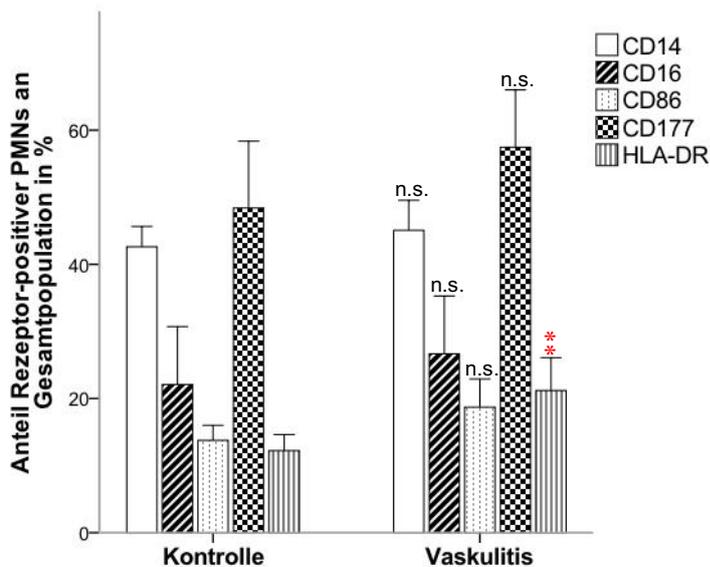


Abbildung 18: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) PMNs an ihrer Gesamtpopulation von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe

4.5.1.2 MFI

Der Vergleich der Rezeptorexpression von PMNs der Kontrollgruppe mit PMNs der Vaskulitis-Gruppe zeigte eine signifikant stärkere Ausprägung von HLA-DR in der Vaskulitis-Gruppe ($436,9 \pm 48,7$) verglichen mit der Kontrollgruppe ($294,6 \pm 11,3$, ** $p \leq 0,01$). Bezüglich der übrigen Rezeptoren ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen.

Tabelle 26: MFI der PMNs von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe nach Rezeptoren

Rezeptor	Gruppe	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung
CD14	Kontrolle	29	327,0	1081,0	633,2	28,4	152,7
	Vaskulitis	32	331,0	1356,0	740,6	49,1	277,5
CD16	Kontrolle	29	31,9	672,0	183,5	31,2	167,9
	Vaskulitis	32	28,2	520,0	209,8	28,0	158,3
CD86	Kontrolle	29	669,0	1030,0	825,9	17,9	96,5
	Vaskulitis	32	597,0	2248,0	940,1	60,5	342,4
HLA-DR	Kontrolle	29	220,0	495,0	294,6	11,3	61,0
	Vaskulitis	32	239,0	1376,0	436,9**	48,7	275,3

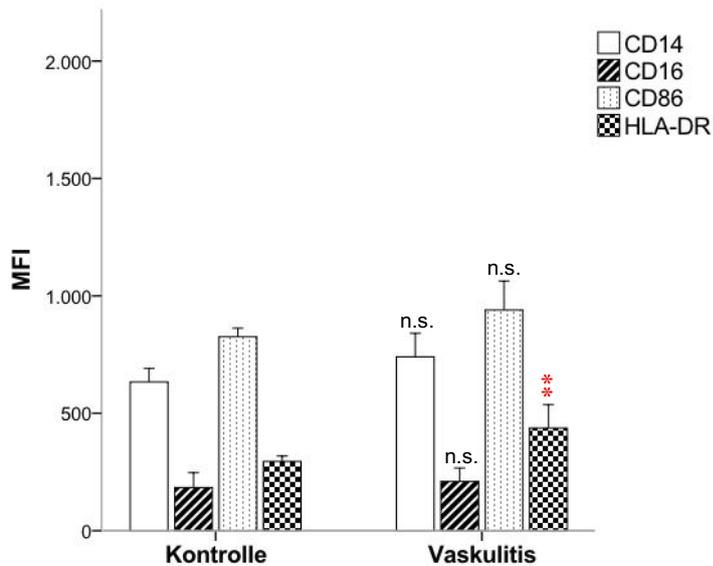


Abbildung 19: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) von PMNs von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe

4.5.2 Inaktive versus aktive Vaskulitis

4.5.2.1 Anteile von Rezeptor-positiven PMNs

Bezüglich der Anteile Rezeptor-positiver PMNs (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der inaktiven und der aktiven Vaskulitis-Gruppe gezeigt werden.

Tabelle 27: Anteil Rezeptor-positiver (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) PMNs an der Gesamtpopulation bei inaktiven und aktiven Vaskulitiden

Rezeptor	Gruppe	N	Min. (%)	Max. (%)	Mittelwert (%)	Standardfehler (%)	Standardabweichung (%)
CD14	inaktiv	18	11,0	63,9	43,5	3,4	14,3
	aktiv	14	21,3	57,2	47,2	2,5	9,4
CD16	inaktiv	18	0,2	68,3	25,0	6,0	25,3
	aktiv	14	5,3	62,6	28,8	6,1	22,7
CD86	inaktiv	18	5,3	42,6	19,3	3,2	13,5
	aktiv	14	6,0	37,9	18,0	2,5	9,2
CD177	inaktiv	18	18,3	97,1	60,3	5,1	21,8
	aktiv	14	0,2	93,5	53,9	7,0	26,3
HLA-DR	inaktiv	18	4,9	60,1	20,2	3,5	14,9
	aktiv	14	6,9	52,5	22,5	3,2	11,9

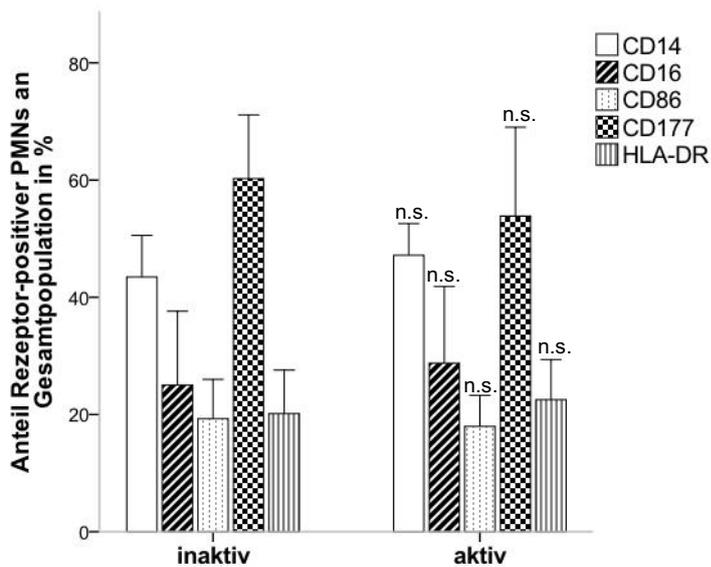


Abbildung 20: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) PMNs an ihrer Gesamtpopulation bei inaktiven und aktiven Vaskulitiden

4.5.2.2 MFI

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen inaktiven und aktiven Vaskulitiden in der Stärke der Rezeptorexpression von CD14, CD16, CD86 und HLA-DR gezeigt werden.

Tabelle 28: MFI von PMNs in inaktiven und aktiven Vaskulitiden nach Rezeptoren

Rezeptor	Aktivität Vaskulitis	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung
CD14	inaktiv	18	331,0	1341,0	704,2	66,4	281,8
	aktiv	14	346,0	1356,0	787,4	73,5	274,9
CD16	inaktiv	18	28,2	520,0	199,7	39,3	166,8
	aktiv	14	57,2	476,0	222,8	40,5	151,7
CD86	inaktiv	18	597,0	2248,0	983,5	100,6	426,7
	aktiv	14	626,0	1278,0	884,2	50,3	188,2
HLA-DR	inaktiv	18	239,0	1241,0	406,8	61,2	259,8
	aktiv	14	243,0	1376,0	475,6	80,0	299,3

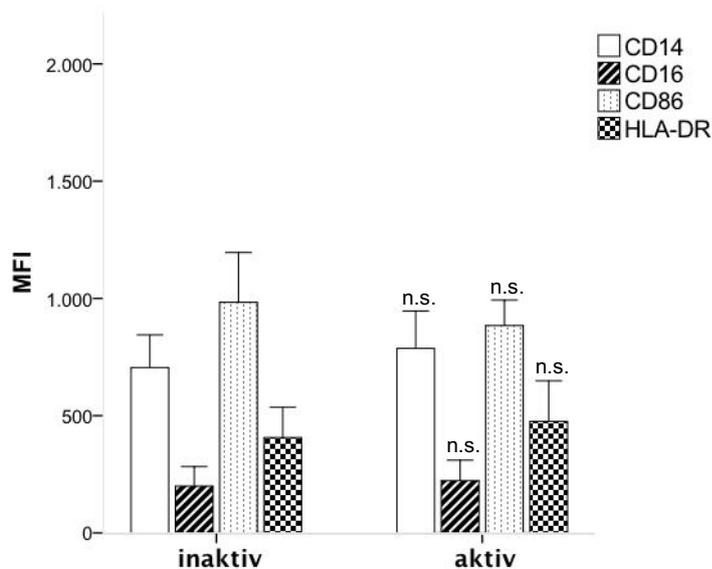


Abbildung 21: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) von PMNs bei inaktiven und aktiven Vaskulitiden

4.5.3 Kontrollgruppe versus SIRS/Sepsis-Gruppe

4.5.3.1 Anteile von Rezeptor-positiven PMNs

Der Vergleich der PMNs der Kontrollgruppe mit den PMNs der SIRS/Sepsis-Gruppe zeigte folgende Resultate: Der Anteil der CD14-positiven PMNs war in der SIRS/Sepsis-Gruppe signifikant höher ($48,4\% \pm 1,6\%$) verglichen mit der Kontrollgruppe ($42,6\% \pm 1,4\%$, * $p \leq 0,05$). Auch der Anteil CD86-positiver PMNs stellte sich in der SIRS/Sepsis-Gruppe signifikant höher ($33,6\% \pm 4,8\%$) als in der Kontrollgruppe ($13,8\% \pm 1,1\%$; *** $p \leq 0,001$) dar. Zudem lag der Anteil HLA-DR-positiver PMNs in der SIRS/Sepsis-Gruppe signifikant höher ($26,0\% \pm 3,6\%$) als in der Kontrollgruppe ($12,2\% \pm 1,2\%$; *** $p \leq 0,001$). Bezüglich der Rezeptoren CD16 und CD177 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der SIRS/Sepsis- und Kontrollgruppe.

Tabelle 29: Anteil Rezeptor-positiver (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) PMNs an der Gesamtpopulation von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe

Rezeptor	Gruppe	N	Min. (%)	Max. (%)	Mittelwert (%)	Standardfehler (%)	Standardabweichung (%)
CD14	Kontrolle	29	20,0	59,7	42,6	1,4	8,0
	SIRS/Sepsis	24	33,3	68,4	48,4*	1,6	7,8
CD16	Kontrolle	29	1,0	83,5	22,1	4,2	22,7
	SIRS/Sepsis	24	3,2	42,1	14,0	2,3	11,1
CD86	Kontrolle	29	4,7	28,6	13,8	1,1	5,9
	SIRS/Sepsis	24	2,6	95,2	33,6***	4,8	23,6
CD177	Kontrolle	29	0,0	89,1	48,4	4,9	26,2
	SIRS/Sepsis	24	0,3	98,4	56,5	6,7	32,6
HLA-DR	Kontrolle	29	4,8	32,4	12,2	1,2	6,3
	SIRS/Sepsis	24	8,7	84,7	26,0***	3,6	17,5

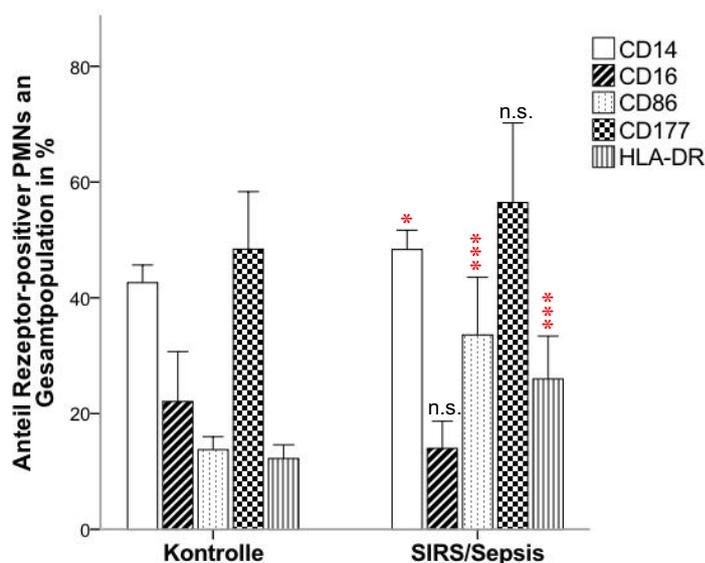


Abbildung 22: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) PMNs an ihrer Gesamtpopulation von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe

4.5.3.2 MFI

Im Vergleich der MFI von PMNs der Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe zeigte sich CD14 in der SIRS/Sepsis-Gruppe signifikant stärker exprimiert ($799,5 \pm 60,3$) als in der Kontrollgruppe ($633,2 \pm 28,4$; $*p \leq 0,05$). Die Expression von CD86 lag auf PMNs der SIRS/Sepsis-Gruppe signifikant höher ($1417,9 \pm 288,4$) als auf PMNs der Kontrollgruppe ($825,9 \pm 17,9$; $***p \leq 0,001$). Ebenso war die Expression von HLA-DR auf PMNs der

SIRS/Sepsis-Gruppe signifikant erhöht ($517,3 \pm 126,5$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($294,6 \pm 11,3$; $***p \leq 0,001$). Signifikante Unterschiede konnten bezüglich CD16 nicht gezeigt werden.

Tabelle 30: MFI der PMNs von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe nach Rezeptoren

Rezeptor	Gruppe	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standard- fehler	Standard- abweichung
CD14	Kontrolle	29	327,0	1081,0	633,2	28,4	152,3
	SIRS/Sepsis	24	447,0	1624,0	799,5*	60,3	295,4
CD16	Kontrolle	29	31,9	672,0	183,5	31,2	167,9
	SIRS/Sepsis	24	39,6	768,0	155,1	31,1	152,3
CD86	Kontrolle	29	669,0	1030,0	825,9	17,9	96,5
	SIRS/Sepsis	24	597,0	7488,0	1417,9***	288,4	1412,9
HLA-DR	Kontrolle	29	220,0	495,0	294,6	11,3	61,0
	SIRS/Sepsis	24	229,0	3360,0	517,3**	126,5	620,0

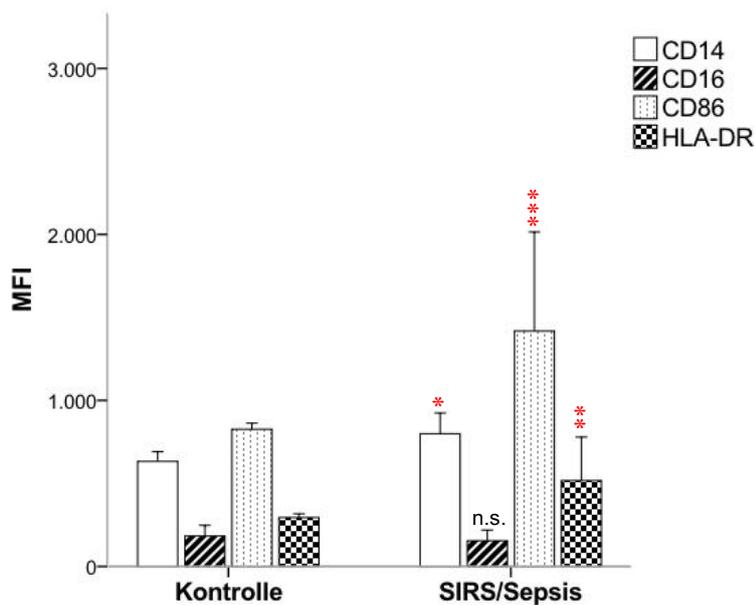


Abbildung 23: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) von PMNs von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe

4.6 Vergleich der Rezeptorexpression von LDGs

Die Rezeptorexpression der LDGs der Kontrollgruppe wurde mit jener der LDGs von Vaskulitis und SIRS/Sepsis-Gruppe verglichen, um zu evaluieren, ob sich LDGs der gesunden Kontrollkohorte von denen der pathologischen Testgruppen Vaskulitis und SIRS/Sepsis unterscheiden bzw. welchen Einfluss die Erkrankung auf die Rezeptorexpression der LDGs hat.

4.6.1 Kontrollgruppe versus Vaskulitis-Gruppe

4.6.1.1 Anteile von Rezeptor-positiven LDGs

Der Vergleich der Anteile Rezeptor-positiver LDGs zwischen Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe ergab einen signifikanten Unterschied bezüglich CD14, der Anteil CD14-positiver LDGs ist in der Vaskulitis-Gruppe geringfügig, aber signifikant erhöht ($52,0\% \pm 2,0\%$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($49,4\% \pm 2,3\%$; $*p \leq 0,05$).

Im Trend lässt sich zudem erkennen, dass der Anteil von CD177-positiven LDGs in der Vaskulitis-Gruppe größer ist ($51,4\% \pm 4,1\%$) als in der Kontrollgruppe ($40,3\% \pm 4,3\%$), dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Tabelle 31: Anteil Rezeptor-positiver (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) LDGs an der Gesamtpopulation von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe

Rezeptor	Gruppe	N	Min. (%)	Max. (%)	Mittelwert (%)	Standardfehler (%)	Standardabweichung (%)
CD14	Kontrolle	29	28,6	80,5	49,4	2,3	12,5
	Vaskulitis	32	9,4	73,4	52,0*	2,0	11,3
CD16	Kontrolle	29	0,0	93,2	26,4	4,3	23,3
	Vaskulitis	32	0,0	80,4	22,1	3,4	19,5
CD86	Kontrolle	29	0,0	67,9	24,4	2,6	14,3
	Vaskulitis	32	8,4	75,5	26,6	2,8	16,1
CD177	Kontrolle	29	1,2	74,2	40,3	4,3	23,0
	Vaskulitis	32	0,5	95,0	51,4	4,1	23,3
HLA-DR	Kontrolle	29	1,9	78,2	26,6	3,4	18,4
	Vaskulitis	32	12,7	76,5	32,1	2,8	16,0

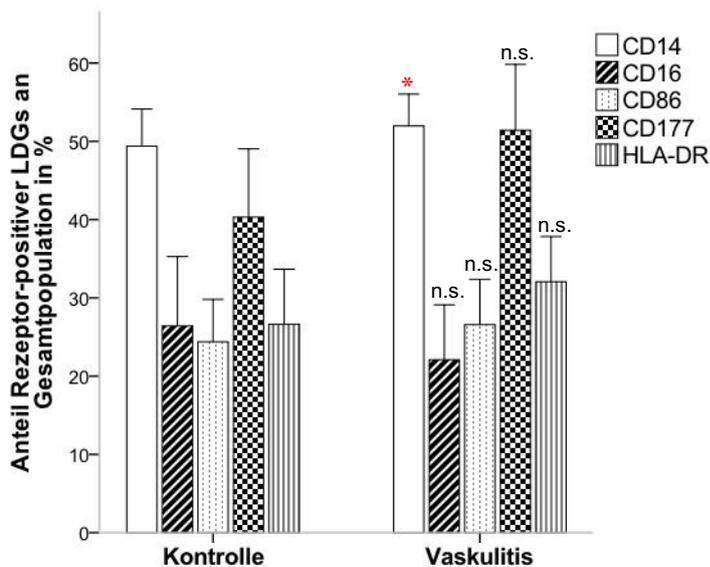


Abbildung 24: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) LDGs an ihrer Gesamtpopulation von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe

4.6.1.2 MFI

Die Expression von CD16 stellt sich auf LDGs der Vaskulitis-Gruppe signifikant geringer dar ($201,3 \pm 32,9$) verglichen mit der Kontrollgruppe ($1019,7 \pm 578,3$; * $p \leq 0,05$). Trotz teils großer Mittelwert-Unterschiede unterscheiden sich CD14, CD86 und HLA-DR in den Testgruppen nicht signifikant, dennoch ist im Trend zu erkennen, dass diese Rezeptoren in der Vaskulitis-Gruppe geringer ausgeprägt sind als in der Kontrollgruppe.

Tabelle 32: MFI der LDGs von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe nach Rezeptoren

Rezeptor	Gruppe	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung
CD14	Kontrolle	29	508,0	7700,0	1734,8	298,7	1608,5
	Vaskulitis	32	354,0	3837,0	1084,7	110,1	623,0
CD16	Kontrolle	29	19,9	16484,0	1019,7*	578,3	3114,3
	Vaskulitis	32	20,9	869,0	201,3	32,9	186,1
CD86	Kontrolle	29	610,0	8245,0	2640,0	488,1	2628,3
	Vaskulitis	32	654,0	2535,0	1258,6	88,1	498,2
HLA-DR	Kontrolle	29	184,0	7689,0	1625,9	398,2	2144,6
	Vaskulitis	32	285,0	1717,0	704,8	71,9	407,0

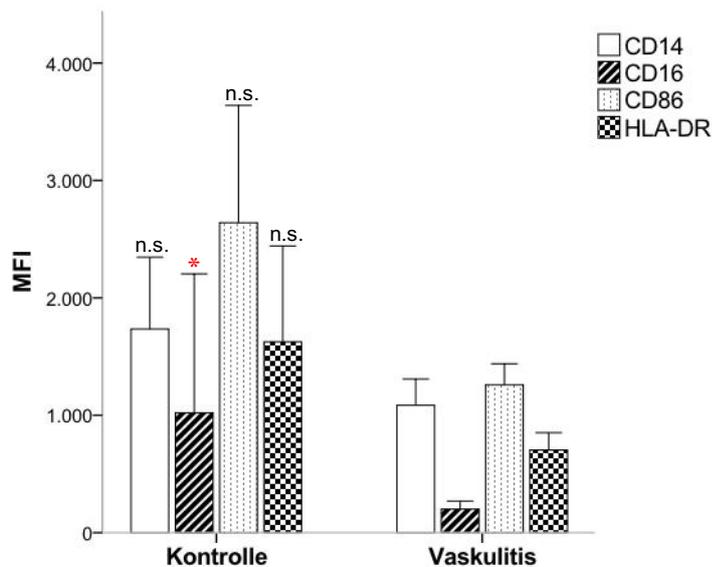


Abbildung 25: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) von LDGs von Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe

4.6.2 Inaktive versus aktive Vaskulitis

4.6.2.1 Anteile von Rezeptor-positiven LDGs

Bezüglich der Anteile Rezeptor-positiver LDGs (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Vaskulitis-Gruppe bezüglich aktivem versus inaktivem Erkrankungsstatus gezeigt werden.

Tabelle 33: Anteil Rezeptor-positiver (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) LDGs an der Gesamtpopulation bei inaktiven und aktiven Vaskulitiden

Rezeptor	Gruppe	N	Min. (%)	Max. (%)	Mittelwert (%)	Standardfehler (%)	Standardabweichung (%)
CD14	inaktiv	18	9,4	73,4	51,2	3,4	14,5
	aktiv	14	38,0	58,8	52,9	1,5	5,4
CD16	inaktiv	18	0,0	80,4	21,3	5,1	21,5
	aktiv	14	2,6	52,2	23,1	4,6	17,4
CD86	inaktiv	18	8,4	75,5	26,5	4,4	18,8
	aktiv	14	9,2	47,7	26,6	3,3	12,4
CD177	inaktiv	18	17,8	95,0	55,4	5,6	23,9
	aktiv	14	0,5	85,8	46,3	6,0	22,4
HLA-DR	inaktiv	18	13,3	76,5	29,8	3,9	16,5
	aktiv	14	12,7	66,3	35,0	4,1	15,3

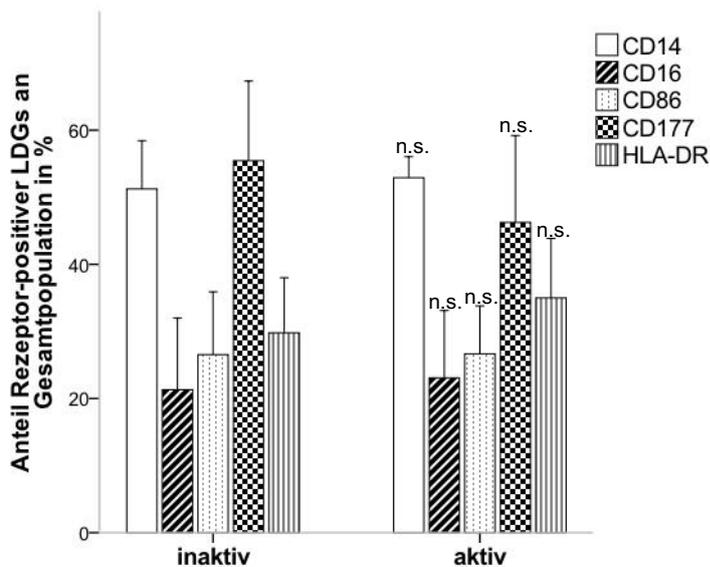


Abbildung 26: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) LDGs an ihrer Gesamtpopulation bei inaktiven und aktiven Vaskulitiden

4.6.2.2 MFI

Innerhalb der Vaskulitis-Gruppe konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen inaktiven und aktiven Vaskulitiden bezüglich der Rezeptorexpression (CD14, CD16, CD86 und HLA-DR) auf LDGs gezeigt werden.

Tabelle 34: MFI von LDGs in inaktiven und aktiven Vaskulitiden nach Rezeptoren

Rezeptor	Aktivität Vaskulitis	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung
CD14	inaktiv	18	354,0	2317,0	1015,6	109,1	462,9
	aktiv	14	555,0	3837,0	1173,5	212,1	793,8
CD16	inaktiv	18	20,9	601,0	169,5	35,7	151,4
	aktiv	14	26,6	869,0	242,1	59,4	222,3
CD86	inaktiv	18	685,0	2535,0	1193,3	109,9	466,3
	aktiv	14	654,0	2257,0	1342,5	145,0	542,4
HLA-DR	inaktiv	18	285,0	1307,0	615,8	78,8	334,2
	aktiv	14	326,0	1717,0	819,1	126,5	473,2

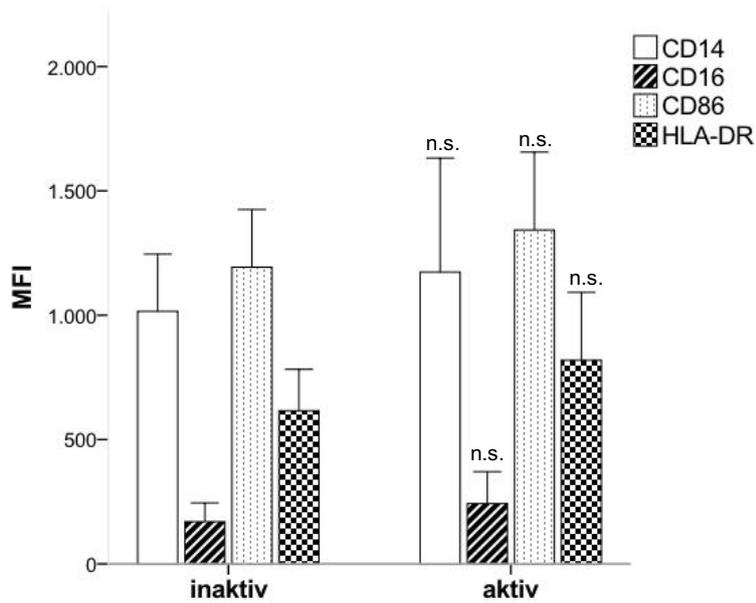


Abbildung 27: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) von LDGs bei inaktiven und aktiven Vaskulitiden

4.6.3 Kontrollgruppe versus SIRS/Sepsis-Gruppe

4.6.3.1 Anteile von Rezeptor-positiven LDGs

Der Vergleich der LDGs von Kontrollgruppe und SIRS/Sepsis-Gruppe zeigte, dass der Anteil CD16-positiver LDGs in der SIRS/Sepsis-Gruppe signifikant niedriger ($12,2\% \pm 2,1\%$) war als in der Kontrollgruppe ($26,4\% \pm 4,3\%$; $*p \leq 0,05$). Der Anteil CD86-positiver LDGs lag in der SIRS/Sepsis-Gruppe ($39,4\% \pm 4,0\%$) hingegen signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($24,4\% \pm 2,6\%$; $** p \leq 0,01$).

Tabelle 35: Anteil Rezeptor-positiver (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) LDGs an der Gesamtpopulation von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe

Rezeptor	Gruppe	N	Min. (%)	Max. (%)	Mittelwert (%)	Standardfehler (%)	Standardabweichung (%)
CD14	Kontrolle	29	28,6	80,5	49,4	2,3	12,5
	SIRS/Sepsis	24	21,2	81,6	51,9	2,4	11,6
CD16	Kontrolle	29	0,0	93,2	26,4*	4,3	23,3
	SIRS/Sepsis	24	3,4	45,8	12,2	2,1	10,4
CD86	Kontrolle	29	0,0	67,9	24,4	2,6	14,3
	SIRS/Sepsis	24	7,0	95,8	39,4**	4,0	19,8
CD177	Kontrolle	29	1,2	74,2	40,3	4,3	23,0
	SIRS/Sepsis	24	0,0	98,2	47,7	6,5	31,6
HLA-DR	Kontrolle	29	1,9	78,2	26,6	3,4	18,4
	SIRS/Sepsis	24	13,9	75,3	31,0	3,6	17,7

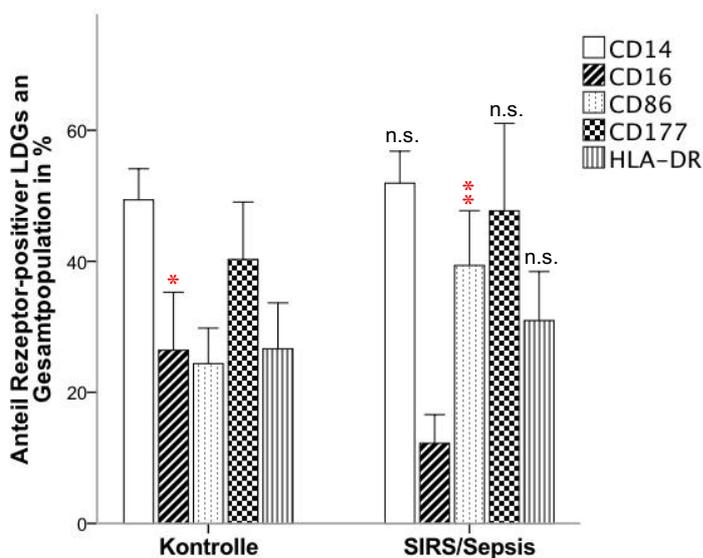


Abbildung 28: Anteil von Rezeptor-positiven (CD14, CD16, CD86, CD177, HLA-DR) LDGs an ihrer Gesamtpopulation von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe

4.6.3.2 MFI

Die Stärke der Rezeptorexpression von CD16 zeigte sich auf LDGs der SIRS/Sepsis-Gruppe signifikant niedriger ($196,8 \pm 70,2$) als auf LDGs der Kontrollgruppe ($1019,7 \pm 578,3$; ** $p \leq 0,01$). Darüber hinaus konnten keine signifikanten Unterschiede in der Rezeptorexpression gezeigt werden.

Tabelle 36: MFI der LDGs von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe nach Rezeptoren

Rezeptor	Gruppe	N	Min.	Max.	Mittelwert	Standardfehler	Standardabweichung
CD14	Kontrolle	29	508,0	7700,0	1734,8	298,7	1608,5
	SIRS/Sepsis	24	480,0	9774,0	1424,8	393,2	1926,2
CD16	Kontrolle	29	19,9	16484,0	1019,7**	578,3	3114,3
	SIRS/Sepsis	24	27,7	1621,0	196,8	70,2	344,1
CD86	Kontrolle	29	610,0	8245,0	2640,0	488,1	2628,3
	SIRS/Sepsis	24	734,0	15654,0	2160,4	624,3	3058,3
HLA-DR	Kontrolle	29	184,0	7689,0	1625,9	398,2	2144,6
	SIRS/Sepsis	24	266,0	11258,0	1202,6	460,2	2254,6

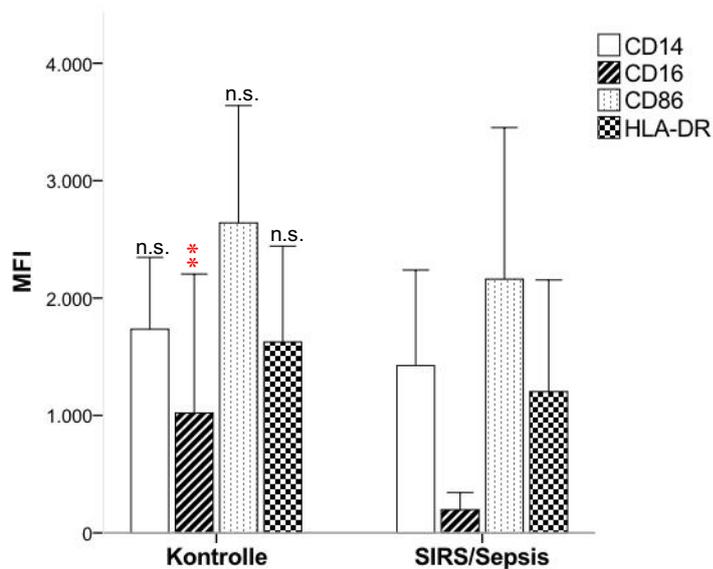


Abbildung 29: Mittlere Fluoreszenzintensität verschiedener Rezeptoren (CD14, CD16, CD86, HLA-DR) von LDGs von Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe

4.7 Übersicht der Rezeptorexpressionen



Abbildung 30: Schematischer Vergleich des Oberflächenprofils von PMNs und LDGs in Kontroll- und Vaskulitisgruppe

Die Veränderungen (↑,↓) beziehen sich auf den Anteil Rezeptor-positiver Zellen

Veränderungen der MFI sind mit * markiert

Kursiv dargestellt ist die Veränderung des gesamten LDG-Anteils

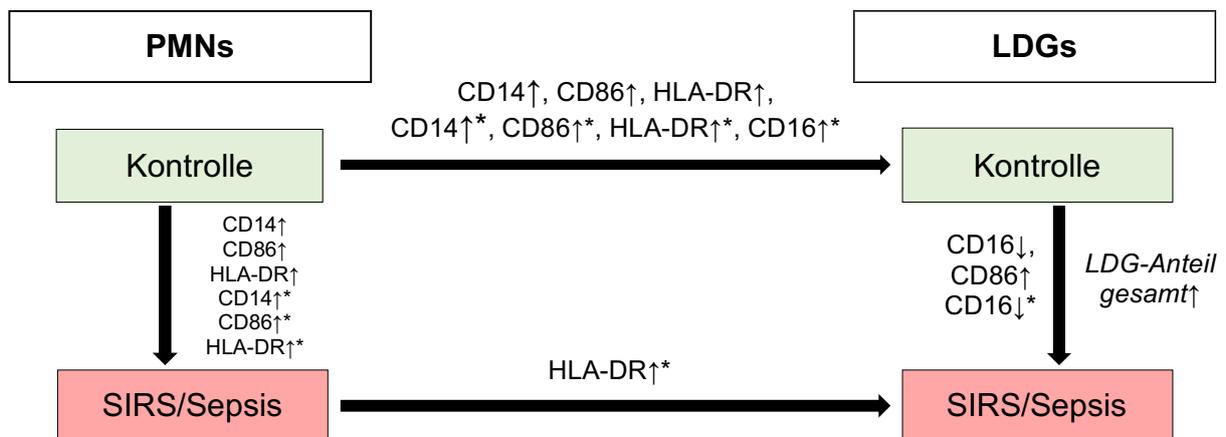


Abbildung 31: Schematischer Vergleich des Oberflächenprofils von PMNs und LDGs in Kontroll- und SIRS/Sepsis-Gruppe

4.8 Korrelationen zwischen Rezeptorexpression und klinischen Parametern

Um zu evaluieren, ob die Höhe des Anteils bestimmter Rezeptor-positiver PMNs und LDGs oder die MFI bestimmter Oberflächenrezeptoren auf PMNs und LDGs mit Veränderungen der erfassten klinischen Parameter einhergeht, wurden statistische Korrelationen berechnet. Hierfür wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r) gebildet um positive und negative lineare Zusammenhänge darzustellen.

Dabei wurde $r = 0,10$ als schwacher Effekt, $r = 0,30$ als mittlerer Effekt und $r = 0,50$ starker Effekt definiert, die Einteilung erfolgte analog zur Einteilung nach Cohen (1992). (82)

Die Berechnungen ergaben eine Reihe von Korrelationen, welche detailliert in den Tabellen 37 bis 40 dargestellt sind. Für die nachfolgend dargestellten Betrachtungen wurden als PMNs bzw. LDGs Zellen definiert, die ein typisches FSC- und SSC-Streuverhalten aufwiesen und zudem CD66b positiv waren.

Es wurden Korrelationen zwischen Anteilen Rezeptor-positiver Zellen bzw. MFI und klinischen Parametern berechnet.

4.8.1 Vaskulitis-Gruppe

4.8.1.1 PMN

Im Folgenden sind die relevantesten Korrelate hinsichtlich PMNs dargestellt: Es zeigte sich eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Anteil CD16-positiver PMNs und den pANCA (MPO) in U/ml ($r = -,759$; $p \leq 0,05$; $n = 7$), d.h. je höher der Anteil der CD14-positiven PMNs an der Gesamtpopulation der PMNs, desto niedriger war der pANCA - Wert.

Der Anteil CD86-positiver PMNs korreliert hingegen signifikant positiv mit der Anzahl der Leukozyten pro nl ($r = ,424$; $p \leq 0,05$; $n = 24$), je höher prozentuale Anteil CD86-positiver PMNs war, desto größer war auch die Menge von Leukozyten/nl im Blut, ein mittlerer Effekt.

Ebenso verhält es sich mit dem Anteil HLA-DR-positiver PMNs, auch diese korrelieren signifikant positiv mit der Anzahl der Leukozyten/nl ($r = ,414$; $p \leq 0,05$; $n = 24$), hierbei wurde ein mittlerer Effekt gemessen.

Zwischen der MFI von CD14, CD16, CD86 und HLA-DR auf PMNs der Vaskulitis-Gruppe und klinischen Parametern dieser Gruppe konnten folgende Korrelate gezeigt werden: Die MFI von CD16 korreliert signifikant negativ mit der Höhe der im Blut gemessenen

pANCA (MPO) $r=-,773$, $p\leq 0,05$; $n=7$), nach Cohen ergibt dies einen starken Effekt. Darüber hinaus korrelieren sowohl die MFI von CD86 ($r=,706$, $p\leq 0,01$; $n=24$), als auch die MFI von HLA-DR ($r=,526$, $p\leq 0,01$; $n=24$) signifikant positiv mit der Anzahl der Leukozyten/nl im Blut der Testpersonen, für beide Korrelationen wurde eine starke Effektstärke berechnet.

4.8.1.2 LDGs

Im Folgenden sind die relevantesten Korrelate hinsichtlich LDGs dargestellt: Der Anteil CD86-positiver LDGs korreliert signifikant positiv mit der Anzahl der Leukozyten pro nl ($r=,628$; $p\leq 0,01$; $n=24$), je höher prozentuale Anteil CD86-positiver LDGs war, desto größer war auch die Menge von Leukozyten/nl im Blut (starker Effekt). Auch der Anteil der HLA-DR-positiven LDGs korreliert signifikant positiv mit der Anzahl der Leukozyten/nl im Blut ($r=,565$; $p\leq 0,01$; $n=25$), auch hierbei handelt es sich um einen starken Effekt.

Die Fraktion CD177-positiver LDGs korreliert signifikant negativ mit dem C-reaktiven Protein im Serum ($r=-,420$; $p\leq 0,05$; $n=24$). Dieser mittlere Effekt beschreibt, dass die Fraktion CD177-positiver Zellen umso größer war, desto kleiner die CRP-Werte im Serum waren.

Für die Stärke der Rezeptorexpression ergaben sich folgende Korrelationen: Die MFI von CD14 korreliert signifikant positiv ($r=,488$; $p\leq 0,05$; $n=25$, mittlerer Effekt), die MFI von CD16 ($r=,506$; $p\leq 0,01$; $n=25$, starker Effekt) ebenfalls signifikant positiv mit dem Harnstoff (mg/dl) im Blut der Probandinnen und Probanden.

Die Expressionsstärke von CD14 korreliert ebenso signifikant positiv mit cANCA (PR3) (U/ml) im Blut der Testkohorte ($r=,451$; $p\leq 0,05$; $n=22$) und die Korrelation stellt einen mittleren Effekt dar.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass sowohl CD14 signifikant ($r=,431$; $p\leq 0,05$; $n=24$), als auch CD86 signifikant ($r=,631$; $p\leq 0,01$; $n=24$) mit den gemessenen Leukozyten/nl im Blut korrelieren. Für die MFI von CD14 bedeutet dies eine mittlere, für CD86 eine starke Korrelation mit den Leukozyten/nl im Blut. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten von CD16 und HLA-DR korrelieren jeweils signifikant positiv mit dem erhobenen BVAS, der Zusammenhang mit CD16 zeigt eine mittlere ($r=,403$; $p\leq 0,05$; $n=26$) Effektstärke, auch der Zusammenhang mit HLA-DR zeigt eine mittlere ($r=,391$; $p\leq 0,05$; $n=26$) Effektstärke nach Cohen. Ein erhöhter BVAS ging also mit einer höheren MFI von CD16 und HLA-DR auf LDGs in dieser Gruppe einher.

Eine weitere Korrelation stellt der negative Zusammenhang zwischen der Expression von CD16 auf LDGs und der GFR (ml/min) der Vaskulitis-Gruppe dar ($r=-,455$; $p\leq 0,05$; $n=25$), dies stellt einen mittleren Effekt dar.

Tabelle 37: Korrelationen zwischen Rezeptorexpression der PMN -Population und klinischen Parametern in der Vaskulitis-Gruppe

Dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten nach Pearson,

+ gibt einen positiven linearen Zusammenhang an, - gibt einen negativen linearen Zusammenhang an

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (signifikant), ** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (sehr signifikant).

¹ als PMNs wurden nur CD66b-positiven PMNs gewertet

	PMNs	PMNs (CD66b ⁺)	MFI				Anteil Rezeptor-positiver PMN ¹ an der Gesamtpopulation				
			CD14	CD16	CD86	HLA-DR	CD14	CD16	CD86	CD177	HLA-DR
Geschlecht (n=32)	r -0,092	-0,025	-0,095	-0,175	0,211	0,040	-0,076	-0,145	0,182	-0,061	0,139
Alter (n=32)	r ,386*	-0,154	-0,020	0,131	-0,150	-0,077	0,066	0,179	0,014	0,236	0,053
BVAS (n=26)	r -0,095	0,238	0,291	0,332	-0,036	0,306	0,118	0,292	0,051	0,195	-0,019
CRP in mg/dl(n=24)	r 0,078	0,098	-0,146	0,213	-0,086	-0,072	-0,034	0,219	-0,136	-0,394	-0,067
Kreatinin in mg/dl (n=25)	r 0,004	0,149	0,260	0,289	-0,009	0,282	0,141	0,257	0,046	0,096	0,097
eGFR in ml/min (n=25)	r 0,001	-0,062	-0,192	-0,301	0,035	-0,219	-0,085	-0,290	-0,008	-0,120	-0,070
Harnstoff in mg/dl (n=25)	r -0,040	0,110	0,306	0,259	0,127	0,394	0,150	0,235	0,196	0,066	0,075
cANCA (PR3) in U/ml (n=22)	r 0,191	0,245	0,223	0,126	-0,075	0,191	0,241	0,089	0,144	0,123	-0,149
pANCA (MPO) in U/ml (n=7)	r -0,040	-0,031	0,282	-,773*	-0,216	-0,235	0,463	-,759*	-0,118	0,141	0,314
Leukozyten/nl (n=24)	r -,639**	-0,079	0,342	0,138	,706**	,526**	0,078	0,036	,424*	0,108	,414*
Zustand (n=32)	r -0,016	0,209	0,151	0,073	-0,146	0,126	0,152	0,079	-0,057	-0,136	0,088
Prednisolontherapie (n=26)	r -0,247	0,261	0,349	0,264	0,139	0,325	0,182	0,211	0,016	0,202	-0,026

Tabelle 38: Korrelationen zwischen Rezeptorexpression der LDG-Population und klinischen Parametern in der Vaskulitis-Gruppe

Dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten nach Pearson,

+ gibt einen positiven linearen Zusammenhang an, - gibt einen negativen linearen Zusammenhang an

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (signifikant), ** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (sehr signifikant).

¹ als LDGs wurden nur CD66b-positiven LDGs gewertet

		LDGs	LDGs (CD66b ⁺)	MFI				Anteil Rezeptor-positiver LDGs ¹ an der Gesamtpopulation				
				CD14	CD16	CD86	HLA- DR	CD14	CD16	CD86	CD177	HLA-DR
Geschlecht (n=32)	r	-0,276	-0,205	-0,005	-0,096	0,110	0,074	0,026	-0,043	0,200	0,028	0,206
Alter (n=32)	r	-0,127	0,004	0,142	0,276	0,133	0,146	0,044	0,148	-0,062	0,014	0,136
BVAS (n=26)	r	0,306	0,204	0,355	,403*	0,251	,391*	0,155	0,231	0,073	0,175	0,151
CRP in mg/dl (n=24)	r	0,217	0,082	-0,071	0,030	-0,088	-0,156	0,088	0,056	0,063	-,420*	0,173
Kreatinin in mg/dl (n=25)	r	0,246	0,257	0,295	0,389	-0,040	0,152	0,045	0,224	-0,032	0,053	0,281
eGFR in ml/min (n=25)	r	-0,264	-0,218	-0,253	-,455*	0,016	-0,162	-0,030	-0,379	0,105	-0,085	-0,217
Harnstoff in mg/dl (n=25)	r	0,103	0,237	,488*	,506**	0,100	0,165	0,102	0,239	0,133	-0,007	0,303
cANCA (PR3) in U/ml (n=22)	r	-0,259	0,233	,451*	0,233	0,039	0,237	0,159	-0,070	0,141	0,019	0,123
pANCA (MPO) in U/ml (n=7)	r	0,668	0,559	-0,424	-0,608	-0,424	-0,282	-0,244	-0,686	-0,342	0,291	-0,392
Leukozyten/nl (n=24)	r	-0,200	-0,039	,431*	0,078	,631**	0,286	0,301	0,052	,628**	0,085	,565**
Zustand (n=32)	r	,375*	0,163	0,128	0,197	0,151	0,252	0,074	0,046	0,002	-0,199	0,164
Prednisolontherapie (n=26)	r	-0,001	0,163	0,300	0,282	0,369	,513**	0,133	0,131	0,136	0,184	0,165

4.8.2 SIRS/Sepsis-Gruppe

4.8.2.1 PMNs

In der SIRS/Sepsis-Gruppe zeigten sich bezüglich der PMNs folgende Korrelate:

Zwischen dem Anteil der gemessenen CD66b-positiven PMNs an der Gesamtpopulation der PMNs und dem ermittelten C-reaktiven Protein (CRP) im Serum liegt eine signifikant negative Korrelation vor ($r=-,520$; $p\leq 0,05$; $n=20$), dabei handelt es sich um einen starken Effekt.

Ebenso korreliert der Anteil der PMNs an der Gesamtpopulation signifikant negativ mit dem SAPS 2 ($r=-,465$; $p\leq 0,05$; $n=22$), dies stellt einen mittleren Effekt dar.

Darüber hinaus wurden Korrelationen zwischen dem Anteil der CD14-, CD16-, CD86-, CD177- und HLA-DR-positiven PMNs an der Gesamtpopulation bzw. der MFI dieser Rezeptoren auf den PMNs und klinischen Parametern berechnet.

Es ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Anteil CD16-positiver PMNs und dem weiblichen Geschlecht der untersuchten Personen ($r=-,523$ $p\leq 0,01$; $n=24$), es konnte ein starker Effekt gezeigt werden.

Der Anteil CD86-positiver PMNs korreliert signifikant positiv mit dem SOFA ($r=,496$; $p\leq 0,05$; $n=22$), dabei liegt ein mittlerer Effekt vor.

Die Fraktion CD86-positiver PMNs korreliert darüber hinaus mit drei weiteren klinischen Scores und zwar signifikant positiv mit dem TISS-28 ($r=,591$; $p\leq 0,01$; $n=22$), APACHE 2 ($r=,564$; $p\leq 0,01$; $n=22$) und SAPS 2 ($r=,619$; $p\leq 0,01$; $n=22$), es zeigen somit in allen drei Korrelationen starke Effekte.

Der Anteil CD177-positiver PMNs korreliert signifikant positiv mit dem Harnstoff im Serum ($r=,417$; $p\leq 0,05$; $n=23$), es handelt sich hierbei um einen mittleren Effekt.

Die Fraktion HLA-DR-positiver PMNs korreliert signifikant positiv mit dem C-reaktiven Protein (CRP) im Serum ($r=,538$; $p\leq 0,05$; $n=20$), nach Cohen liegt somit ein starker Effekt vor.

Die Rezeptorexpression von CD16 auf PMNs korreliert signifikant mit dem weiblichen Geschlecht ($r=-,426$; $p\leq 0,05$; $n=24$), dies stellt eine mittlere Effektstärke dar. CD14 ($r=,531$; $p\leq 0,05$; $n=20$) und CD86 ($r=,504$; $p\leq 0,05$; $n=20$) korrelieren signifikant, CD16 ($r=,581$; $p\leq 0,01$; $n=20$) und HLA-DR ($r=,574$; $p\leq 0,01$; $n=20$) sehr signifikant positiv mit dem CRP (mg/dl) im Blut, alle dieser Korrelationen zeigen einen starken Effekt nach Cohen. Die Stärke der Expression von CD86 korreliert signifikant positiv mit dem APACHE 2 Score ($r=,464$; $p\leq 0,05$; $n=22$) und mit dem SAPS 2 ($r=,463$; $p\leq 0,05$; $n=22$),

d.h. je höher die gemessenen Scores waren, desto höher war auch die Ausprägung von CD86. Beide Zusammenhänge besitzen eine mittlere Effektstärke.

Die MFI von CD86 auf PMNs korreliert signifikant positiv mit dem pCO₂ im Blut ($r=,481$; $p\leq 0,05$; $n=23$), dies stellt einen mittleren Effekt dar.

4.8.2.2 LDGs

Für die LDGs der SIRS/Sepsis-Gruppe ergaben sich diese Korrelate: Der Anteil der CD66b-positiven LDGs an der gesamten Zellpopulation korreliert signifikant negativ mit der Höhe des CRP ($r=-,603$; $p\leq 0,01$; $n=20$; starker Effekt) und signifikant negativ mit dem APACHE 2 ($r=-,443$; $p\leq 0,05$; $n=22$; mittlerer Effekt). Das heißt, je größer der Anteil CD66b-positiver LDGs war, desto kleiner waren die Werte für CRP und APACHE 2-Score. Zudem korreliert der Anteil der LDGs signifikant negativ mit der Mortalität der Probandinnen und Probanden in der SIRS/Sepsis-Gruppe ($r= -,419$; $p\leq 0,05$; $n=24$; mittlerer Effekt). Ein höherer LDG-Anteil spricht somit eher gegen einen letalen Krankheitsverlauf.

Folgenden Korrelationen zwischen den Fraktionen der CD14-, CD16-, CD86-, CD177- und HLA-DR-positiven LDGs an der Gesamtpopulation der LDGs und klinischen Parametern zeigten relevante Ergebnisse:

Die Fraktion CD86-positiver LDGs korreliert signifikant positiv mit folgenden Scores: APACHE 2 ($r=,486$; $p\leq 0,05$; $n=22$) und SAPS 2 ($r=,465$; $p\leq 0,05$; $n=22$), beide Korrelationskoeffizienten stellen einen mittleren Effekt dar.

Außerdem zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Anteil HLA-DR-positiver LDGs und dem Alter der Patient*innen ($r=,489$; $p\leq 0,05$; $n=24$), je höher also der Anteil HLA-DR-positiver LDGs war, desto älter waren die Probandinnen und Probanden, nach Cohen liegt ein mittlerer Effekt vor.

Die Fraktion HLA-DR-positiver LDGs korreliert ebenfalls signifikant positiv mit dem CRP im Serum ($r=,448$; $p\leq 0,05$; $n=20$; mittlerer Effekt) und signifikant positiv mit der Anzahl der Leukozyten im Blut ($r=,409$; $p\leq 0,05$; $n=24$; mittlerer Effekt), d.h. je höher der Anteil HLA-DR-positiver LDGs gemessen wurde, desto höher wurden auch die Inflammationsparameter CRP in mg/dl und Leukozyten/nl im Blut gemessen.

Die MFI von CD16 korreliert negativ mit der gemessenen Körpertemperatur der Testpersonen ($r=-,503$, $p\leq 0,05$; $n=22$; starker Effekt).

Tabelle 39: Korrelationen zwischen Rezeptorexpression der PMN -Population und klinischen Parametern in der SIRS/Sepsis-Gruppe

Dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten nach Pearson,

+ gibt einen positiven linearen Zusammenhang an, - gibt einen negativen linearen Zusammenhang an

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (signifikant), ** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (sehr signifikant).

¹ als PMNs wurden nur CD66b-positiven PMNs gewertet

		PMNs	PMNs (CD66b ⁺)	MFI				Anteil Rezeptor-positiver PMN ¹ an der Gesamtpopulation				
				CD14	CD16	CD86	HLA-DR	CD14	CD16	CD86	CD177	HLA-DR
Geschlecht (n=24)	r	0,248	-0,199	-0,025	-,426*	-0,047	-0,328	-0,019	-,523**	-0,385	0,188	-0,320
Alter in Jahren (n=24)	r	-0,074	-0,016	-0,127	0,101	0,136	0,096	-0,060	0,266	0,296	-0,003	0,281
CRP in mg/l (n=20)	r	-0,436	-,520*	,531*	,581**	,504*	,574**	0,004	0,224	0,418	0,137	,538*
Kreatinin in mg/dl (n=23)	r	0,318	0,050	-0,039	-0,084	-0,073	-0,248	0,086	0,119	0,239	0,118	-0,359
GFR in ml/min (n=23)	r	-0,223	0,017	0,019	0,006	-0,010	0,181	-0,082	-0,226	-0,374	0,089	0,193
Harnstoff in mg/dl (n=23)	r	0,060	-0,341	0,028	-0,098	0,233	-0,141	-0,050	-0,010	0,408	,417*	-0,131
Leukozyten/nl (n=24)	r	0,019	0,039	-0,326	-0,254	-0,008	-0,220	-0,314	0,010	-0,026	-0,138	0,027
SOFA (n=22)	r	-0,099	-0,408	0,384	0,085	0,354	0,098	0,298	-0,056	,496*	0,010	0,117
TISS-28 (n=22)	r	-0,376	-0,281	0,360	0,239	0,413	0,250	0,285	0,122	,591**	-0,349	0,369
APACHE 2 (n=22)	r	-0,342	-0,374	0,362	0,288	,464*	0,396	0,092	0,032	,564**	0,076	0,417
SAPS 2 (n=22)	r	-0,286	-,465*	0,342	0,250	,463*	0,299	0,111	0,105	,619**	0,165	0,346
Vasopressoren ? (n=24)	r	-0,035	-0,324	0,317	0,208	0,246	0,177	0,228	0,134	0,311	0,020	0,228
Körpertemperatur (n=22)	r	-0,189	-0,161	0,173	0,159	0,115	0,213	0,033	-0,029	0,082	0,085	0,204
Herzfrequenz (n=23)	r	-0,017	-0,147	0,186	-0,109	0,154	0,046	0,239	-0,171	-0,005	-0,056	0,152
Atemfrequenz (n=23)	r	0,011	0,395	-0,322	0,000	-0,344	0,073	-0,161	-0,030	-0,254	-0,017	-0,028
pCO2 (n=23)	r	-0,281	-0,402	0,280	0,023	,481*	-0,048	0,287	0,170	0,309	-0,148	0,244
RR systolisch (n=23)	r	0,158	0,283	-0,323	-0,189	-0,299	-0,157	-0,260	-0,060	-0,377	0,294	-0,028
RR diastolisch (n=23)	r	0,152	0,188	-0,179	-0,131	-0,214	-0,059	-0,139	-0,144	-0,399	0,347	0,051
verstorben? (n=24)	r	-0,341	-0,393	0,310	0,105	0,399	0,271	0,241	-0,150	0,306	0,181	0,122

Tabelle 40: Korrelationen zwischen Rezeptorexpression der LDG -Population und klinischen Parametern in der SIRS/Sepsis-Gruppe
Dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten nach Pearson,
+ gibt einen positiven linearen Zusammenhang an, - gibt einen negativen linearen Zusammenhang an
* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant (signifikant), ** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (sehr signifikant).
¹ als LDGs wurden nur CD66b-positiven LDGs gewertet

	LDGs	LDGs (CD66b ⁺)	MFI				Anteil Rezeptor-positiver LDGs ¹ an der Gesamtpopulation					
			CD14	CD16	CD86	HLA-DR	CD14	CD16	CD86	CD177	HLA-DR	
Geschlecht (n=24)	r	0,024	-0,086	0,219	0,181	0,161	0,066	0,283	-0,056	-0,061	0,042	0,047
Alter in Jahren(n=24)	r	0,222	0,079	0,034	-0,046	0,179	0,167	0,057	0,212	0,293	0,050	,489*
CRP in mg/l (n=20)	r	0,332	-,603**	-0,186	-0,386	0,182	0,111	-0,257	-0,211	0,404	0,247	,448*
Kreatinin in mg/dl (n=23)	r	0,065	0,255	-0,109	-0,116	-0,090	-0,144	-0,011	0,005	0,208	-0,159	-0,192
eGFR in ml/min (n=23)	r	-0,167	-0,222	0,073	0,110	-0,015	0,024	-0,041	-0,020	-0,339	0,273	-0,074
Harnstoff in mg/dl (n=23)	r	,496*	-0,083	-0,132	-0,231	-0,056	-0,189	-0,020	-0,049	,435*	0,127	0,181
Leukozyten/nl (n=24)	r	0,258	0,106	-0,182	-0,211	-0,089	-0,095	0,110	0,057	0,008	-0,301	,409*
SOFA (n=22)	r	0,089	-0,353	-0,105	-0,173	-0,038	-0,150	-0,133	-0,375	0,410	-0,008	0,144
TISS-28 (n=22)	r	0,060	-0,342	-0,267	-0,282	-0,174	-0,247	-0,219	-0,303	0,395	-0,316	0,162
APACHE 2 (n=22)	r	0,242	-,443*	-0,220	-0,287	-0,110	-0,173	-0,288	-0,321	,486*	0,090	0,308
SAPS 2 (n=22)	r	0,230	-0,403	-0,213	-0,290	-0,111	-0,202	-0,285	-0,319	,465*	0,199	0,234
Vasopressoren ? (n=24)	r	0,094	-0,252	0,199	0,180	0,234	0,185	-0,008	-0,189	0,392	0,146	0,235
Körpertemperatur (n=22)	r	0,334	-0,166	-0,399	-,503*	-0,253	-0,264	-0,161	-0,149	0,062	0,101	0,105
Herzfrequenz (n=23)	r	0,176	-0,065	-0,199	-0,302	-0,128	-0,170	0,069	-0,087	-0,048	-0,014	0,110
Atemfrequenz (n=23)	r	-0,082	0,367	-0,302	-0,317	-0,242	-0,110	-0,114	0,053	-0,239	0,064	-0,114
pCO2 (n=23)	r	0,207	-,438*	-0,017	-0,083	0,059	-0,116	0,278	0,211	0,217	-0,145	0,303
RR systolisch(n=23)	r	0,062	0,193	-0,084	-0,072	-0,101	-0,043	0,045	0,235	-0,355	0,274	0,123
RR diastolisch (n=23)	r	-0,098	0,097	0,015	0,095	-0,070	-0,030	0,018	0,264	-0,409	0,399	-0,109
verstorben? (n=24)	r	-0,167	-,419*	0,039	0,000	0,039	-0,046	-0,082	-0,215	0,298	0,230	-0,098

4.9 Stimulation von LDGs

Die folgenden Ausführungen beleuchten die Ergebnisse der in vitro-Stimulation von Vollblut gesunder Probandinnen und Probanden. Ziel dieser Untersuchungen ist es, zu verstehen, ob eine ex vivo Stimulation zu einer Bildung von LDG führen kann. Hierfür wurden die verschiedenen Stimulationsmethoden untereinander und mit der Kontrolle verglichen.

Es konnten folgende signifikante Gruppenunterschiede gezeigt werden: Im mit TNF α -stimulierten Vollblut konnte ein signifikant höherer LDG-Anteil (31,8% \pm 6,6%) als in der nicht stimulierten Kontrolle (3,4% \pm 1,4%) nachgewiesen werden (* $p \leq 0,05$). Auch mit TNF α und α PR3 monoklonalen Antikörpern (mAb) kostimuliertes Vollblut zeigte in der Analyse einen signifikant höheren LDG-Anteil (32,4% \pm 4,7%) als die unstimulierte Kontrolle (3,4% \pm 1,4%; $p \leq 0,05$). Dieser Effekt konnte auch für mit TNF α und α MPO kostimuliertes Vollblut gezeigt werden, das so stimulierte Blut zeigte einen signifikant höheren LDG-Anteil (31,3% \pm 6,1%) im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (3,4% \pm 1,4%; $p \leq 0,05$). Insgesamt zeigt sich, dass die Stimulation mit TNF α den LDG-Anteil signifikant erhöht. Eine zusätzliche Applikation der Antikörper gegen PR3 oder MPO zeigt hingegen keine weitere Erhöhung des LDG-Anteils. Alle anderen Gruppenvergleiche, sowohl der verschiedenen Stimulationsmethoden untereinander als auch mit der unstimulierten Kontrolle, zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 41: Vergleich des Anteils von LDGs an PBMCs in % nach verwendeter Methode

Methode	N	Min. (%)	Max. (%)	Mittelwert (%)	Standardfehler (%)	Standardabweichung (%)
Kontrolle (4°C)	3	1,4	6,0	3,4	1,4	2,4
37°C	4	5,9	17,1	10,8	2,4	4,7
TNF α (4°C)	3	24,4	44,9	31,8*	6,6	11,4
TNF α +PR3 (4°C)	4	19,0	40,6	32,4*	4,7	9,5
TNF α +MPO (4°C)	3	20,8	41,8	31,3*	6,1	10,5

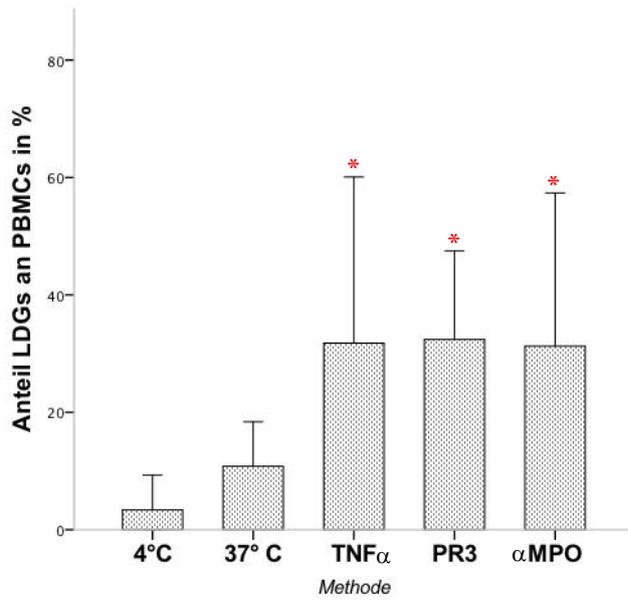


Abbildung 32: LDG-Anteil an PBMCs nach vorangegangener Stimulationsmethode
Gruppenvergleich Kontrolle 4°C vs. 37°C, TNF α , α PR3, α MPO

5. Diskussion

5.1 Vorkommen von LDGs

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine detaillierte Charakterisierung von LDGs in inflammatorischen Erkrankungen vorzunehmen. Hierfür wurden LDGs und PMNs einer gesunden Kohorte mit jenen einer Patientengruppe mit systemischen Vaskulitiden, insbesondere AAV und jenen einer Patientengruppe mit SIRS bzw. Sepsis verglichen. Zusammenfassend zeigte sich eine 5,4-fache Erhöhung des LDG-Anteils bei Patienten mit systemischer Vaskulitis im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Zudem zeigt der Vergleich von inaktiven mit aktiven Vaskulitiden, dass im Trend in aktiven Vaskulitiden ein doppelt so hoher Anteil von LDGs in der PBMC-Fraktion vorliegt. Es lässt sich ein Zusammenhang zwischen Höhe des LDG-Anteils in der PBMC-Fraktion und der Krankheitsaktivität in Vaskulitiden vermuten. Die geringe Fallzahl begünstigt hierbei die fehlende statistische Signifikanz.

Im Formenkreis autoimmuner Erkrankungen ist eine generelle Erhöhung des LDG-Anteils im Blut bereits für Asthma beschrieben worden, eine Assoziation zwischen Erhöhung des LDG-Anteils und der Schwere der Symptomatik zeigte sich beim Systemischen Lupus erythematoses (21, 83). In systemischen Vaskulitiden inklusive AAV ist eine solche Erhöhung von LDGs im Blut bisher nicht beschrieben worden. In dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass der durchschnittliche Anteil von LDGs im Blut von Patient*innen mit Vaskulitis weit höher lag als in der Kontrollgruppe (5,4-fach erhöht).

Auch in Infektionskrankheiten konnten Zusammenhänge zwischen LDGs und Krankheitsschwere gezeigt werden, so korrelieren LDGs in HIV mit der Viruslast im Blut (84). Patient*innen mit systemischen Inflammationen wiesen laut anderen Publikationen einen erhöhten Anteil von LDGs in der PBMC-Fraktion auf (26). Auch in dieser Arbeit zeigte die SIRS/Sepsis-Gruppe einen deutlich höheren Anteil von LDGs in der PBMC-Fraktion als die Kontrollgruppe, somit konnten die Erkenntnisse vorausgegangener Arbeiten bestätigt werden.

In beiden Krankheitsgruppen, der systemische Vaskulitis und die systemische Inflammation, konnte ein signifikant erhöhter LDG-Anteil verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe dargestellt werden. In der Kontrollgruppe zeigte sich ein durchschnittlicher LDG-Anteil von ca. 2,7% in der PBMC-Fraktion. Es ist zu vermuten, dass der gemessene LDG-Anteil in der PBMC-Fraktion im Zusammenhang mit der systemischen

Immunaktivierung steht, dies wird nicht zuletzt im erhöhten LDG-Anteil in aktiven Vaskulitiden versus in inaktiven Vaskulitiden deutlich, auch wenn dieser nicht signifikant ist.

5.2 Charakterisierung des Oberflächenprofils von LDGs

Um Aufschluss über die Bedeutung eines erhöhten LDG-Anteils zu erhalten, ist es notwendig, Hinweise über die Herkunft und Funktion von LDGs zu gewinnen. Hierfür wurde das Profil der Oberflächenrezeptoren der LDGs in den verschiedenen Gruppen bestimmt und verglichen. Um zu ermitteln welche prinzipiellen Unterschiede zwischen LDGs und PMNs bezüglich ihrer Rezeptorexpression vorliegen, wurden die LDGs jeder Testgruppe mit den PMNs der gleichen Testgruppe verglichen, somit konnte sichergestellt werden, dass sowohl PMNs als auch LDGs den gleichen hämatologischen Einflussfaktoren ausgesetzt waren.

LDGs wurden mit PMNs bezüglich fünf verschiedener Oberflächenrezeptoren (siehe 2.) verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass LDGs sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Vaskulitis-Gruppe signifikant häufiger CD14-, CD86- und HLA-DR-positiv waren. Auch die absolute Stärke der Rezeptorexpression (MFI) war in der Kontroll- und Vaskulitis-Gruppe höher.

Bei CD14 handelt es sich um einen LPS-Rezeptor, welcher stark auf Monozyten und Makrophagen exprimiert ist, auf Granulozyten ist er normalerweise nur schwach exprimiert (21, 85). Unter inflammatorischen Bedingungen können Granulozyten jedoch eine Hochregulation der CD14 Expression zeigen (86). In Granulozyten normaler Dichte (PMN) fand sich in unseren Untersuchungen eine deutlich geringere Expression als in LDGs.

Auch CD86 wurde in der Vergangenheit als Abgrenzungsmarker von Monozyten gegenüber LDGs verwendet, dieses Protein wird auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert und ist verantwortlich für die Kostimulation von T-Zellen (21, 87). HLA-DR ist typischerweise an der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen wie Monozyten zu finden und dient als Marker für Immunaktivierung bzw. Immunsuppression (21). Dementsprechend weisen LDGs auch bezüglich CD86 und HLA-DR Ähnlichkeiten zu Monozyten auf.

Als LDGs wurden ausschließlich Zellen klassifiziert, die als CD66b-positiv gewertet wurden. CD66b ist exklusiv auf Granulozyten exprimiert und nicht auf Monozyten (88).

Mit den LDGs der Vaskulitis- und Kontrollgruppe liegen also Populationen vor, die mit CD66b exklusive Eigenschaften von Granulozyten aufweisen, zudem aber deutlich häufiger als klassische PMNs CD14-, CD86- und HLA-DR-positiv sind, also typische monozytäre Oberflächenrezeptoren besitzen.

Diese Tendenz ist auch im Vergleich zwischen LDGs und PMNs in der SIRS/Sepsis-Gruppe zu erkennen, auch hier ist der Anteil CD14-, CD86- und HLA-DR-positiven Zellen unter den LDGs größer als unter den PMNs, auch wenn diese Unterschiede nicht statistisch signifikant sind.

Als prinzipieller Unterschied zwischen LDGs und PMNs ist somit das häufigere Vorhandensein der Oberflächenrezeptoren CD14, CD86 und HLA-DR erkannt worden. Obwohl in den drei Testgruppen unterschiedliche hämatologische Einflussfaktoren vorlagen, waren LDGs in allen Gruppen häufiger mit den Oberflächenrezeptoren CD14, CD86 und HLA-DR ausgestattet als die PMNs der jeweiligen Gruppe. Da diese charakteristische Veränderung in unterschiedlichsten hämatologischen Milieus vorlag, sollte sie nicht als Anpassung auf einen spezifischen physiologischen oder pathologischen Zustand verstanden werden, sondern als charakteristische Veränderung im Oberflächenprofil, die LDGs immanent ist.

Die fehlende Signifikanz dieser Veränderungen in der SIRS/Sepsis-Gruppe ist zum einen durch die geringe Stichprobe begünstigt, zum anderen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bereits auf den PMNs der SIRS/Sepsis-Gruppe eine verstärkte Expression von CD14, CD86 und HLA im Vergleich zu Kontrollgruppe vorlag (siehe 5.3). Somit ist es möglich, dass die den LDGs immanente Erhöhung der CD14-, CD86- und HLA-Expression durch bereits initial hämatologisch veränderte PMNs abgeschwächt wurde. Eine andere Erkenntnis dieser Analyse ist, dass sich der Anteil CD16-positiver Zellen zwischen LDGs und PMNs in keiner Testkohorte unterscheidet. CD16 gilt als Marker für ausgereifte Granulozyten (14). In der Diskussion über die Herkunft von LDGs, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass sich LDGs nicht auf einer anderen Entwicklungsstufe befinden als PMNs. Diese Beobachtung stützt die aktuelle wissenschaftliche Bild (14), dass sich LDGs bezüglich ihrer Oberflächenrezeptoren als degranulierte, reife Zellen und nicht als unreife Vorläuferzellen darstellen.

5.3 Einfluss von systemischen Vaskulitiden auf die Rezeptorexpression von PMNs und LDGs

Um zu erfassen, welchen spezifischen Einfluss ein durch systemische Vaskulitiden oder Inflammationen verändertes hämatologisches Milieu auf das Rezeptorprofil auf LDGs hat, wurde zuerst der Einfluss dieser pathologischen Umgebungen auf das Rezeptorprofil von Granulozyten normaler Dichte (PMN) untersucht.

Es zeigte sich hierbei, dass die PMNs der Vaskulitis-Gruppe häufiger HLA-DR positiv waren, auch absolut war HLA-DR stärker exprimiert. Da HLA-DR einen Marker für Immunaktivierung darstellt (26) und in systemischen Vaskulitiden eine Autoimmunaktivierung vorliegt, ist dies eine plausible Veränderung im Oberflächenprofil dieser PMNs.

Der direkte Vergleich des Oberflächenprofils von LDGs der Kontrollgruppe mit denen der Vaskulitis-Gruppe zeigte einen höheren Anteil CD14-positiver LDGs in der Vaskulitis-Kohorte. Die Erhöhung von CD14 wurde in 5.2 bereits als generelle, „LDG-immanente“ Veränderung definiert. Darüber hinaus fördert das hämatologische Milieu einer systemischen Vaskulitis zusätzlich die Expression dieses Rezeptors. Nowack et al. konnten in vitro zeigen, dass die Stimulation von Monozyten mit ANCA in der Erhöhung der Oberflächenexpression von CD14 auf Monozyten resultierte (89), dies kann als ein weiterer Hinweis darauf gesehen werden, dass LDGs bezüglich der Expression des Oberflächenrezeptors CD14 Ähnlichkeiten zu Monozyten aufweisen. Die Expression von CD16 auf LDGs ist reduziert, dies könnte als Hinweis darauf verstanden werden, dass es sich bei LDGs um unreife Vorläuferzellen von Neutrophilen handelt, die aufgrund zytokiner Reize im autoinflammatorischen Milieu der systemischen Vaskulitis vorzeitig aus dem Knochenmark entlassen werden. Plausibler scheint jedoch eine verminderte Expression im Rahmen der Aktivierung der Neutrophilen via „surface shedding“ (90).

Bisherige Untersuchungen werteten das Oberflächenprofil von LDGs stets als Hinweis darauf, dass es sich bei LDGs nicht um Vorläuferzellen, sondern um aktivierte degranulierte Zellen handelt (14).

Im Trend zeigt sich ein gesteigerter Anteil CD177-positiver LDGs der Vaskulitis-Gruppe. CD177 gilt als Mediator für die Oberflächenexpression von PR3 auf Neutrophilen, zudem korreliert die Expression von PR3 mit der Expression von CD177. PR3-Rezeptoren sind als Zielantigen für ANCA entscheidend an der Pathogenese von AAV beteiligt (59, 60).

Dass ein hoher Anteil CD177-positiver Neutrophiler (PMN) einen Risikofaktor für Vaskulitiden darstellt, konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden (60). Auch in dieser Arbeit zeigte sich im Trend neben einem erhöhten Anteil CD177-positiver LDGs ein erhöhter Anteil CD177-positiver Neutrophiler (PMNs) in der Vaskulitis-Gruppe. Ob CD177-Oberflächenrezeptoren auf LDGs eine ähnliche Bedeutung für die Pathogenese von AAV haben ist unklar.

5.4 Einfluss systemischer Inflammation auf die Rezeptorexpression von PMNs und LDGs

Im Profilvergleich von PMNs der Kontrollgruppe mit denen der SIRS/Sepsis-Gruppe zeigen sich erhöhte Anteile von CD14-, CD86- und HLA-DR-positiven PMNs, auch die absolute Expression dieser Oberflächenrezeptoren ist in der SIRS/Sepsis-Gruppe erhöht. Diese Unterschiede stellen sich analog zu den „LDG-immanenten“ Veränderungen (siehe 5.2) dar und können im Sinne einer Immunaktivierung wie sie SIRS und Sepsis vorliegt, verstanden werden. Da bereits die PMNs der SIRS/Sepsis-Gruppe häufiger CD14-, CD86- und HLA-DR-positiv sind, kommen die LDG-typischen Expressionssteigerungen von CD14-, CD86- und HLA-DR in den LDGs der SIRS/Sepsis Gruppe nicht mehr signifikant zum Tragen (siehe 5.2).

Das Vorliegen einer systemischen Inflammation reduziert auf LDGs die Expression von CD16, sowohl der Anteil CD16-positiver LDGs, als auch die absolute Rezeptorexpression sind erniedrigt. Diese Veränderungen könnten analog zu Vaskulitiden wie in 5.3 dargestellt, erklärt werden. Sowohl eine verstärkte Rekrutierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark, die zu einem Release von nicht ausgereiften, CD16-reduzierten Granulozyten führt, als auch eine verminderte Expression durch Immunaktivierung der Neutrophilen via „surface shedding“ sind denkbare Mechanismen (90). Beide Mechanismen scheinen in einem Zustand höchster Aktivierung des Immunsystems, wie er in SIRS und Sepsis vorliegt, plausibel.

5.5 Korrelationen zwischen klinischen Parametern und der Rezeptorexpression von LDGs in Vaskulitiden

Es konnten relevante Zusammenhänge zwischen klinisch erfassten Parametern und der Rezeptorexpression von LDGs in Vaskulitiden gefunden werden. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass der Anteil von LDGs (definiert nach SSC-FSC) in der

PBMC-Fraktion mit dem Aktivitätszustand der Vaskulitis positiv korrelierte. Hohe LDG-Anteile sprechen für, niedrige LDG-Anteil gegen eine aktive systemische Vaskulitis. Ähnliche Erkenntnisse konnte bereits für HIV, Asthma und SLE gefunden werden, auch hier zeigte eine hohe LDG-Fraktion das Vorliegen bzw. den Schweregrad der jeweiligen Erkrankung an. (83, 84, 91). Diese Arbeit konnte erstmals zeigen, dass dies auch für Vaskulitiden gilt. Allen genannten Erkrankungen ist gemein, dass sich der LDG-Anteil im Rahmen einer Immunaktivierung erhöht, was erneut die Frage nach der Funktion von LDGs aufwirft. Eine proinflammatorische Funktion scheint hierbei nahezuliegen (21), dennoch wäre auch eine immunsuppressive Funktion schon während einer aktiven Episode denkbar.

Die Stärke der Rezeptorexpression von CD14 korreliert positiv mit den cANCA (PR3) im Blut der Testpersonen. Einen ähnlichen Effekt konnten Nowack et al. auf Monozyten provozieren, sie zeigten in vitro die Hochregulation von CD14 auf der Membran nach Stimulation mit PR3 (89). Daher lässt sich diese Korrelation als Hinweis auf Ähnlichkeiten zwischen LDGs und Monozyten verstehen. Unterstützend kommt hinzu, dass zwischen PMNs und CD14-Expression keine derartige Korrelation vorlag, sich LDGs diesbezüglich also eher wie Monozyten verhalten.

Eine weitere relevante Beobachtung stellt die positive Korrelation zwischen der Stärke der Oberflächenexpression von CD16 bzw. HLA-DR und der klinischen, mittels Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) erhobenen, Symptomschwere der Vaskulitis dar. Je stärker die Symptome der Vaskulitis ausgeprägt war, desto höher war auch die Expression der Rezeptoren.

Auf LDGs der Vaskulitis-Gruppe zeigte sich CD16 signifikant schwächer exprimiert als auf LDGs der Kontrollgruppe. Innerhalb der Vaskulitis-Gruppe zeigt eine niedrige Expression von CD16 zusätzlich einen geringeren BVAS und somit eine geringe Symptomschwere an. Bzowska et al. untersuchten „heat-shocked“ PMNs und konnten zeigen, dass thermischer Stress zur Reduktion von CD16 auf PMNs führte. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass je weniger CD16 auf der Oberfläche der PMNs vorhanden war, desto geringer stimulierten diese PMNs Makrophagen. Sie postulierten somit die antiinflammatorische Wirkung einer CD16 Reduktion auf der Oberfläche von PMNs (90). Überträgt man dieses Postulat auf LDGs, ließe sich vermuten, dass auch LDGs mit geringer CD16 Expression eine antiinflammatorische Wirkung zeigen. Dies könnte erklären, warum Vaskulitis-Patienten deren LDGs eine geringere

Oberflächenexpression von CD16 aufwiesen, auch eine geringere Krankheitssymptomatik aufwiesen.

5.6 Korrelationen zwischen klinischen Parametern und der Rezeptorexpression von LDGs in systemischen Inflammationen

Die Berechnung von Zusammenhängen zwischen klinischen Parametern und der Antigenexpression von LDGs in systemischen Inflammationen (SIRS/Sepsis) zeigte, dass der Anteil von LDGs (CD66b-positiv) negativ mit den CRP-Spiegeln korreliert. CRP gibt als Akut-Phase-Protein Auskunft über das Ausmaß von akuten Entzündungsgeschehen, somit verhält sich der Anteil von LDGs in SIRS und Sepsis entgegengesetzt zum Ausmaß der Entzündung. Des Weiteren korreliert der LDG-Anteil negativ mit dem erhobenen APACHE 2-Score. Der APACHE 2-Score dient der Evaluation der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patient*innen in der Intensivmedizin, ein hoher Score prognostiziert eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit. Somit stellt sich ein hoher LDG-Anteil in systemischen Inflammationen als prognostisch günstiger Faktor für das Überleben einer erkrankten Person dar. Zusätzlich untermauert wird diese Erkenntnis durch die negative Korrelation zwischen LDG-Anteil und Mortalität der getesteten Personen. So sind Personen, die einen geringen LDG-Anteil zeigten im Verlauf eher verstorben als Testpersonen, bei denen ein hoher LDG Anteil gemessen werden konnte. Der positive Einfluss eines hohen LDG-Anteils in der PBMC-Fraktion auf die Mortalität wirft die Frage nach der immunologischen Rolle von LDGs auf. Die überschießende Immunreaktion ist essentieller Bestandteil der Pathophysiologie von SIRS und Sepsis und verantwortlich für die Gewebsschädigung des Wirts. Da ein hoher Anteil von LDGs mit einer geringeren Entzündungsaktivität vergesellschaftet ist, Neutrophile aber klassischerweise eine proinflammatorische Funktion erfüllen, scheinen LDGs in systemischen Inflammationen nicht die klassisch proinflammatorische Funktion von Neutrophilen zu erfüllen. Die Vermutung liegt nahe, dass LDGs immunsuppressive Eigenschaften aufweisen könnten. Wie bereits in 5.4 beschrieben, konnte demonstriert werden, dass „heat-shocked“ PMNs eine limitierende Wirkung auf die Immunreaktion haben (90). Die fieberhafte Erhöhung der Körpertemperatur ist ein bedeutsames Symptom bei SIRS und Sepsis. Es konnte gezeigt werden, dass Fieber einen hinreichender thermischer Stress im Sinne eines „Heatshock“ darstellt (92). Über diesen Mechanismus könnte es analog zu PMNs auch bei LDGs zur Induktion einer

antiinflammatorischen Wirkung kommen. Ein weiterer Hinweis darauf ist das CD16-reduziertes Oberflächenprofil von LDGs, welches mit einer immunsupprimierenden Funktion der Zelle assoziiert ist (siehe 5.4.). Auch Janols et al. identifizierten eine LDG - Population, deren Phänotyp bezüglich Funktion und Oberfläche bedeutende Ähnlichkeiten zu immunsuppressiven G-MDSCs aufwies (26). Es liegt also nahe, dass auch LDGs eine derartige immunsuppressive Wirkung haben könnten und somit einen günstigen Einfluss auf die Prognose von SIRS und Sepsis haben könnten.

5.7 Herkunft von LDGs

Die Forschungen bezüglich der Herkunft von LDGs resultierten bisher nicht in eindeutigen Ergebnissen, sondern lieferten teils widersprüchliche Aussagen. Bezüglich der Expression von Oberflächenrezeptoren stellen sich LDGs als reife Zellen dar, Studien welche die Kernmorphologie und die Genexpression analysierten, charakterisierten sie als unreife Granulozyten (14). Um Aufschluss über die Genese von LDGs zu erhalten, wurde in dieser Arbeit eine in vitro Stimulation von Vollblut durchgeführt. Die Stimulation erfolgte mit $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\alpha$ in Kombination mit αPR3 mAb und $\text{TNF}\alpha$ in Kombination mit αMPO mAb. $\text{TNF}\alpha$ wurde eingesetzt, um eine Immunaktivierung zu simulieren in der die Neutrophilen durch ANCA, also αPR3 und αMPO mAb, aktivierbar sind (47). In der Analyse zeigte sich ein deutlich erhöhter LDG-Anteil in allen stimulierten Testansätzen verglichen mit den nicht stimulierten Kontrollansätzen. Demnach wurde sichtbar, dass sich der Anteil von LDGs in vitro durch Stimulation erhöhen kann. Dieses Erkenntnis widerspricht der Annahme, dass es sich bei LDGs um Vorläuferzellen handelt, da eine Neubildung von Vorläuferzellen in vitro nicht plausibel ist. Vielmehr zeigt die Erhöhung von LDGs nach Stimulation, dass es sich um reife, degranulierte Zellen handeln könnte. Vorangegangene Arbeiten berichten von einer verstärkten Degranulation nach Aktivierung mit $\text{TNF}\alpha$, diese Degranulation könnte ausschlaggebend für die verminderte Dichte der Low-density Granulozyten sein (16, 93). Auch das gehäufte Vorkommen in systemischen Inflammationen und Autoimmunerkrankungen ließe sich hierdurch erklären.

5.8 Limitationen

Eine Limitation dieser Arbeit stellt die uneindeutige Terminologie des Begriffs „Low-density-Granulozyten“ in der Fachliteratur und die verschiedenen zur Klassifikation herangezogenen Oberflächenmuster dar. Um die Ergebnisse verschiedener Arbeiten vergleichbar zu machen, muss stets das verwendete Gating berücksichtigt werden. Da die Akquise der Testpersonen mit erheblichem Aufwand verbunden war, konnte eine für diese Fragestellung übliche, aber geringe Stichprobengröße erreicht werden. Die Möglichkeiten der statistischen Analyse sind für diese Fallzahl daher begrenzt.

5.9 Fazit und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil von LDGs in systemischen Vaskulitiden und in systemischen Inflammationen verglichen mit einer gesunden Kontrollkohorte erhöht ist. Dennoch kommen LDGs in geringem Ausmaß auch in Gesunden vor. Im Vergleich zu PMNs zeigten die LDGs der Kontroll-, Vaskulitis- und SIRS/Sepsis-Gruppe eine stärkere Expression von CD14, CD86 und HLA-DR, diese Anpassung scheint LDGs inhärent und unabhängig von pathologischen Einflüssen zu sein. Insbesondere die im Vergleich zu PMNs erhöhte Expression von CD14 könnte als Hinweis darauf verstanden werden, dass es sich bei LDGs um eine Subpopulation von Granulozyten handelt, die Ähnlichkeiten zu Monozyten aufweist.

Das Vorliegen von systemischen Vaskulitiden resultierte in einer weiteren Erhöhung des Anteils CD14-positiver LDGs, somit könnten sich Vaskulitiden unterstützend auf die Ausprägung monozytärer Merkmale auf LDGs auswirken.

In systemischen Inflammationen und Vaskulitiden zeigt sich eine geringere Expression von CD16 auf LDGs, welche möglicherweise durch „surface shedding“ im Rahmen einer Immunaktivierung zu erklären ist. Die Reduktion von CD16 ist ein starker Hinweis auf eine immunsuppressive Funktion von LDGs (90).

Bei Intensivpatienten konnte der prognostisch günstige Einfluss eines hohen LDG-Anteils gezeigt werden, dieses Korrelat ist ein weiterer Hinweis auf eine immunsuppressive Funktion von LDGs. Ergänzend zeigte sich, dass bei Testpersonen mit aktiver Vaskulitis in der Tendenz eher höhere LDG-Anteile gemessen wurden.

In der vorgenommenen Charakterisierung zeigten sich LDGs als homogene Subpopulation von Granulozyten, die Ähnlichkeiten zu Monozyten aufweist und über immunsuppressive Eigenschaften verfügen könnte. Durch Suppression einer

überschießenden systemischen Immunreaktion könnten sie Gewebeschäden reduzieren und somit eine wichtige Rolle in der Wiederherstellung einer immunologischen Homöostase spielen. Dies könnte erklären, dass LDGs im aktivierten Immunsystem wesentlich häufiger Vorkommen als im physiologischen Zustand.

Die Erkenntnis, dass ein hoher LDG-Anteil bei eher geringgradiger klinischer Inflammationssymptomatik auftrat und mit einer verminderten Mortalität korrelierte, wirft erneut die Frage auf, ob LDGs besonders in der Rekonvaleszenzphase vorkommen und somit einen Marker für diese darstellen oder ob sie selbst einen positiven Einfluss auf die Beendigung einer systemischen Inflammation haben. In jedem Fall legt das Ergebnis einen messbaren Zusammenhang zwischen geringem LDG-Anteil und hoher Krankheitsschwere sowie schlechter Prognose dar. Um zu evaluieren, in wie weit der LDG-Anteil als klinischer Prognosemarker bei systemischer Inflammation nutzbar ist, bedarf es jedoch weiterer Validierung durch Studien mit höheren Fallzahlen.

Die Frage nach der Herkunft von LDGs konnte durch die in vitro-Erzeugung von LDGs teilweise beantwortet werden. In vorangegangenen Arbeiten wurden LDGs als mögliche Vorläuferzellen beschrieben (14). Anhand der Oberflächenmarker, insbesondere CD16, konnten keine Unterschiede hinsichtlich des Reifegrades von LDGs verglichen mit PMNs gezeigt werden. Auch die durchgeführten Stimulationsversuche, zeigten, dass die Erzeugung von LDGs in vitro möglich ist und es sich somit nicht um unreife Vorläuferzellen handeln kann. Somit muss es sich bei LDGs um reife Zellen handeln. Die in vitro-Erzeugung von LDGs durch Stimulation legt außerdem nahe, dass aktivierte Granulozyten durch Stimulation an Dichte verlieren könnten, dieser Dichteverlust könnte aus der Degranulation der stimulierten Zellen resultieren. Um dieser Vermutung zu validieren, bedarf es weiterer in vitro Untersuchungen. Insgesamt ergeben sich aus dieser Arbeit neue Hinweise auf Herkunft und Funktion von LDGs. Weitere in vitro und in vivo Studien sind jedoch nötig um ein umfassenderes Bild über den Zelltypus der Low-density-Granulozyten zu erhalten.

6. Literaturverzeichnis

(letzter Zugriff: 19.08.2019; 18.50 Uhr bei allen Websites)

1. Kay A. Paul Ehrlich and the Early History of Granulocytes. *Microbiology spectrum*. 2016;4(4).
2. Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie*: Springer-Verlag; 2011.
3. Renz H. *Praktische Labordiagnostik: Lehrbuch zur Laboratoriumsmedizin, klinischen Chemie und Hämatologie*: Walter de Gruyter; 2009.
4. Weiss SJ, Young J, LoBuglio AF, Slivka A, Nimeh N. Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1981;68(3):714.
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2014.
6. Athens J, Haab O, Raab S, Mauer A, Ashenbrucker H, Cartwright G, Wintrobe M. Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *Journal of Clinical Investigation*. 1961;40(6):989.
7. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70.
8. Cheretakis C, Leung R, Sun CX, Dror Y, Glogauer M. Timing of neutrophil tissue repopulation predicts restoration of innate immune protection in a murine bone marrow transplantation model. *Blood*. 2006;108(8):2821-6.
9. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010;116(4):625-7.
10. Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *Journal of Experimental Medicine*. 1971;134(4):907-34.
11. Häger M, Cowland J, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *Journal of internal medicine*. 2010;268(1):25-34.
12. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(3):159.
13. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *science*. 2004;303(5663):1532-5.
14. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ, editors. *Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity*. *Seminars in immunopathology*; 2013: Springer.
15. Serhan CN. Novel pro-resolving lipid mediators in inflammation are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014;510(7503):92.
16. Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*. 2014;124(5):710-9.
17. Elks PM, van Eeden FJ, Dixon G, Wang X, Reyes-Aldasoro CC, Ingham PW, Whyte MK, Walmsley SR, Renshaw SA. Activation of hypoxia-inducible factor-1 α (Hif-1 α) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. *Blood*. 2011;118(3):712-22.
18. Pillay J, Tak T, Kamp VM, Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cellular and molecular life sciences*. 2013;70(20):3813-27.

19. Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Lang S, Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2012;61(8):1155-67.
20. Beyrau M, Bodkin JV, Nourshargh S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open biology*. 2012;2(11):120134.
21. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, McCune WJ, Kaplan MJ. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *The journal of immunology*. 2010;184(6):3284-97.
22. Bowers NL, Helton ES, Huijbregts RP, Goepfert PA, Heath SL, Hel Z. Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: role of PD-L1/PD-1 pathway. *PLoS pathogens*. 2014;10(3):e1003993.
23. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissières P, Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Critical care medicine*. 2013;41(3):820-32.
24. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, Rubin CJ, Zhao W, Olsen SH, Klinker M. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*. 2011;187(1):538-52.
25. Eades-Perner A-M, Thompson J, van der Putten H, Zimmermann W. Mice transgenic for the human CGM6 gene express its product, the granulocyte marker CD66b, exclusively in granulocytes. *Blood*. 1998;91(2):663-72.
26. Janols H, Bergenfelz C, Allaoui R, Larsson A-M, Rydén L, Björnsson S, Janciauskiene S, Wullt M, Bredberg A, Leandersson K. A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases. *Journal of leukocyte biology*. 2014;96(5):685-93.
27. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, LaFace DM, Heyworth PG, Efron PA, Moldawer LL. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Molecular medicine*. 2011;17(3-4):281.
28. Biociences B. Human and Mouse CD Marker Handbook [Available from: https://www.bdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf].
29. Hacbarth E, Kajdacsy-Balla A. Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis & Rheumatology*. 1986;29(11):1334-42.
30. Jennette JC, Falk R, Bacon P, Basu N, Cid M, Ferrario F, Flores-Suarez L, Gross W, Guillevin L, Hagen E. 2012 revised international chapel hill consensus conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis & Rheumatology*. 2013;65(1):1-11.
31. de Kussmaul A, Maier R. Über eine bisher nicht beschriebene eigenthümliche Arterienerkrankung (Periarteritis nodosa), die mit Morbus Brightii und rapid fortschreitender allgemeiner Muskellähmung einhergeht. *Dtsch Arch Klin Med*. 1866;1:484-517.
32. Matteson EL. History of vasculitis: the life and work of Adolf Kussmaul. 2012.
33. McBride P. Photographs of a case of rapid destruction of the nose and face. *The Journal of Laryngology & Otology*. 1991;105(12):1120-.
34. McKinney EF, Willcocks LC, Broecker V, Smith KG, editors. *The immunopathology of ANCA-associated vasculitis*. Seminars in immunopathology; 2014: Springer.
35. Wegener Ft. Über generalisierte, septische Gefässerkrankungen. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1936;29:202-10.

36. Wegener F. About a peculiar rhinogenic granulomatosis with marked involvement of the arterial system and kidneys. *Beitr Pathol Anat.* 1939;102:30-68.
37. Greco A, Rizzo MI, De Virgilio A, Gallo A, Fusconi M, Ruoppolo G, Altissimi G, De Vincentiis M. Churg–Strauss syndrome. *Autoimmunity reviews.* 2015;14(4):341-8.
38. Rao JK, Allen NB, Pincus T. Limitations of the 1990 American College of Rheumatology classification criteria in the diagnosis of vasculitis. *Annals of internal medicine.* 1998;129(5):345-52.
39. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, Hagen EC, Hoffman GS, Hunder GG, Kallenberg CG. Nomenclature of systemic vasculitides. *Arthritis & Rheumatology.* 1994;37(2):187-92.
40. Davies D, Moran J, Niall J, Ryan G. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *British medical journal (Clinical research ed).* 1982;285(6342):606.
41. Van der Woude F, Lobatto S, Permin H, Van der Giessen M, Rasmussen N, Wiik A, Van Es L, Van der Hem G, The T. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *The Lancet.* 1985;325(8426):425-9.
42. Hind C, Pepys M. Anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. *The Lancet.* 1985;325(8441):1336-7.
43. ANDERSEN-RANBERG K, HØIER-MADSEN M, Wiik A, Jeune B, Hegedüs L. High prevalence of autoantibodies among Danish centenarians. *Clinical & Experimental Immunology.* 2004;138(1):158-63.
44. Schreiber A, Luft FC, Kettritz R. Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation. *Kidney international.* 2004;65(6):2172-83.
45. Niles JL, McCluskey RT, Ahmad MF, Arnaout MA. Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase [see comments]. *Blood.* 1989;74(6):1888-93.
46. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *New England Journal of Medicine.* 1988;318(25):1651-7.
47. Charles LA, Caldas M, Falk RJ, Terrell RS, Jennette JC. Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *Journal of Leukocyte Biology.* 1991;50(6):539-46.
48. Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, Maeda N, Falk RJ, Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *The Journal of clinical investigation.* 2002;110(7):955.
49. Pfister H, Ollert M, Fröhlich LF, Quintanilla-Martinez L, Colby TV, Specks U, Jenne DE. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo. *Blood.* 2004;104(5):1411-8.
50. Bansal PJ, Tobin MC. Neonatal microscopic polyangiitis secondary to transfer of maternal myeloperoxidase–antineutrophil cytoplasmic antibody resulting in neonatal pulmonary hemorrhage and renal involvement. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology.* 2004;93(4):398-401.
51. Porges AJ, Redecha PB, Kimberly WT, Csernok E, Gross WL, Kimberly RP. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa. *The Journal of Immunology.* 1994;153(3):1271-80.
52. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1990;87(11):4115-9.

53. Yang JJ, Preston GA, Pendergraft WF, Segelmark M, Heeringa P, Hogan SL, Jennette JC, Falk RJ. Internalization of proteinase 3 is concomitant with endothelial cell apoptosis and internalization of myeloperoxidase with generation of intracellular oxidants. *The American journal of pathology*. 2001;158(2):581-92.
54. Kallenberg CG, Heeringa P, Stegeman CA. Mechanisms of disease: pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides. *Nature Reviews Rheumatology*. 2006;2(12):661.
55. Halbwachs-Mecarelli L, Bessou G, Lesavre P, Lopez S, Witko-Sarsat V. Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool. *FEBS letters*. 1995;374(1):29-33.
56. Rarok AA, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CG. Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2002;13(9):2232-8.
57. Hu N, Westra J, Kallenberg CG. Membrane-bound proteinase 3 and its receptors: relevance for the pathogenesis of Wegener's granulomatosis. *Autoimmunity reviews*. 2009;8(6):510-4.
58. Stroncek DF, Caruccio L, Bettinotti M. CD177: A member of the Ly-6 gene superfamily involved with neutrophil proliferation and polycythemia vera. *Journal of translational medicine*. 2004;2(1):8.
59. von Vietinghoff S, Tunnemann G, Eulenberg C, Wellner M, Cardoso MC, Luft FC, Kettritz R. NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood*. 2007;109(10):4487-93.
60. Hu N, Westra J, Huitema M, Bijl M, Brouwer E, Stegeman C, Heeringa P, Limburg P, Kallenberg C. Coexpression of CD177 and membrane proteinase 3 on neutrophils in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated systemic vasculitis: Anti-proteinase 3-mediated neutrophil activation is independent of the role of CD177-expressing neutrophils. *Arthritis & Rheumatology*. 2009;60(5):1548-57.
61. Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2009;20(2):289-98.
62. Savage C, Pottinger B, Gaskin G, Pusey C, Pearson J. Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity toward cultured endothelial cells. *The American journal of pathology*. 1992;141(2):335.
63. Grayson PC, Carmona-Rivera C, Xu L, Lim N, Gao Z, Asare AL, Specks U, Stone JH, Seo P, Spiera RF. Neutrophil-Related Gene Expression and Low-Density Granulocytes Associated With Disease Activity and Response to Treatment in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Arthritis & Rheumatology*. 2015;67(7):1922-32.
64. Cheadle C, Berger AE, Andrade F, James R, Johnson K, Watkins T, Park JK, Chen YC, Ehrlich E, Mullins M. Transcription of proteinase 3 and related myelopoiesis genes in peripheral blood mononuclear cells of patients with active Wegener's granulomatosis. *Arthritis & Rheumatology*. 2010;62(6):1744-54.
65. Lyons PA, McKinney EF, Rayner TF, Hatton A, Woffendin HB, Koukoulaki M, Freeman TC, Jayne DR, Chaudhry AN, Smith KG. Novel expression signatures identified by transcriptional analysis of separated leucocyte subsets in systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(6):1208-13.
66. 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. *Chest*. 1992;101(6):1644-55.

67. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *Jama*. 2016;315(8):801-10.
68. Vincent J-L, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart C, Suter P, Thijs L. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive care medicine*. 1996;22(7):707-10.
69. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2016;193(3):259-72.
70. Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;168(2):165-72.
71. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama*. 2009;302(21):2323-9.
72. Minasyan H. Sepsis and septic shock: Pathogenesis and treatment perspectives. *Journal of Critical Care*. 2017.
73. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF, editors. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Seminars in Immunopathology*; 2017: Springer.
74. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Frontiers in immunology*. 2014;5.
75. Biosciences B. Human BD Fc Block™ Blocks non-specific binding of antibodies to Fc receptors 2014 [Available from: <https://www.bdbiosciences.com/documents/Fc-Block-DS.pdf>].
76. Biosciences B. BD FACSCanto II
A proven research platform for maximum reliability and the highest quality results 2012 [Available from: https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCanto_II_brochure_research.pdf].
77. Biosciences B. Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung. 2014. p. 5-35.
78. Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3).
79. Mukhtyar C, Lee R, Brown D, Carruthers D, Dasgupta B, Dubey S, Flossmann O, Hall C, Hollywood J, Jayne D. Modification and validation of the Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3). *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(12):1827-32.
80. Reumaux D, Hordijk PL, Duthilleul P, Roos D. Priming by tumor necrosis factor- α of human neutrophil NADPH-oxidase activity induced by anti-proteinase-3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Journal of leukocyte biology*. 2006;80(6):1424-33.
81. Razali NM, Wah YB. Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. *Journal of statistical modeling and analytics*. 2011;2(1):21-33.
82. Cohen J. A power primer. *Psychological bulletin*. 1992;112(1):155.
83. Fu J, Tobin MC, Thomas LL. Neutrophil-like low-density granulocytes are elevated in patients with moderate to severe persistent asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2014;113(6):635-40. e2.
84. Cloke T, Munder M, Taylor G, Müller I, Kropf P. Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection. *PloS one*. 2012;7(11):e48939.

85. College of Veterinary Medicine WSU. CD14 2008 [updated 2008. Available from: <https://apps.vetmed.wsu.edu/tkp/report.aspx?ID=19>].
86. Tansho-Nagakawa S, Ubagai T, Kikuchi-Ueda T, Koshio O, Koshibu Y, Kikuchi H, Ono Y. Analysis of membrane antigens on neutrophils from patients with sepsis. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2012;18(5):646-51.
87. (NCBI) NCfBI. CD86 CD86 molecule [Homo sapiens (human)]: National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/942>].
88. Bordessoule D, Jones M, Gatter K, Mason D. Immunohistological patterns of myeloid antigens: tissue distribution of CD13, CD14, CD16, CD31, CD36, CD65, CD66 and CD67. *British journal of haematology*. 1993;83(3):370-83.
89. Nowack R, Schwalbe K, Flores-Suarez L-F, Yard B, VAN DER WOUDE FJ. Upregulation of CD14 and CD18 on monocytes in vitro by antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2000;11(9):1639-46.
90. Bzowska M, Hamczyk M, Skalniak A, Guzik K. Rapid decrease of CD16 (FcγRIII) expression on heat-shocked neutrophils and their recognition by macrophages. *BioMed Research International*. 2011;2011.
91. Midgley A, Beresford M. Increased expression of low density granulocytes in juvenile-onset systemic lupus erythematosus patients correlates with disease activity. *Lupus*. 2016;25(4):407-11.
92. Hasday JD, Singh IS. Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes. *Cell stress & chaperones*. 2000;5(5):471.
93. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*. 2010;49(9):1618-31.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Tom Philipp Jäger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Quantifizierung und detaillierte Charakterisierung von low-density granulocytes in systemischen Vaskulitiden und Inflammationen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum:

Unterschrift:

Tabellarischer Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Adrian Schreiber für die Einführung in die Laborarbeit und die Betreuung währenddessen, für die Hinweise bei Datenerhebung und der Erstellung der Dissertation. Ich danke Susanne Rolle und Sylvia Lucke, die mir während der Laborarbeit jede Frage beantworten konnten und hilfreiche Ratschläge gegeben haben. Auch Frau Dr. Mira Choi und Herrn Dr. Uwe Jerke danke ich für die Unterstützung während der Laborarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich beim Team der Klinik für Nephrologie und internistische Intensivmedizin der Charité Berlin, die mir bei der Rekrutierung der Patienten behilflich waren und stets ein offenes Ohr für mich hatten, bedanken. Ein besonderer Dank gilt hier Herrn Prof. Dr. med. Christian Storm für die Einarbeitung auf der Intensivstation. Auch danke ich den Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Kardiologie und Nephrologie des Helios-Klinikums Berlin-Buch, besonders Herrn Dr. Markus Bieringer für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung.

Ich danke allen Patientinnen und Patienten, die bereit waren an dieser Studie teilzunehmen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, und meinen Freunden.