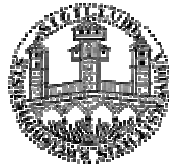


Wirkung des  
Makrophagen-Migrations-inhibitorischen Faktors (MIF)  
auf den Immunstatus in der Sepsis

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -  
der naturwissenschaftlichen Fakultät III  
der Universität Regensburg



vorgelegt von  
Sybille Grießl aus Rimsting  
Mai 2009

---

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Februar 2006 bis Mai 2009 unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel am Institut für Immunologie der Universität Regensburg.

**Promotionsgesuch eingereicht am:**

20.05.2009

**Die Arbeit wurde angeleitet von:**

Prof. Dr. Witzgall

Prof. Dr. Daniela N. Männel

**Prüfungsausschuss:**

Prof. Dr. Wirth (Vorsitz)

Prof. Dr. Witzgall

Prof. Dr. Männel

Prof. Dr. Tamm

---

**Für meine Eltern**

**Ich beschäftige mich nicht mit dem was getan worden ist,  
mich interessiert was getan werden muss.**

Marie Curie (1867-1934)

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Sepsis - ein schwer definierbares Krankheitsbild</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Tumor Nekrose Faktor (TNF) - ein zentrales Zytokin der inflammatorischen Immunantwort</b>	<b>3</b>
1.3	<b>Antiinflammatorische Mechanismen</b>	<b>5</b>
1.3.1	Regulatorische T-Zellen (Treg).....	5
1.3.2	IL-10 als Vertreter der antiinflammatorischen Zytokinantwort.....	6
1.3.3	DUSP1 (dualspezifische Phosphatase 1) - ein Regulator der angeborenen Immunantwort.....	6
1.3.4	Immunregulation durch Depletion von Tryptophan.....	7
1.4	<b>Makrophagen Migrations-inhibitorische Faktor (MIF)</b>	<b>8</b>
1.4.1	Entdeckung von MIF.....	8
1.4.2	Die Bedeutung von MIF.....	8
1.4.3	Der Rezeptor von MIF.....	9
1.4.4	Die Wirkung von MIF.....	9
1.4.5	MIF in der Sepsis.....	10
1.5	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	<b>Material</b>	<b>14</b>
2.1.1	Verbrauchsmaterial und Geräte.....	14
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	15
2.1.3	Kits.....	16
2.1.4	Antikörper.....	16
2.1.5	DUSP1-Primer.....	17
2.1.6	Puffer und Lösungen.....	17
2.1.7	Enzyme.....	18
2.1.8	Zytokine.....	18
2.1.9	Bakterien.....	19
2.1.10	Kulturplatten für Bakterien.....	19
2.1.11	Mäuse.....	19
2.2	<b>Methoden</b>	<b>20</b>
2.2.1	Tierexperimentelle Methoden.....	20
2.2.1.1	Haltung.....	20

2.2.1.2	Anästhesie .....	20
2.2.1.3	CLP .....	20
2.2.1.4	Induktion einer Primär- bzw. Sekundärinfektion .....	21
2.2.1.5	Überlebenskurven.....	21
2.2.1.6	OVA-Immunisierung .....	21
2.2.1.7	Organentnahme .....	21
2.2.1.8	Gewinnung von Serum .....	21
2.2.1.9	Gewinnung von Plasma .....	22
2.2.2	Zellbiologische Methoden .....	22
2.2.2.1	Collagenase-Verdau .....	22
2.2.2.2	Herstellung einer Einzelzellsuspension .....	22
2.2.2.3	Erythrozyten-Lyse .....	22
2.2.2.4	Einstellung auf definierte Zellzahlen .....	23
2.2.2.5	Anreicherung von Zellen.....	23
2.2.2.5.1	Anreicherung von Makrophagen.....	23
2.2.2.5.2	MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting).....	23
2.2.2.5.3	Zellsortierung .....	24
2.2.2.6	Markierung von Zellen mit CFSE-Färbung .....	24
2.2.2.7	Zellkulturbedingungen .....	25
2.2.3	Durchflusszytometrie .....	25
2.2.3.1	Oberflächenfärbung .....	25
2.2.3.2	Intrazelluläre Färbung .....	25
2.2.3.2.1	Färbung von FoxP3 .....	25
2.2.3.2.2	Färbung von Zytokinen .....	26
2.2.4	Funktionelle Untersuchung von Zellen .....	26
2.2.4.1	Restimulierung zur Abrufung der Zytokinproduktionsfähigkeit.....	26
2.2.4.2	Bestimmung der Zellproliferation .....	26
2.2.4.3	Bestimmung der suppressiven Aktivität.....	26
2.2.4.4	Bestimmung der Phagozytoserate von Makrophagen.....	27
2.2.5	Anzucht der Keime .....	27
2.2.5.1	<i>Escherichia coli</i> ATTC 25922 .....	27
2.2.5.2	<i>Salmonella enterica</i> Serovar thyphimurium ATCC 14028s .....	27
2.2.5.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	28
2.2.5.4	Einstellung und Bestimmung von koloniebildenden Bakterieneinheiten (KFU) ...	28
2.2.6	Biochemische Methoden .....	29

2.2.6.1	Aktivitätsbestimmung der Leber-Aminotransferasen (ALT/AST) .....	29
2.2.6.2	Nitrit-Messung.....	30
2.2.6.3	Ovalbuminspezifischer ELISA .....	30
2.2.7	Molekularbiologische Methoden .....	31
2.2.7.1	Arbeiten mit RNA .....	31
2.2.7.2	Präparation der Gesamt-RNA.....	31
2.2.7.3	Reverse Transkription.....	32
2.2.7.4	Quantitative PCR .....	32
2.2.8	Statistik .....	33
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Immunstatus im experimentellen Modell der CLP</b>	<b>34</b>
3.1.1	Überprüfung der Immunparalyse .....	34
3.1.1.1	<i>Salmonella typhimurium</i> -Sekundärinfektion .....	34
3.1.1.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Sekundärinfektion .....	36
3.1.2	Zytokinproduktion nach Restimulierung der Milz .....	37
3.1.2.1	Produktionsfähigkeit von TNF, IL-6 und IL-12 .....	37
3.1.2.2	Produktionsfähigkeit von IFN $\gamma$ .....	39
3.1.2.3	Produktionsfähigkeit von IL-10 .....	41
3.1.3	DUSP1-Expression.....	43
3.1.4	IDO-Aktivität über die Tryptophandepletion.....	45
3.1.4.1	Folgen der IDO-Aktivität für die primäre B-Zellantwort .....	47
3.1.5	Regulatorische T-Zellen.....	49
<b>3.2</b>	<b>Einfluss einer MIF-Behandlung in der sepsisinduzierten Immunparalyse</b>	<b>50</b>
3.2.1	Einfluss von MIF auf die Mortalität einer Sekundärinfektion mit <i>Salmonella typhimurium</i> .....	50
3.2.2	Keimeliminierung nach CLP in Abhängigkeit von MIF .....	51
3.2.3	Einfluss von MIF auf AST und ALT nach Sekundärinfektion .....	52
3.2.4	Einfluss von MIF auf den TNF-Spiegel im Serum nach Stimulierung .....	54
3.2.5	Einfluss von MIF während der Immunparalyse auf die IL-17-Produktion von stimulierten Milzzellen.....	55
3.2.6	Einfluss von IL-10-Serumspiegel nach CLP und Sekundärinfektion.....	56
3.2.7	Einfluss von MIF auf DUSP1-Expression .....	57
3.2.8	Corticosteron-Werte im Serum nach MIF-Behandlung .....	58
3.2.9	Einfluss von MIF auf die Serum-Tryptophandepletion .....	59

3.2.9	Einfluss von MIF am Tag 2 nach einer CLP auf die Zellzusammensetzung der Milz .....	60
3.2.10.1	Einfluss von MIF auf die Makrophagen der Milz .....	60
3.2.10.1.1	Anzahl der CD11b+Zellen.....	60
3.2.10.1.2	TNF-Produktionsfähigkeit von CD11b+Zellen .....	61
3.2.10.1.3	IL-6 Produktionsfähigkeit von CD11b+Zellen .....	63
3.2.10.1.4	IL-12 Expression von CD11b+Zellen .....	64
3.2.10.1.5	Phagozytose von CD11b+Milzzellen .....	65
3.2.10.1.6	Nitrit-Produktion von Makrophagen .....	66
3.2.10.2	Einfluss von MIF auf Dendritische Zellen (DC).....	67
3.2.10.2.1	Einfluss von MIF auf die Anzahl der Dendritischen Zellen.....	67
3.2.10.2.2	Aktivierungszustand der CD11c+Milzzellen.....	68
3.2.10.2.2	TNF-Expression der CD11c+Milzzellen.....	69
3.2.10.2.4	IL-6-Expression von CD11c+Zellen .....	70
3.2.10.2.5	IL-12-Expression von DC.....	71
3.2.10.3	Der Einfluss von MIF auf die T-Zellen .....	72
3.2.10.3.1	Einfluss von MIF auf die Anzahl der T-Helferzellen .....	72
3.2.10.3.2	Einfluss von MIF auf CD25+FoxP3+CD4+Zellen .....	73
<b>3.3</b>	<b>Beeinflussung regulatorischer T-Zellen durch TNF</b>	<b>74</b>
3.3.1	Die Bedeutung des TNFR2 für CD25+FoxP3+CD4+Zellen.....	74
3.3.2	Suppressivität regulatorischer T-Zellen in Abhängigkeit des TNFR2 .....	75
3.3.3	Einfluss von TNF auf die Suppression von CD25+FoxP3+CD4+Zellen .....	76
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>95</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>104</b>
	<b>Anhang</b>	<b>105</b>

# 1. Einleitung

Aus einer vorangegangenen Studie in unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass Mäuse in der sepsisinduzierten Immunparalyse durch die Behandlung mit dem Makrophagen-Migrations-inhibitorischen Faktor (MIF) einen Schutz für eine anschließende bakterielle Sekundärinfektion haben (Pollak, Sterns et al. 2005). Das hier verwendete Mausmodell, die CLP (*cecal ligation and puncture*), führt zu einer septischen Peritonitis, weshalb es häufig in der klinisch nahen Sepsisforschung verwendet wird. Sepsis und Sepsis- bedingte Multiorganversagen als Reaktion des Organismus auf eine systemische Infektion sind trotz riesiger Fortschritte in der Intensivmedizin ein schwer beherrschbares Krankheitsbild, das nicht selten zum Tod des Patienten führt. Diese Arbeit befasst sich mit den immunologischen Veränderungen, die zur Entstehung der Immunparalyse beitragen können sowie deren Beeinflussung durch MIF.

## 1.1 Sepsis - ein schwer definierbares Krankheitsbild

Erste Beschreibungen einer Sepsis (Rittirsch, Flierl *et al.* 2008) gehen auf Hippocrates (446-377 v. C.) zurück, der das Krankheitsbild einer „Wundverwesung“ beschrieb. Der als Begründer der modernen Medizin geltende persische Arzt Ibn Sina, der auch unter dem Namen Avicenna (AD 980-1037) bekannt ist, beschrieb Fieber als ein Symptom der Sepsis. Im 18. Jahrhundert führte Louis Pasteur den Abbau von organischem Material auf Bakterien und Mikroorganismen zurück. Erst Anfang des 19. Jahrhunderts prägte Hugo Schottmüller eine noch heute gültige Definition der Sepsis, welche die Infektion als fundamentale Komponente der Sepsis beinhaltet. Weitere Jahre verstrichen, bis Lewis Thomas die Immunantwort als eigentliche Ursache der Sepsis erkannte.

Sepsis, ausgelöst durch eine schwere Infektion oder Gewebeschäden, wurde lange Zeit allein auf die überschießende Reaktion des angeborenen Immunsystems zurückgeführt. Neben einem überaktiven Komplementsystem spielen die ebenfalls überaktiven Zellen des angeborenen Immunsystems eine große Rolle. Stimulierte Neutrophile und Makrophagen sezernieren Zytokine, Chemokine und komplementaktivierende Produkte, die wiederum zur Freisetzung weiterer proinflammatorischer Mediatoren führen. Zudem konnte das Versagen von antiinflammatorischen Mechanismen für das Sepsisbild verantwortlich gemacht werden. Fehlgeschlagene Therapien, die darauf abzielten die proinflammatorischen Mediatoren wie z.B.

den Tumor-Nekrose-Faktor über neutralisierende Antikörper zu behandeln, brachten Zweifel an der Definition einer Sepsis, die nur den überschießenden Entzündungsaspekt beinhaltet.

Sepsis kann nicht nur in der anfänglichen, wegen der starken systemischen Reaktion als *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) bezeichneten Phase zum Tod führen, sondern viele Sepsispatienten versterben später, nachdem diese überschießende Immunreaktion in eine suppressive Immunantwort übergegangen ist. Die spätere Phase der Sepsis zeichnet sich durch die Dominanz antiinflammatorischer Mechanismen aus, die ihr den Namen des *compensatory anti-inflammatory response syndrome* (CARS) brachte. Diese Suppression ist sowohl auf Funktionen des angeborenen Immunsystems, z.B. auf ein verändertes Zytokinprofil, aber auch auf Zellen des adaptiven Immunsystems zurückzuführen. Besonders die CD4+T-Helferzellen (Th-Zellen), Th1-Zellen und Th2-Zellen, prägen durch ihr Zytokinprofil weitere Immunreaktionen in der Sepsis. Die anfängliche proinflammatorische Th1-Antwort, die sich durch die Produktion von Interferon- $\gamma$  und Interleukin-12 (IL-12) auszeichnet, geht in die für eine antiinflammatorische Th2-Antwort, charakterisiert durch IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 Produktion, über. Parallel dazu wird Th17-Zellen eine Rolle für eine Immunität gegen Mikroorganismen zugesprochen. Des Weiteren wird die Apoptose von Lymphozyten und Dendritischen Zellen (DC) als ein wichtiger Faktor für die Ausbildung der Immunsuppression gesehen.

Inzwischen ist man davon abgekommen, Sepsis streng in die Phasen der SIRS bzw. CARS einzuteilen (Osuchowski, Welch et al. 2006). Gehen doch diese Phasen nicht nur ineinander über, sondern liegen oft gleichzeitig vor, weshalb sich der Begriff des *mixed anti-inflammatory response syndrom* (MARS) geprägt hat.

## 1.2 Tumor Nekrose Faktor (TNF) - ein zentrales Zytokin der inflammatorischen Immunantwort

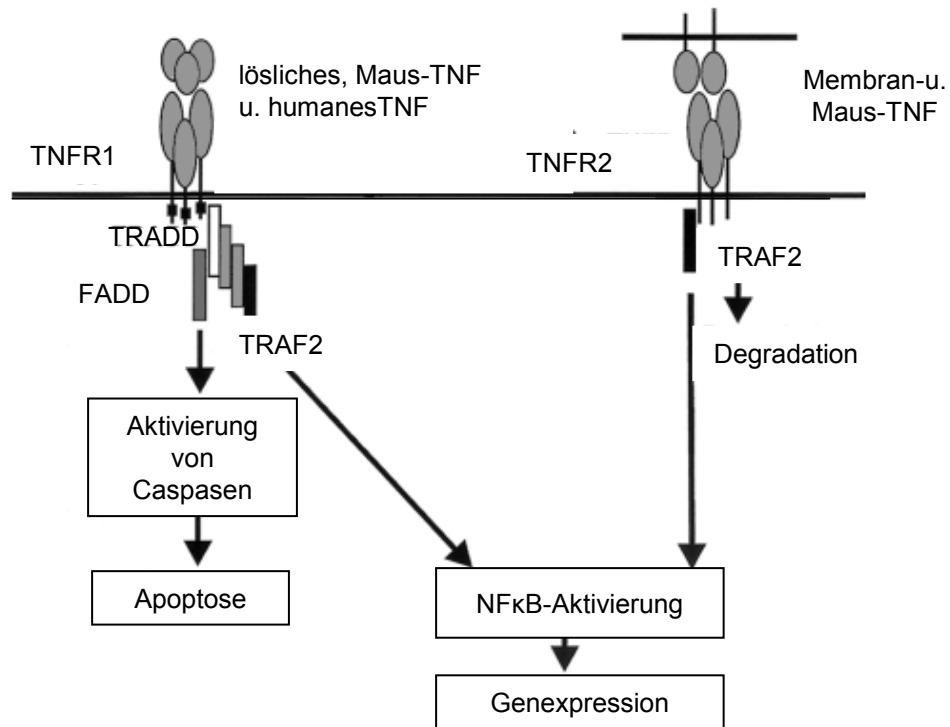
Im Jahre 1975 entdeckte man das Endotoxin-induzierte Glycoprotein TNF, wegen seiner Eigenschaft hämorrhagische Nekrose in implantierten Sarkomen auf Mäusen zu induzieren (Bradley 2008). TNF hat in Entzündungen, Infektionen und malignen Zuständen eine zentrale Rolle. In entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis oder der Psoriasis, kann durch neutralisierende Antikörper und durch TNF-bindende Rezeptoren (TNFR) Therapieerfolge verzeichnet werden. Dieser therapeutische Nutzen einer anti-TNF-Therapie geht einher mit einer erhöhten Infektionsanfälligkeit, die die wichtige Rolle von TNF in der Infektabwehr herausstellt.

TNF liegt membranständig oder nach proteolytischer Spaltung durch die Metalloprotease TACE (*TNF-alpha converting enzyme*) in löslicher Form vor. Sowohl das Membran-assoziierte, wie auch das lösliche TNF sind als Trimere aktiv, unterscheiden sich aber bezüglich ihrer unterschiedlichen Bindungsaffinität zu den zwei TNF-Rezeptoren (TNFR), TNFR1 und TNFR2, welche unterschiedlich auf Zellen und Geweben exprimiert sind. Während TNFR1 konstitutiv auf nahezu allen Zellen exprimiert ist, ist TNFR2 besonders auf hämatopoetischen Zellen zu finden, in denen er durch proinflammatorische Stimuli induziert wird (Seitz, Männel et al. 1998)

Lösliches TNF weist eine kleinere Dissoziationskonstante als das membrangebundene TNF auf und bindet bevorzugt am TNFR1, während die membrangebundene Variante von TNF die Bindung am TNFR2 bevorzugt (Grell, Becke *et al.* 1998; Grell, Wajant *et al.* 1998). Für die Forschung im Mausmodell kann man sich die spezieübergreifende selektive Bindung von rekombinantem humanem TNF an den TNFR1 in der Maus zunutze machen, wohingegen das rekombinant hergestellte Maus-TNF zur Aktivierung beider Rezeptoren führt (Lewis, Tartaglia *et al.* 1991).

Die Aktivierung der beiden TNF-Rezeptoren führt zu teils unterschiedlichen, teils überlappenden Signalwegen (Bradley 2008). Dies wird schon durch die unterschiedliche Aminosäuresequenz ihrer intrazellulären Rezeptordomänen deutlich. TNFR1 hat z.B. eine Todesdomäne (*death domain, DD*), die weitere Adapterproteine wie TRADD rekrutiert und somit zur Einleitung des apoptotischen und des proinflammatorischen NF- $\kappa$ B-Signalweges führt. TNFR2 hingegen leitet bei Ligandbindung seine Signale über Adapterproteine, wie z.B. TRAF2, wodurch die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Kern induziert wird. Dadurch wird das breite Wirkungsspektrum von TNF auf Zellen deutlich. So hat TNF einen Einfluss auf Tod, Überleben, Differenzierung, Proliferation und Migration von Zellen. Gefäßendothelien reagieren auf TNF durch Veränderungen, die die Leukozytenadhäsion, die transendotheliale Migration,

Gefäßschäden und schließlich die Bildung von Thrombosen begünstigen. Dies erklärt auch seine Bedeutung im septischen Schock (Männel und Echtenacher 2000). Die primäre Quelle für TNF in der Entzündung sind Monozyten und Makrophagen (Männel, Moore et al. 1980; Männel und Echtenacher 2000). TNF wird aber auch von Mastzellen, T- und B- Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, Neutrophilen oder Endothelzellen produziert (Männel und Echtenacher 2000).



**Abbildung 1: Das TNF-TNF-Rezeptor-System der Maus.** (modifiziert nach Hehlhans und Männel 2002)

## 1.3 Antiinflammatorische Mechanismen

Für diese Arbeit werden im Folgenden wichtige antiinflammatorische Mechanismen kurz erläutert. Sie sind zum einen wichtig für die Gegenregulation von Immunreaktionen, zum anderen werden sie in der entgleisten Immunantwort während der Sepsis für das klinische Bild der CARS verantwortlich gemacht. Die Gegenregulation von Entzündungsvorgängen findet auf verschiedenen Ebenen statt: Sie kann durch Generierung antiinflammatorischer Zellen erfolgen, aber auch durch Depletion von Nähr- und Signalstoffen, einem veränderten Zytokinprofil, der Regulation von entzündungsrelevanten Signalkaskaden, der Ausschüttung von Corticosteron und weiteren anderen Mechanismen.

### 1.3.1 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Regulatorische T-Zellen stellen eine Subpopulation der T-Zellen dar. Sie haben eine kontrollierende Funktion gegen Autoimmunität, allergischen Reaktionen indem sie T-Helferzellen in ihrer Aktivität hemmen (Hubert, Jacobs et al. 2007). Es gibt unterschiedliche regulatorische T-Zellen, die sich sowohl phänotypisch als auch funktionell voneinander unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Treg untersucht, die sich durch die Oberflächenmarker CD25 und CD4 sowie dem Transkriptionsfaktor FoxP3 auszeichnen. Im gesunden Organismus macht diese Zellpopulation zwischen 5 und 10% der CD4+ T-Helferzellen aus. Generiert werden diese Zellen im Thymus, und werden, im Gegensatz zu den in der Peripherie generierten regulatorischen Zellen, als „natürliche regulatorische T-Zellen“ bezeichnet. Die Regulatoren nehmen nach Entzündungen wie der CLP prozentual zu (Chen, Baumel et al. 2007).

Unklar ist, ob dies über die neue Generierung im Thymus oder durch die Induktion in der Peripherie vonstatten geht. Wie diese Zellen die Proliferation der korrespondierenden T-Zellen hemmen, ist noch unklar. Jedoch gibt es Ergebnisse, die die Suppressivität dieser Zellen erklären können. Die Gegenregulation der Aktivierung und Proliferation von Th-Zellen ist ein Zellkontakt-abhängiger und wahrscheinlich antigenunspezifischer Mechanismus. Es wurde für die Treg gezeigt, dass diese auf die zu supprimierende T-Zelle das aktivierungshemmende Transmittermolekül cAMP (zyklisches Adenosin-mono-Phosphat) übertragen (Bopp, Becker et al. 2007). Besonders gut supprimieren CD25+FoxP3+CD4+ regulatorischen T-Zellen wenn sie den TNFR2 (Valencia, Stephens et al. 2006; Chen, Subleski et al. 2008) auf ihrer Oberfläche tragen, weswegen der Einfluss von TNF auf diesen Zelltyp interessant ist.

### 1.3.2 IL-10 als Vertreter der antiinflammatorischen Zytokinantwort

Auf Zytokinebene kann sowohl die erniedrigte Expression proinflammatorischer Zytokine als auch die Produktion antiinflammatorischer Zytokine immunregulatorisch wirken. Unter den antiinflammatorischen Zytokinen ist IL-10 der klassische Vertreter. IL-10 wurde nach seiner Entdeckung noch als *cytokine synthesis inhibitory factor* bezeichnet (Fiorentino, Zlotnik et al. 1991). Das von Th2-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen produzierte Zytokin wirkt der Differenzierung proinflammatorischer Th1-Zellen entgegen.

Auch nach einer CLP geht parallel zur Erhöhung von IL-10 die Produktionsfähigkeit proinflammatorischer Zytokine zurück (Pollak 2006). IL-10 ist auch ein potenter Stimulus für natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (Mocellin, Panelli et al. 2003). Sind NK-Zellen aktiviert, haben sie eine verstärkte zytotoxische Aktivität, wodurch es zu einer vermehrten Freisetzung von bakteriellen Antigenen kommt. Dies wiederum aktiviert antigenpräsentierende Zellen (APC), die über *Pattern-Recognition-Rezeptoren* das Antigen aufnehmen und auf ihrer Oberfläche präsentieren. Ferner unterstützt IL-10 die Entzündungsreaktion über die Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen. Eine hohe IL-10-Expression während der Sepsis korreliert mit deren Mortalitätsrate (Neidhardt, Keel et al. 1997), weswegen IL-10 als ein interessanter Parameter für die Bestimmung des Immunstatus in der Sepsis diskutiert wird.

### 1.3.3 DUSP1 (dualspezifische Phosphatase 1) - ein Regulator der angeborenen Immunantwort

Sehr schnell nach einer Infektion kommt es zu einer massiven Zytokinproduktion vor allem von Makrophagen und DCs, welche Mikroorganismen bzw. deren Produkte über Muster-Erkennungs-Rezeptoren erkennen. Unter diesen Rezeptoren ist die Signalübertragung durch *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) am besten verstanden. TLR befinden sich auf der Zelloberfläche bzw. sind in intrazellulären Kompartimenten wie den Endosomen lokalisiert (Akira, Uematsu et al. 2006). Die Pathogenerkennung findet zwar über entsprechende Rezeptoren statt, doch wird die Transkription von für die Immunantwort wichtigen Genen auch auf der Ebene der Signalweiterleitung reguliert (Akira, Uematsu et al. 2006). Die Komponenten der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), zu welcher die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) und p38 MAPK gehören, aktivieren über Phosphorylierung von Serin- bzw. Threoninreste die Transkription proinflammatorischer Zytokine (Kyriakis und Avruch 2001). Bald nach den „Anschaltungen“ einer inflammatorischen Antwort wird die Dualspezifische Phosphatase-1 aktiv. Sie dephosphoryliert die zuvor phosphorylierten Proteine der

Signalweiterleitung (p38 MAPK), wodurch die Transkription der proinflammatorischen Zytokine gestoppt wird. Fehlt dieser Regulierungsmechanismus kommt es zu einer überschießenden Entzündung durch eine hohe Expression von TNF, IL-6 und IL-10, den kritischen Zytokinen in einer Sepsis (Chi, Barry *et al.* 2006; Hammer, Mages *et al.* 2006).

### **1.3.4 Immunregulation durch Depletion von Tryptophan**

Die Aktivität des intrazellulär lokalisierten Enzyms Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO) wirkt antiinflammatorisch. IDO ist das erste und zugleich limitierende Enzym im Abbau der für T-Zellen essentielle Aminosäure Tryptophan (Mellor und Munn 2004). IDO katalysiert die Spaltung des Indolringes von Tryptophan. Durch den Abbau von Tryptophan kommt es zur Entstehung der Metaboliten, die als Kynurenine bezeichnet werden (Grohmann, Fallarino *et al.* 2003). IDO wird über die Ligation von CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen mit dem Oberflächenrezeptor B7 auf CD8+DCs induziert (Fallarino, Grohmann *et al.* 2006). Da der IDO-Promotor unter der Kontrolle von Interferonen steht (Hassanain, Chon *et al.* 1993), führt auch eine IFN $\gamma$ -induzierende Stimulierung zu einer Aktivierung von IDO (Silva, Rodrigues *et al.* 2002). Die Induktion von IDO kann als antiinflammatorische Reaktion auf eine Entzündung gesehen werden, denn die Tryptophandepletion hemmt die T-Zellproliferation (Mellor und Munn 2004). Die Kataboliten von Tryptophan sind immunregulatorisch weil sie zur Induktion der Apoptose von Th1-Zellen führen (Fallarino, Grohmann *et al.* 2006), weshalb die Aktivität von IDO ein interessanter Parameter für die Sepsis darstellt.

## 1.4 Makrophagen Migrations-inhibitorische Faktor (MIF)

### 1.4.1 Entdeckung von MIF

Die Erstbeschreibung von MIF geht auf das Jahr 1966 zurück und war damit das erste beschriebene „Zytokin“. MIF hat eine eindrucksvolle Geschichte. Die zwei Forscher John David und Barry Bloom entdeckten unabhängig voneinander einen von T-Zellen produzierten Faktor, der die Makrophagen-Migration während der Hypersensitivitätsantwort hemmt. Diese Beobachtung führte zu dem noch heute gültigen Namen MIF (Bloom BR 1966; David 1966). Jedoch war zu dieser Zeit die Reinigung von biologisch aktiven Proteinen noch nicht weit entwickelt. Heute weiß man, dass der beobachtete Effekt auch auf eine Kostimulation mit IL-4, Interferon- $\gamma$  oder anderen Zytokinen, welche die Makrophagenmigration hemmen, zurückgeführt werden kann.

### 1.4.2 Die Bedeutung von MIF

Über MIF existieren eine Vielzahl kontroverser Beschreibungen, die auf seine diversen Funktionen zurückzuführen sind (Kudrin und Ray 2008). Dies macht eine eindeutige Einordnung von MIF schwierig. MIF wurde nicht nur als Zytokin eingestuft, sondern auch als ein hormonartiges Molekül, als ein Enzym mit atypischen Eigenschaften sowie als ein Thioredoxin-artiges Protein.

MIF wird von nahezu allen Zellen produziert, unabhängig ob sie epithelialen, mesenchymalen oder endothelialen Ursprungs sind. Besonders hohe Expressionsraten findet man im Immunsystem, aber auch in Leber, Niere und Gehirn. MIF ist ein hoch konserviertes 12,5 kDa schweres Protein. Homologe von MIF findet man in Pflanzen, Nematoden und Vertebraten (Swope, Sun *et al.* 1998). Diese hohe evolutionäre Konservierung von MIF bestärkt die Annahme, dass dieses Protein eine große biologische Bedeutung hat. In dieser Arbeit wird MIF, unter dem Aspekt seiner ersten Einteilung, als Zytokin untersucht.

Das große klinische Interesse an MIF ist auf seine hohe Expression in vielen Erkrankungen zurückzuführen. Man findet hohe MIF-Werte im entzündeten Gewebe, in vielen Tumoren, aber auch bei Erkrankungen des Stoffwechsels wie der Atherosklerose, Diabetes oder Adipositas (Lan, Mu *et al.* 1996; Makita, Nishimura *et al.* 1998; Rossi, Haslett *et al.* 1998; Leech, Metz *et al.* 1999; Shimizu, Abe *et al.* 1999; Tanino, Makita *et al.* 2002; Schober, Bernhagen *et al.* 2004). Auf genetischer Ebene korrelieren Polymorphismen im MIF-Gen mit Erkrankungen wie der

rheumatoiden Arthritis (Ichiyama, Onodera *et al.* 2004) oder der chronischen Gastritis (Arisawa, Tahara *et al.* 2007).

### 1.4.3 Der Rezeptor von MIF

Die Besonderheit von MIF liegt schon in seiner Struktur, die interessanterweise keinerlei Homologie zu irgendeinem anderen proinflammatorischen Zytokin aufweist (Kudrin und Ray 2008). Über molekulare Mechanismen, die seine biologischen Aktivitäten verursachen, wird noch viel spekuliert.

Schwer gestaltete sich auch die Suche nach dem Rezeptor von MIF. Ausgiebige Bindungsstudien, die neben natürlichem MIF auch modifizierte Formen von MIF benutzten, konnten trotz größter Mühen lange keinen Oberflächenrezeptor finden, an den MIF bindet. Es wurde vermutet, dass die Wirkungen von MIF rezeptorunabhängig seien und die Effekte wahrscheinlich auf Endozytose zurückzuführen wären (Kleemann, Grell *et al.* 2002). 2003 konnte schließlich gezeigt werden, dass MIF an die Extrazellulärdomäne von CD74 auf Makrophagen bindet (Leng, Metz *et al.* 2003). CD74 wird von APC als ein Bestandteil des MHCII-Komplexes exprimiert. Ein Teil von CD74 kommt auf der Zellmembran vor. Dort wirkt es als ein Chaperon, das die Peptidbeladung des MHCII-Kompartiments unterstützt (Stumptner-Cuvelette und Benaroch 2002). Drei Jahre später wurde CD44, ein weit verbreitetes Transmembranprotein mit kinaseaktivierender Eigenschaft, als ein integraler Bestandteil des CD74-Rezeptorkomplexes beschrieben. Für die Wirkung von MIF werden beide Epitope benötigt: die extrazelluläre Domäne von CD74 scheint somit für die MIF-Bindung und CD44 für die Signalweiterleitung wichtig zu sein (Siegler, Meyer *et al.* 2004; Shi, Leng *et al.* 2006). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation von CD74 auf der Zelloberfläche die Wirkung von MIF reduziert (Sanchez-Nino, Sanz *et al.* 2009).

### 1.4.4 Die Wirkung von MIF

Will man den aktuellen Stand der Wissenschaft über die Wirkung von MIF wiedergeben, stößt man, wie bereits erwähnt, auf kontroverse Befunde. Über Jahre wurde primär die proinflammatorische Wirkung von MIF publiziert (Cvetkovic 2006). Werden Makrophagen mit MIF stimuliert, so wird z.B. TLR4 hochexprimiert, proinflammatorische Zytokine wie TNF und IL-8, Nitrit und Matrix Metalloproteasen induziert. Im adaptiven Immunsystem stimuliert MIF die T-Zellaktivierung und Proliferation über die Freisetzung von IL-2 und IFN $\gamma$  und steuert die

zytotoxische Aktivität der CD8+Lymphozyten und die Antikörperproduktion der B-Zellen. (Abe, Peng et al. 2001).

In den letzten Jahren häufen sich Publikationen, in denen die proinflammatorische Wirkung von MIF nicht gesehen wird. Kudrin *et al.* (Kudrin, Scott *et al.* 2006) konnte mit speziellem Endotoxin-freiem, rekombinantem MIF zeigen, dass sich mit MIF-Stimulierung von Fibroblasten und Monozyten keine, mit Ausnahme von IL-8, proinflammatorischen Zytokine induzieren lassen. Die bekannte proinflammatorische Wirkung trat bloß dann ein, wenn zur Stimulierung mit MIF niedrige Mengen LPS zugegeben wurden.

Dieses facettenreiche Bild über die Wirkung von MIF findet man auch in Studien, die die MIF-defiziente Maus zur Untersuchung der MIF-Wirkung einsetzten. Eine Salmonellen-Infektion ist für MIF-defiziente Mäuse wegen deren Unfähigkeit eine angemessene Th1-Antwort zu induzieren, mit erhöhter Letalität verbunden (Koebernick, Grode *et al.* 2002). Auch in Versuchen, die darauf abzielten in diese Mäuse eine TNF-Expression durch die Belastung mit LPS oder dem *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B zu induzieren, schlug fehl (Bozza, Satoskar *et al.* 1999)

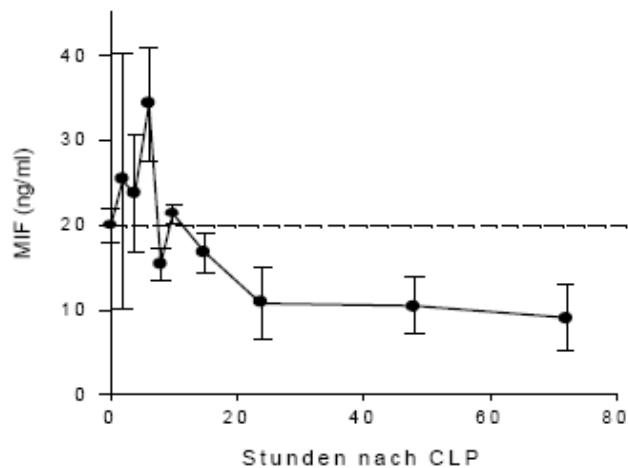
Doch eine andere Publikation verweist darauf, dass sich die MIF-defizienten Mäuse im LPS-induzierten Schock sich bezüglich der Mortalität und der TNF-Produktion nicht von Wildtyp-Mäusen unterscheiden (Honma, Koseki *et al.* 2000). Aber es wurde auch gezeigt, dass MIF-defiziente Mäuse nach einer Belastung mit dem leberschädigenden Lectin Concanavalin-A mehr TNF exprimieren (Stojanovic, Cvjeticanin *et al.* 2009).

Weitere Untersuchungen sind nötig, um der Wirkung von MIF auf die Spur zu kommen.

### **1.4.5 MIF in der Sepsis**

Diese Arbeit beruht auf Vordaten, die zeigten, dass MIF in der sepsisinduzierten Immunparalyse die Mortalität einer bakteriellen Sekundärinfektion reduziert (Pollak, Sterns *et al.* 2005). Die Sepsis kann in der Maus durch CLP ausgelöst werden. Bei der CLP wird ein Stück des Blinddarms abgebunden und perforiert. Austretende Keime führen erst zu einer lokalen, dann zu einem systemischen Erkrankungsbild mit einer anschließenden erhöhten bakteriellen Empfindlichkeit, ähnlich der klinischen Sepsis (Echtenacher, Freudenberg *et al.* 2001). Erhöhte MIF-Werte lassen sich neben proinflammatorischer Zytokine wie TNF und IL-6 innerhalb weniger Stunden im Blut operierter Mäuse nachweisen. Nach einem Konzentrationsmaximum fällt der MIF-Spiegel ab und bleibt für Tage unterhalb des physiologischen Serumspiegels (Calandra, Echtenacher *et al.* 2000; Pollak, Sterns *et al.* 2005). Eine bakterielle Zweitbelastung

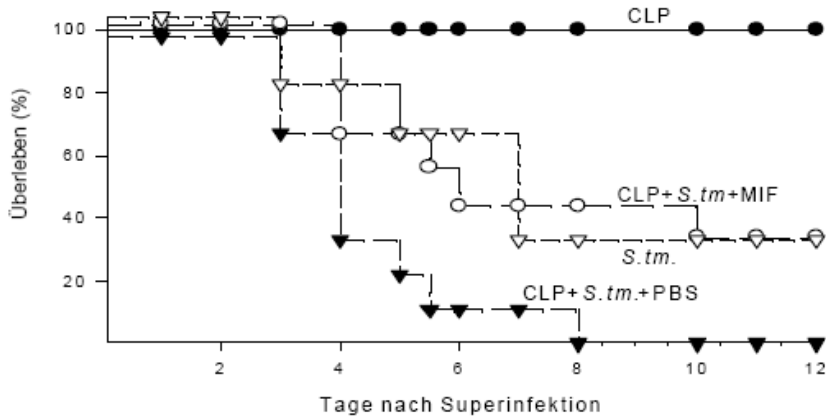
führt in diesem Zustand zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Tiere, die aber durch eine sechs Stunden zuvor durchgeführte MIF-Behandlung gemindert werden kann. MIF wurde in diesem System als ein Gegenspieler der Glucocorticoidinduzierter Immunsuppression angesehen, indem es die TNF-Antwort verbesserte. Dies könnte über die Aufhebung der Hemmung des NF- $\kappa$ B Signalweges erfolgen, wodurch in Folge proinflammatorische Zytokine als Reaktion auf die Zweitbelastung wieder produziert werden könnten (Daun und Cannon 2000).



**Abbildung 2: MIF-Serumspiegel im zeitlichen Verlauf nach einer CLP**

(modifiziert nach Pollak, Sterns et al. 2005)

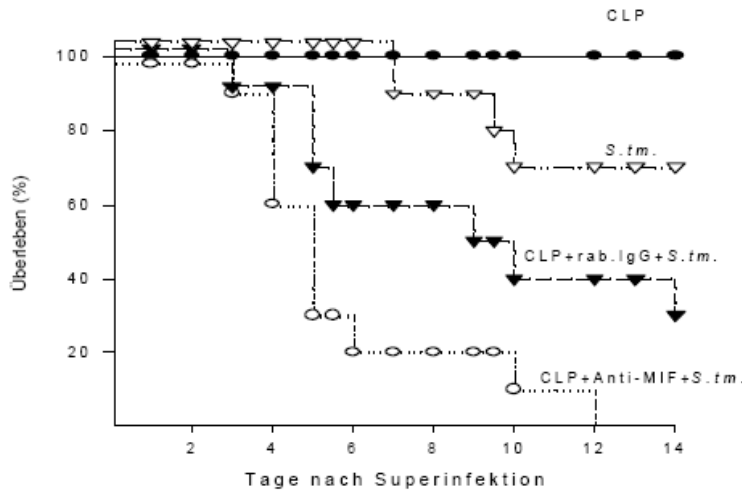
Zwei Tage nach der CLP kommen die Mäuse in die sogenannte Immunparalyse, die sich wie in der Klinik in einer erhöhten Empfindlichkeit auf eine bakterielle Sekundärinfektion zeigt. In unserem Mausmodell bedeutet dies, dass die Tiere eine erhöhte Mortalität nach einer bakteriellen Zweitinfektion haben. Publierte Daten unserer Arbeitsgruppe (nach Pollak, Sterns *et al.* 2005) zeigen, dass die MIF-Verabreichung am zweiten Tag nach einer CLP vor einer bakteriellen Sekundärinfektion zu einem deutlich verbesserten Überleben der Mäuse führt (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Exogenes MIF senkt die Mortalitätsrate von Mäusen in der Sepsis-induzierten Immunparalyse einer Sekundärinfektion mit *S. tm.***

( modifiziert nach Pollak, Sterns et al. 2005)

Wird allerdings, wie in Abbildung 4 dargestellt, MIF zum Zeitpunkt der sepsisinduzierten Immunparalyse durch eine Antikörper-Behandlung neutralisiert, so werden die anschließend infizierten Mäuse noch empfindlicher für eine Sekundärinfektion mit Bakterien.



**Abbildung 4: MIF-Neutralisation in der CLP-induzierten Immunsuppression erhöht die Empfindlichkeit für eine nachfolgende bakterielle Infektion.**

( modifiziert nach Pollak, Sterns et al. 2005)

## 1.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wird der schützende Effekt von MIF in der Immunparalyse untersucht. Hierfür soll der Immunstatus nach der CLP mit Fokus auf antiinflammatorische Mechanismen, genauer charakterisiert werden. CLP ist ein klinisch relevantes Mausmodell für septische Peritonitis und eignet sich daher gut Einblicke in das komplexe Geschehen der Immunantwort auf eine systemische bakterielle Infektion zu gewinnen.

Es war bekannt, dass Mäuse nach CLP eine erhöhte Empfindlichkeit für bakterielle Sekundärinfektionen zeigen, die durch eine Vorbehandlung mit MIF jedoch reduziert werden kann. Was die Ursachen für die Mortalität nach der Zweitinfektion sind, und wie diese durch MIF beeinflusst werden, war unbekannt. Bisher wurde MIF noch eindeutig als ein proinflammatorisches Zytokin deklariert, was zu der Annahme führte, dass MIF über eine Induktion von TNF wirkt.

Um eines Tages MIF eventuell in der Klinik an immunsupprimierten Patienten einsetzen zu können, sollte der Schutzmechanismus von MIF in dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Dafür war es notwendig Parameter zu suchen, die durch die CLP verändert sind. Für die Immunparalyse werden vor allem solche Mechanismen verantwortlich gemacht, die eine angemessene Keimabwehr nicht mehr zulassen. Das machte für diese Studie, neben der Untersuchung der TNF-Induktion, die Erfassung antiinflammatorischer Mechanismen wie z.B. der Expression von IL-10, die Generierung von regulatorischen T-Zellen oder den Einfluss vonIDO interessant. Darüber hinaus sollte die Bedeutung von TNF auf die Generierung und Funktion von natürlichen regulatorischen T-Zellen, als ein durch MIF beeinflusster Mechanismus, untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

LSRII, Durchflusszytometer	BD Bioscience, Heidelberg
Begasungsbrutschrank – Cell Safe	Integra Biosciences, Baar, CH
ELISA Reader	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorfcups (1,5ml /2ml)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Plastik-Pistil	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	Labor Schubert, Schwandorf
Fusion®	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Gewebekulturschalen	BD Bioscience, Heidelberg
Kanülen	BD Bioscience, Heidelberg
Laminair Flow HB 2448– Sterilbank	Heraeus, Hanau
MACS Separation Columns 25 LS	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Neubauer Zählkammer	Brand, Gießen
Parafilm®	American National Can Company
Pipetten, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg
Spritzen (1ml, 5ml, 10ml, 20ml)	BD Bioscience, Heidelberg
Ultra Turrax	IKA Labortechnik, Staufen
Waagen: Sartorius R16OP	Sartorius, Göttingen
Sartorius L2200S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen: Beckmann J2-21 M/E Zentrifuge	Beckmann, München
Beckmann L-70 Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Wundklammern nach Michel 7,5x1,75mm	Tierärztebedarf Lehnecke
Zentrifugenröhrchen (15, 50ml)	Falcon, Heidelberg
Zellsiebe (Cellstrainer)	Falcon, Heidelberg

## 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
ABTS Substrat Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fitc-Beads (Fluoresbrite®Microparticles)	Polysciences, Warrington PA, USA
EDTA	Promega, Mannheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamycin	ICN, Meckenheim
GolgiStop®	Becton Dickinson, Heidelberg
Heparin-Natrium 25 000	Ratiopharm, Ulm
HEPES	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Human-TNF, rekombinant	BASF, Ludwigshafen
Ketaminhydrochlorid 5%	WDTeG Garbsen
LPS ( <i>E. coli</i> 0137:38)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
β-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH)	biomol, Hamburg
Nuclease free water	Promega, Madison, USA
Oligo-dT Primer	Promega, Madison, USA
PCR-Puffer, 10x conc.	Roche Diagnostics, Mannheim
RNaseZAP®	Ambion, Austin, USA
RPMI 1640-Pulvermedium	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Fluka, Buchs, CH
Xylazinhydrochlorid 2%	WDTeG Garbsen

Alle nicht aufgeführten Lösungsmittel (p.A.) wurden von der Firma Merck (Darmstadt), die nicht aufgeführten Feststoffe (p.A.) von der Firma Sigma Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

### 2.1.3 Kits

anti-mouse/rat Foxp3 Staining Set (PE und FITC-gekoppelt)	eBioscience, San Diego, USA
Cytofix/Cytoperm ®	BD Bioscience, Heidelberg
Corticosteron ELISA	DRG Diagnostics, Marburg
ELISA, zu Detektion von: IL-6	R&D Systems, Wiesbaden
IL-10	R&D Systems, Wiesbaden
m IFN $\gamma$	R&D Systems, Wiesbaden
TMB Substrat Reagent Set	BD, Heidelberg
Reverse Transcription System	Promega, Madison, USA

### 2.1.4 Antikörper

anti-Maus-IL-12/p40-APC (C15.6)	BD Bioscience, Heidelberg
anti-IL-6-Fitc (MP6-XT22)	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Maus CD25-APC (PC61)	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Maus CD25-PE (PC61)	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Maus CD3-FITC (17A2)	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Maus CD4-FITC (L3T4)	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Maus CD4-Parcific Blue (L3T4)	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Maus CD4-PE (L3T4)	BD Bioscience, Heidelberg
anti-TNF-APC (MP6-XT22)	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Maus-CD11b-Fitc (M1/70)	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Maus-CD11c-PE (N418)	BD Bioscience, Heidelberg
CD4 Isolation-Micro Beads, mouse	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
CD90 Micro Beads, mouse (Thy1.2)	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
anti-Maus-CD28 (35.71)	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Maus-CD3 $\epsilon$ (2C11)	BD Bioscience, Heidelberg
anti-Maus-Fc $\gamma$ -Rezeptor II/III (2.4G2)	eigene Herstellung
anti-Maus-IgG (whole molecule)	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-Maus-IgG1	BD, Heidelberg
anti-Maus-IgG2a	BD, Heidelberg
rat IgG2a, $\kappa$ -PE	BD, Heidelberg

### 2.1.5 DUSP1-Primer

Die Synthese des verwendeten DUSP1-Primerpaares erfolgte über die Firma Metabion (Martinsried). Die Primer wurden in der PCR in einer 1:20 Verdünnung eingesetzt, so dass ihre Endkonzentration 10 pmol/ml betrug.

DUSP1, forward	5'CTG TCA GGC ACA CTA GTA CTC-3'
DUSP1, reverse	5'TTC TCC AAG GAG GAT ATG AAG C3'

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

Blockierlösung für ELISA	1% BSA in PBS
Erythrozyten-Lyse-Puffer	50ml 0,17 M NH <sub>4</sub> Cl, 20 mMHEPES
FACS-Waschpuffer	2% FCS in PBS
Griess-Reagenz (frisch hergestellt)	1 Teil: 1% Sulfanylamid 5% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +1Teil 0,1% Naphthyl- Ethylendiamin-dihydrochlorid
MACS-Puffer (entgast)	500ml PBS 0,5% BSA 2mm EDTA
PBS (pH 7,3)	137mm NaCl 6,5mm Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 1,5mm KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7mm KCl
PBS-T	500 µl Tween 20 in 1l PBS
TRIS (pH7,4)	140 mM NaCl 16 mM Trjs H2O
TBST	500µl Tween 20% in 1l TBS

### 2.1.7 Enzyme

Collagenase D	Roche Diagnostics, Mannheim
Flavin-adenin-diphosphat (FAD)	Sigma Aldrich, Steinheim
Lactat Dehydrogenase (LDH)	Sigma Aldrich, Steinheim
Malat-Dehydrogenase (MDH)	Sigma Aldrich, Steinheim
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim

### 2.1.8 Zytokine

MIF	rekombinantes humanes MIF, in <i>E.coli</i> exprimiert und endotoxinfrei gereinigt, freundlicherweise von der Firma Novartis, Wien, zur Verfügung gestellt.
-----	---

Soweit nicht anders angegeben, wurde dieses MIF in den Versuchen verwendet.

Zudem wurden folgende MIF-Quellen verwendet:

mMIF	eigenes, in S2-Zellen exprimiertes murines MIF
hMIF	eigenes, in S2-Zellen exprimiertes humanes MIF
MIF (B)	rekombinantes humanes MIF, in <i>E. coli</i> exprimiert und auf LPS-gereinigtes, geprüftes MIF, freundlicherweise von Prof. Bernhagen, RWTH Aachen, zur Verfügung gestellt
mTNF	Peprotech
hTNF	<i>E. coli</i> exprimiertes, endotoxinfreies Material freundlicherweise von der Firma Novartis zu Verfügung gestellt

### 2.1.9 Bakterien

*Pseudomonas aeruginosa* (PA 103) (*P.a.*)

Pettenkofer Institut, München

*Escherichia coli* (ATCC 25922) (*E.c.*)

Uniklinikum, Greifswald

*Salmonella typhimurium* (ATCC 14028s) (*S. tm*)

Pettenkofer Institut, München

### 2.1.10 Kulturplatten für Bakterien

Frischblut Agar (*E. coli*)

LB-Amp-Agar (*S. tm.*)

McConkey Agar (*P. a.*)

Alle verwendeten Kulturagarplatten wurden im Medizinisch-Mikrobiologischen Institut der Uniklinik Regensburg hergestellt.

### 2.1.11 Mäuse

C57BL/6 Wildtyp

Janvier, Le Genest, Frankreich

C57BL/6 TNFR2 -/-

(Erickson, de Sauvage et al. 1994),

Eigenzucht

NMRI

Janvier, Le Genest, Frankreich

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Tierexperimentelle Methoden**

#### **2.2.1.1 Haltung**

Die Mäuse wurden in einem konventionellen Tierlabor entsprechend den Bedingungen des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten.

#### **2.2.1.2 Anästhesie**

Die zu operierenden Tiere wurde mit einer Lösung aus 15% Ketamin 5% (Ketaminhydrochlorid) und 8% Xylazin 2% (Xylacinhydrochlorid) in PBS in einer Dosierung von 10µl/g Maus i.p. anästhesiert. Zur Überprüfung der vollständigen Anästhesie wurde der Drucktest an der Hinterpfote durchgeführt.

#### **2.2.1.3 CLP**

Nach der Anästhesie wurde der Bauchbereich der Maus mit Ethanol (70%) desinfiziert und eine ungefähr 1cm lange Laparotomie entlang der Linea alba durchgeführt. Der Blinddarm wurde aus dem Bauchraum entnommen und auf ein Stück Parafilm® gelegt, um eine Kontamination mit Keimen zu vermeiden.

Für die subletale CLP wurden 30% des Appendix vom distalen Ende her mit einem Baumwollfaden abgebunden. Die Perforation des abgebundenen Darmabschnitts erfolgte mittels einer sterilen Kanüle (0,4mm Durchmesser).

Nachdem der Blinddarm wieder in das Peritoneum gebracht wurde, erfolgte der Verschluss mit 3-5 Wundklammern. Die operierte Maus wurde in Rückenlage zurück in einen Käfig mit frischer Einstreu gelegt.

#### **2.2.1.4 Induktion einer Primär- bzw. Sekundärinfektion**

Die Primär- und Sekundärinfektion wurden bei den drei verwendeten Keimen folgendermaßen

induziert: *P. a.*, suspendiert in 30µl PBS, intratrachiale Applikation

*S. tm*, suspendiert in 1ml PBS, intraperitoneal injiziert

*E. coli*, suspendiert in 1ml PBS, intraperitoneal injiziert

#### **2.2.1.5 Überlebenskurven**

Zur Erstellung von Überlebenskurven wurden täglich die verstorbenen Mäuse registriert.

Tiere, die das Experiment überlebt hatten, wurden am Ende des Experiments durch zervikale Dislokation getötet.

#### **2.2.1.6 OVA-Immunisierung**

Die Immunisierung erfolgte subkutan in beide Hinterpfoten. Je Hinterpfote wurden 50µl einer Mischung aus 25µl PBS mit 16,6µg Ovalbumin 1:1 mit Imject® Alum als Adjuvans appliziert.

#### **2.2.1.7 Organentnahme**

Für die Organentnahme wurden die Mäuse durch Genickzug getötet, das Fell mit Ethanol (70%) desinfiziert und das gewünschte Organ semisteril herauspräpariert und abhängig von der weiteren Verwendung in PBS/2% FCS auf Eis bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Zur späteren Quantifizierung von mRNA wurde das Organ auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf -80°C gelagert.

#### **2.2.1.8 Gewinnung von Serum**

Zur Gewinnung von Serum wurden die narkotisierten Mäuse retroorbital geblutet. Das Blut wurde zunächst auf Eis gestellt und anschließend für eine vollständige Gerinnung über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde der Blutkuchen für 5 Minuten bei 14 000 rpm abzentrifugiert und die obere Phase, das Serum abpipettiert und, falls nicht gleich weiter analysiert, bei -20°C gelagert.

### **2.2.1.9 Gewinnung von Plasma**

Zur Gewinnung von Plasma wurden die narkotisierten Mäuse retroorbital in ein Eppendorfgefäß geblutet, in das 10µl Heparin für etwa 500µl Blut, vorgelegt waren. Das Blut lagerte zunächst auf Eis, und wurde anschließend für 5 Minuten bei 14 000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase, das Plasma, wurde abpipettiert und falls nicht gleich weiter analysiert, bei – 20°C gelagert.

## **2.2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Collagenase-Verdau**

Der Collagenase-Verdau wurde vor der weiteren Verarbeitung zur quantitativen Gewinnung von Makrophagen und Dendritischen Zellen durchgeführt. Dazu wurde das Organ mit 1mg/ml Collagenase D in FCS-freiem Medium für 20 Minuten auf 37°C inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 10µl 0,5M EDTA-Lösung. Nach der Zugabe von etwa 30ml Medium wurde zur Gewinnung von Einzelzellen das Organ vorsichtig mit Hilfe der Rückseite einer sterilen Spritze durch ein Zellsieb gedrückt. Die Zellen wurden mit Medium auf 50ml aufgefüllt. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt und bei Bedarf wurde eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt.

### **2.2.2.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension**

Eine Zellsuspension hielt man, indem das jeweilige Organ entweder sorgfältig durch ein Metall-Zellsieb gedrückt oder mit Hilfe von sterilen Pinzetten ausgestrichen wurde.

### **2.2.2.3 Erythrozyten-Lyse**

Um die Erythrozyten zu entfernen, wurde zunächst die Zellsuspension bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 3-5ml Ery-Lyse-Puffer für 8 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Gewaschen wurden die Zellen indem das Falcon mit FC 2% in PBS aufgefüllt und zentrifugiert worden ist. Die Zellen sind mit gewünschtem Puffer zur weiteren Verarbeitung resuspendiert, und durch ein steriles Plastik-Zellsieb zur Entfernung von Zelldebris filtriert worden.

#### 2.2.2.4 Einstellung auf definierte Zellzahlen

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstests in der Neubauer-Zahlkammer ermittelt. Dazu wurde die Zellsuspension abhängig von ihrer Zelldichte mit der Trypanblau-Lösung verdünnt. Diejenigen Zellen, die sich hierbei nicht anfärben ließen, wurden als lebende Zellen gezählt. Die Zellkonzentrationen wurden folgendermaßen ermittelt:

Mittlere Zellzahl der ausgezählten Quadranten  $\times$  Verdünnungsfaktor  $\times 10^4 =$  Anzahl der Zellen pro ml.

#### 2.2.2.5 Anreicherung von Zellen

Je nach Zellart wurden die Zellen über Adhärenz (Makrophagen) oder aus einer Kombination von einer ersten Anreicherung durch MACS (*Magnetic-Activated Cell Sorting*) und einer weiteren Erhöhung der Zellreinheit durch die anschließende durchflusszytometrische Sortierung aus einer Einzelzellsuspension isoliert.

##### 2.2.2.5.1 Anreicherung von Makrophagen

Für die Anreicherung von Makrophagen nutzt man deren Eigenschaft an Kulturschalen zu adhären. Der Aufarbeitung von Milzzellen zur Analysierung von Makrophagen ging ein Collagenaseverdau voraus. Im Weiteren wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Zur Anreicherung wurde eine definierte Milzzellzahl z.B.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Medium in Zellkulturschalen ausgesät. Diese Zellen wurden für 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Diese Zeit reicht aus, dass Makrophagen in der Kulturschale haften bleiben. Der Überstand wurde abgesaugt und die adhären Zellen zweimal mit Medium gewaschen. Für die weitere Stimulierung wurde Medium mit dem entsprechenden Stimulus zu den Makrophagen gegeben und die Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

##### 2.2.2.5.2 MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting)

Zur Anreicherung von Primärzellen wurden die Zellen aus dem Lymphknoten bzw. der Milz aufbereitet und deren Zellzahl bestimmt. Im Anschluss wurden sie pelletiert und pro  $1 \times 10^8$  Zellen  $900 \mu\text{l}$  PBS /2% FCS und  $100 \mu\text{l}$  der entsprechenden Micro-Beads zugegeben. Die Inkubation mit den Magnet-gekoppelten Beads erfolgte für 20 Minuten auf Eis. Die Zellen wurden anschließend in  $50 \text{ml}$  MACS-Puffer gewaschen, über ein Zellsieb filtriert und möglichst luftblasenfrei in  $3 \text{ml}$  MACS-Puffer resuspendiert. Die Aufreinigung der mit magnetischen Micro-Beads versehenen

Zellen erfolgte durch Bindung an eine im magnetischem Feld befindliche MACS Separations-Säule, die vorher mit MACS-Puffer equilibriert wurde. In drei Waschschrinen mit jeweils 3ml MACS-Puffer wurden die unspezifisch haftenden Zellen von der Säule gespült. Nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt worden war, konnte die angereicherte Fraktion eluiert, mit PBS /2% FCS rekonstituiert und gezählt werden.

CD4+Zellen gewann man über einen MACS-Schritt mit einem CD4+Isolationskit. Nach einer Oberflächenfärbung der Zellen gegen die CD4 und CD25 wurden die Zellen am ARIA-Durchflusszytometer in die Fraktionen CD4+CD25+ (Treg) und CD4+CD25-(Treg-depetierte T-Helferzellen, Responder-T-Zellen) sortiert. Die anitgenpräsentierenden Zellen erhielt man durch Depletion der CD90+Zellen mittels MACS.

Die Reanalysen der nach MACS-Separation erhaltenen Zellfraktionen sowie die der Gesamtmilzpopulation erfolgten mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

#### 2.2.2.5.3 Zellsortierung

Die Sortierung der aus der Milz bzw. aus den Lymphknoten gewonnenen und mittels MACS angereicherten CD4+T-Zellen erfolgte am ARIA-Durchflusszytometer. Dabei wurden die Zellen mit einer Reinheit von nahezu 100% gewonnen.

#### 2.2.2.6 Markierung von Zellen mit CFSE-Färbung

Für die Bestimmung der Proliferation von Zellen im Durchflusszytometer, eignet sich der Fluoreszenzfarbstoff CFSE, der sich an die DNA anlagern kann. Bei jedem Zellteilungsschritt verdoppelt sich die DNA und dementsprechend halbiert sich die CFSE-Intensität. Diese Abnahme kann durchflusszytometrisch gemessen werden. Dabei verhält sich das Ausmaß der Proliferation indirekt proportional zur CFSE-Intensität.

Die zu markierenden Zellen wurden auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in PBS/2% FCS eingestellt. Der in DMSO gelöste CFSE-Farbstoff wurde zu den Zellen pipettiert (Endkonzentration 2  $\mu$ M), 10 Sekunden auf dem Vortexer gemischt und für 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem 5-fachen Volumen an eiskaltem PBS/2% FCS versetzt und gewaschen. Die Zellen wurden auf die gewünscht Zellzahl eingestellt und zusammen mit den gewünschten Stimuli in Kultur genommen.

### **2.2.2.7 Zellkulturbedingungen**

Um eine Kontamination der Zellen zu vermeiden, wurde mit sterilen Materialien unter der Sterilbank gearbeitet. Die Kultivierung von Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% Luftfeuchte in einem Begasungsbrutschrank.

### **2.2.3 Durchflusszytometrie**

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden mit dem Gerät LSR II der Firma BD durchgeführt. Die Auswertung mit dem Programm FACSDiva™ 6.0 vorgenommen.

#### **2.2.3.1 Oberflächenfärbung**

Zur Oberflächenfärbung wurde die gesiebte Einzelzellsuspension auf FACS-Röhrchen verteilt ( $2 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  Zellen), bei 300g für 7 Minuten pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Gegebenenfalls erfolgte ein Blockierschritt, durch den unspezifische Bindungen der Antikörper verringert werden sollten. Dies geschah mit 50µl eines spezifischen Antikörpers gegen die Fcγ-Rezeptoren I und II in PBS/2% FCS für 20 bis 30 Minuten. Die Oberflächenmarkierung erfolgte mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern in einem Probevolumen von 50-100µl.

Nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen durch Zugabe von 2ml FACS-Puffer gewaschen. Nach Resuspension in 100µl FACS-Puffer wurden die Zellen gemessen oder, wenn später gemessen wurde, durch die Zugabe von weiteren 100µl Paraformaldehyd 4% fixiert, und bis zur Messung bei 4°C im Dunklen gelagert.

#### **2.2.3.2 Intrazelluläre Färbung**

Die intrazelluläre Färbung erfolgte immer im Anschluss an die Oberflächenfärbung.

##### **2.2.3.2.1 Färbung von FoxP3**

Für die folgende intrazelluläre Färbung wurden die Zellen mit Hilfe des anti-mouse/rat Foxp3 Färbe-Kit je nach Oberflächenfärbung nach Angaben des Herstellers fixiert, permeabilisiert sowie mit einem PE bzw. dem FITC-markierte Foxp3-Antikörper gefärbt. Zur Kontrolle wurde eine Isotypkontrolle mit dem entsprechend gleich markierten Flurochrom mitgeführt.

#### 2.2.3.2.2 Färbung von Zytokinen

Die restimulierten Zellen wurden für 4 Stunden im Medium mit gewünschtem Stimulus und dem GolgiStop® (nach Herstellerangaben) bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe vom GolgiStop® wird verhindert, dass produzierte Zytokine über den Golgiapparat die Zellen verlassen.

So stimulierte Zellen wurden mit Cytotfix/Cytoperm® nach Herstellerangaben fixiert und für die darauf folgende intrazelluläre Färbung mit fluorochrom-markierten Antikörpern permeabilisiert. Nach dem Waschen der Zellen mit Perm/Wash-Puffer wurden die Zellen für 30 Minuten mit dem entsprechenden Antikörper bei 4°C im Dunklen inkubiert. Eine Isotypkontrolle mit dem entsprechenden Fluorochrom wurde stets mitgeführt.

### 2.2.4 Funktionelle Untersuchung von Zellen

#### 2.2.4.1 Restimulierung zur Abrufung der Zytokinproduktionsfähigkeit

Die gewünschte Zellzahl wurde unter gewählter Stimulierung, abhängig vom zu untersuchendem Zelltyp, in Zellkulturschalen bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

#### 2.2.4.2 Bestimmung der Zellproliferation

Für die Bestimmung der Zellproliferation wurde eine 96-Loch-Rundbodenplatte über Nacht bei 4°C mit 1 µg/ml anti-CD3 Antikörper beschichtet, bevor  $1 \times 10^6$  Zellen/ml pro Loch ausgesät und ein löslicher anti-CD28 Antikörper in einer Konzentration von 2 µg/ml dazu gegeben wurden. Die Proliferation wurde nach 48 Stunden durch Ausdünnung des Fluoreszenzfarbstoffes CFSE der CFSE-markierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt

#### 2.2.4.3 Bestimmung der suppressiven Aktivität

Für die Bestimmung der suppressiven Aktivität der CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen wurden die CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen und die CD4+CD25- Responder-T-Zellen aus der Milz bzw. den Lymphknoten nach Herstellung einer Einzelzellsuspension mit Erythrozytenlyse durch MACS erst angereichert, dann für bessere Reinheit im ARIA-Durchflusszytometer sortiert. Für einen adäquaten T-Zellstimulus wurden die Rundboden-Zellkulturplatten über Nacht im Kühlschrank mit einem anti-CD3-haltigen Tris-Puffer (0,1µg/ml αCD3; 50mm Tris, pH 8,8) inkubiert. Vor dem Aussäen der Zellen ist der Überstand abgesaugt worden. Die antigenpräsentierenden Zellen (APC) wurden zu ( $1 \times 10^5/50\mu\text{l}$ ) wurden zusammen

mit  $5 \times 10^4$  CFSE-markierten Responder-T-Zellen/50 $\mu$ l vorgelegt. Im Anschluss wurden die sortierten  $2,5 \times 10^4$  regulatorischen T-Zellen in 50 $\mu$ l zupipettiert. Weitere 50 $\mu$ l Medium bzw. im Falle einer zusätzlichen Stimulierung Medium mit dem entsprechenden Stimulus wurden zugegeben. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde die Proliferation der CFSE-markierten T-Helferzellen nach einer Oberflächenfärbung mit einem fluorochrommarkierten Antikörper gegen CD4 durchflusszytometrisch bestimmt.

Als Negativkontrolle wurden CD4+Responder verwendet, die zwar mit APC, nicht aber mit den Antikörpern gegen CD3 stimuliert wurden. Die CD4+Responder der Positivkontrolle wurden mit beiden Stimuli inkubiert. Zu den jeweiligen Kontrollzellgruppen wurden keine regulatorischen T-Zellen pipettiert.

#### **2.2.4.4 Bestimmung der Phagozytoserate von Makrophagen**

Über die Quantifizierung von intrazellulär angereicherten FITC-Latex-Beads wurde die Phagozytoserate von adhärierenden Zellen bestimmt. Zur Bestimmung der Phagozytoserate wurden  $2,5 \times 10^7$  Milzzellen/3ml Medium für 2 Stunden bei 37°C über Adhärenz in einer 6-Loch-Zellkulturplatte angereichert. Zweimaliges Spülen mit Medium dient zur Entfernung der nichtadhärenten Zellen. Der Zellrasen wurde mit 3ml Medium mit 1 $\mu$ l FITC-Latex-Beads/ml Medium zusammen mit 50ng/ml IFN $\gamma$  und 100ng LPS/ml Medium zur Phagozytose für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die FITC-Beads-Aufnahme der Zellen wurde mittels Durchflußzytometriemessung bestimmt.

#### **2.2.5 Anzucht der Keime**

##### **2.2.5.1 *Escherichia coli* ATTC 25922**

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte nach einer Animpfung von LB-Medium über Nacht im Erlenmeyerkolben bei 37°C auf dem Schüttler. Am nächsten Tag wurde frisch überimpft und nach 2-3 Stunden erneut inkubiert. Die nochmalige Anzucht wurde durchgeführt, um die Zellen möglichst in der Wachstumsphase ernten zu können.

##### **2.2.5.2 *Salmonella enterica* Serovar thyphimurium ATCC 14028s**

Zur Kultivierung von *S. tm* wurde ampicillinhaltiges (100 $\mu$ l/ml) LB-Medium von einem Glycerolstock *S. tm*, der bei -80°C gelagert wurde, angeimpft. Die über Nacht bei 37°C auf dem

Schüttler gezogenen Bakterien wurden erneut in frisches Medium überimpft und für weitere 2-3 Stunden bis zur logarithmischen Wachstumsphase vermehrt. Die Bakteriensuspension wurde bei 2400 rpm zentrifugiert, das Pellet mit PBS gewaschen und mit PBS zu eine  $OD_{600}=1,0$  verdünnt.

### **2.2.5.3 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Die Anzucht von Pseudomonaden erfolgte nach einer Animpfung von LB-Medium über Nacht im Schikanekolben bei 37°C auf dem Schüttler. Am nächsten Tag wurde frisch überimpft und 2-3 Stunden bis zur logarithmischen Wachstumsphase vermehrt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (10 min, 24 000 rpm) und für eine weiter Stunde, mit einem zuvor durch HCl auf pH 6 eingestellten LB-Medium, bei 37°C geschüttelt. Letzteres führt zu einer standardisierten Bakterienkultur (mündliche Überlieferung, Neuhauser).

### **2.2.5.4 Einstellung und Bestimmung von koloniebildenden Bakterieneinheiten (KFU)**

Für die Infektion der Mäuse wurde mit PBS die gewünschte Zellzahl eingestellt. Zur Überprüfung wurden log<sub>10</sub> Verdünnungsreihen hergestellt und diese auf Blutagarplatten (*E. coli*), McKonkey (*P. a.*) bzw. XLD-Agarplatten (*S. tm*) ausplattiert.

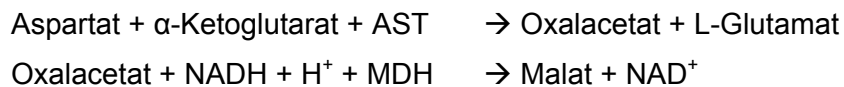
Nach einer Bebrütung bei 37°C über Nacht konnte die genaue Menge koloniebildender Keime (KFU) bestimmt und auf die tatsächlich verabreichte Menge rückgerechnet werden.

## 2.2.6 Biochemische Methoden

### 2.2.6.1 Aktivitätsbestimmung der Leber-Aminotransferasen (ALT/AST)

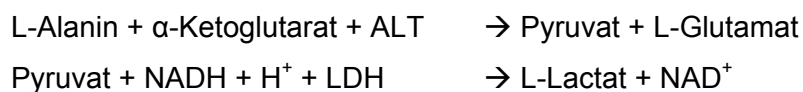
Die Bestimmung der Aminotransferaseaktivität erfolgte bei Raumtemperatur. Als Ausgangssubstrat wurde zur Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase (AST) 100µl Aspartat-Puffer (190mm in 0,1M Phosphatpuffer) zusammen mit 2µl NADH (12nM) und 0,2µl Malatdehydrogenase (MDH 2mg/ml) sowie 2µl Serumprobe in eine 96-Lochplatte pipettiert. Die Enzymreaktion wurde unmittelbar vor der Messung zügig durch die Zugabe von 4µl  $\alpha$ -Ketoglutarat (0,6M) gestartet. Im Abstand von 30 Sekunden wurde die Absorption bei 340nm aufgezeichnet. Zur Auswertung dienten diejenigen Messwerte, welche bei abnehmender Absorption bis zum Stillstand der Reaktion entstanden waren.

Folgende Reaktion findet dabei statt:



Dementsprechend wurde auch die Menge der Alanin-Aminotrasferase (ALT) bestimmt. Als Ausgangssubstrat diente dabei 100µl L-Alanin (1,1M in 0,05M Phosphatpuffer), das wiederum mit 2µl NADH (12mm) und 2µl Serumprobe versetzt wurde. Als katalysierendes Enzym wurde 0,4µl Lactatdehydrogenase (LDH 5mg/ml) dazu gegeben. Für den Reaktionsstart wurden 5µl  $\alpha$ -Ketoglutarat (0,2M) zu den übrigen Substanzen pipettiert. Die Absorbtiionsabnahme erfolgte analog der von AST.

Für die Umsetzung der Substrate durch ALT gilt folgende Reaktionsgleichung:



In beiden Fällen wurde der enzymatisch katalysierte Umbau von NADH + H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup> bei 340nm photometrisch vermessen. Dabei ist die Absorptionsabnahme direkt proportional zur Enzymmenge AST bzw. ALT.

Die Enzymkonzentration, die letztendlich in der Serumprobe vorliegt, wurde mit folgender Formel berechnet:

Enzymkonzentration [U/ml] =  $[V / (\epsilon\text{NADH} \times d \times p)] \times \Delta E/\text{min.}$

V = Volumen der Küvette (1,082ml)

$\epsilon\text{NADH}$  = 6,32 l/(mmol x cm)

d = Schichtdicke der Küvette (1cm)

p = Probenvolumen

$\Delta E/\text{min.}$  = Absorptionsabnahme

### 2.2.6.2 Nitrit-Messung

Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde jeweils  $2,5 \times 10^7$  Milzzellen in eine 12-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 1 Stunde Adhärenz wurden die Zellen zur Entfernung nicht adhärenter Zellen 3x mit PBS gewaschen. In Gegenwart von 50ng/ml IFN $\gamma$  und 100ng/ml LPS wurden die so gewonnenen Zellen für 3 Tage stimuliert. Zur Nitritbestimmung wurde der Überstand 1:1 mit Griess-Reagenz gemischt und bei 550nm gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Verdünnungsreihe mit Natriumnitrit mitgeführt.

### 2.2.6.3 Ovalbuminspezifischer ELISA

Hierzu wurde eine 96-Loch-Mirkotiterplatte verwendet, die mit 100 $\mu$ l einer Ovalbumin-Lösung (10 $\mu$ g Ovalbumin/ml PBS) über Nacht bei 4°C beschichtet worden war. Nach dem Waschen der Platte mit TBST erfolgte für 1-2 Stunden ein Blockierschritt mit 5% Magermilchpulver, gelöst in PBS. Die Probenauftragung erfolgte in einer log<sub>2</sub>-Verdünnung. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 4 Stunden bei Raumtemperatur, wurde die Probenplatte erneut gewaschen. Als nächstes wurde der entsprechende Detektions-IgG-Antikörper aufgetragen. War der Detektionsantikörper mit der alkalischen Phosphatase gekoppelt, so wurde mit dem AP-Puffer entwickelt, die Messung am ELISA-Reader erfolgte dann bei einer Wellenlänge von 540nm. Für Meerrettichperoxidase gekoppelten Detektionsantikörper wurde mit der TMB-Substratlösung entwickelt, nach der Farbreaktion mit 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung abgestoppt und bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen.

Zur Quantifizierung der ovalbuminspezifischen Antikörper wurde ein Kontrollserum mitgeführt. Das Kontrollserum setzte sich aus einem Pool von Seren aus ovalbuminimmunisierten Mäusen zusammen und diente zur Berechnung der relativen ELISA-Units (rEU). Die relativen ELISA-Units repräsentieren das Verhältnis der im ELISA gemessenen optischen Dichte (OD) im Serum von Versuchstieren zu einem als Kontrolle eingesetztem Serum.

## **2.2.7 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.7.1 Arbeiten mit RNA**

Bei allen Arbeitsschritten, die der Gewinnung von RNA dienten wurde stets darauf geachtet Kontamination mit RNAsen zu vermeiden. Der Arbeitsplatz wurde vorher mit RNaseZAP® behandelt. Des weiteren kamen nur sterile Glaswaren, Plastikreaktionsgefäße, sterile, autoklavierte Pipettenspitzen und Lösungen zum Einsatz. Wasser wurde mit 0,1% Diethylprocarbonat versetzt, kräftig geschüttelt, über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag vier Stunden bei 121°C autoklaviert (DEPC-Wasser). Das zu isolierende Gewebe wurde nach der Entnahme sofort auf flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Isolierung auf -80°C gelagert.

### **2.2.7.2 Präparation der Gesamt-RNA**

Zur Gewinnung von RNA aus dem Gewebe wurde Trizol® verwendet. Dafür wird das noch gefrorene Gewebe mit 1ml Trizol® versetzt und sofort auf Eis mit einem sauberen Pistill homogenisiert. Im Anschluss erfolgte ein Inkubationsschritt dieser Mischung für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Dem zersetzten Gewebe wird 100µl Chloroform zugegeben, die Mischung mehrfach invertiert. Nach 8 Minuten Inkubation wurde der Ansatz bei 4°C, 14000g für 15 Minuten zentrifugiert. Die oberen Phase versetzt man in einem neuen Eppendorf-Gefäß 1:1 mit eiskaltem Isopropanol, invertierte dies und gab die Mischung für mindestens 30 Minuten auf -20°C. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt nach oben genannten Bedingungen, was zu einem RNA-Pellet führte. Das Pellet wurde, um Phenolrückstände zu entfernen, mit 500µl eiskaltem Ethanol 70% gewaschen. Nach der Entfernung des Überstands wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, dann mit 50-100µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch mit einer Anregungswelle von 260nm.

### 2.2.7.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription werden mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) aus mRNA die komplementären DNA-Kopien (complementary DNA, cDNA) synthetisiert. Um die Menge der mRNA über die quantitative PCR bestimmen zu können wurde jeweils 1µg RNA pro Ansatz in einer reversen Transkriptions-PCR in cDNA umgeschrieben. Eine Mischung aus 1µg RNA mit 2µl oligo-dt-Primern (0,5µg/µl) und H<sub>2</sub>O ad 10µl wurde für 5 Minuten bei 65°C präinkubiert. Zu diesem Ansatz wurde ein Mastermix aus folgenden Teilen zugegeben.

#### Mastermix:

MMLV RT 5xPuffer	2µl
MMLV (-) Point (200U/ml)	0,5µl
dNTP (10mM)	2µl
H <sub>2</sub> O	ad 10µl

Der Reaktionsansatz wurde erst für 10 Minuten auf 37°C, anschließend für 30 Minuten auf 42°C gehalten. Eine Erhitzung auf 85°C, 5 Minuten, diente zur Inaktivierung der Transkriptase.

### 2.2.7.4 Quantitative PCR

Für quantitative PCR wird mit der cDNA der zuvor umgeschriebenen mRNA verwendet. Mit entsprechenden Primerpaaren lässt sich das Verhältnis des zu untersuchenden Genprodukts zu einem konstitutiv exprimierten Kontrollgens ermitteln. Neben entsprechenden Primerpaaren wurde der Polymerase-Mastermix iQ<sup>TM</sup>SYBR® Green Supermix verwendet. Dieser enthält einen DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green. Dieser wird bei der Amplifikation der cDNA eingelagert. Überschreitet das Amplikon einen Schwellenwert so kommt es bei einer Anregungswellenlänge von 498nm zu einem Lichtsignal. Der Amplifikationszyklus bei dem das Lichtsignal der Probe erstmals von PCR-Gerät registriert wird, ist der *threshold cycle*. Dieser Amplifikationszyklus ergibt den CT-Wert, der zu Berechnung der cDNA-Menge verwendet wird.

Die cDNA der jeweiligen Probe wurde 1:5 vorverdünnt und davon jeweils 5µl zu 20µl Mastermix dazugegeben.

Mastermix:

iQ™SYBR® Green Supermix	12,5µl
Primer, forward	1µl
Primer, reverse	1µl
H <sub>2</sub> O	ad 20µl

Die quantitative PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

1. DNA-Denaturierung 95°C, 3 Minuten
2. DNA-Denaturierung (40 Zyklen)  
Primer-Annealing und Elongation 56°C, 1 Minute
3. Termination 95°C, 1 Minute
4. Vorbereitung zur Schmelzkurve 55°C, 1 Minute
5. Schmelzkurve (in 0,5°C Schritten) 55°C-95°C

Zur Effizienzüberprüfung wurde eine Verdünnungsreihe einer cDNA-Probe mitgeführt, von der bekannt war, dass die zu quantifizierenden Gene exprimiert sind. Die Berechnung der relativen mRNA-Expression erfolgte nach der Pfaffl-Methode (Pfaffl 2001)

### 2.2.8 Statistik

Soweit nicht anders angegeben, wurden Einzeltiere verwendet. Dargestellt sind die Einzelwerte der Mäuse mit dem Mittelwert bzw. der Mittelwert mit der Standardabweichung der Werte. Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen bei Auswertung von Einzelmäusen wurden mit dem Mann-Whitney U Test bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4.

Die statistische Überprüfung der Überlebenskurven erfolgte mit dem Kaplan-Meier Test mit dem Programm SPSS 14.0.

Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ .

## 3. Ergebnisse

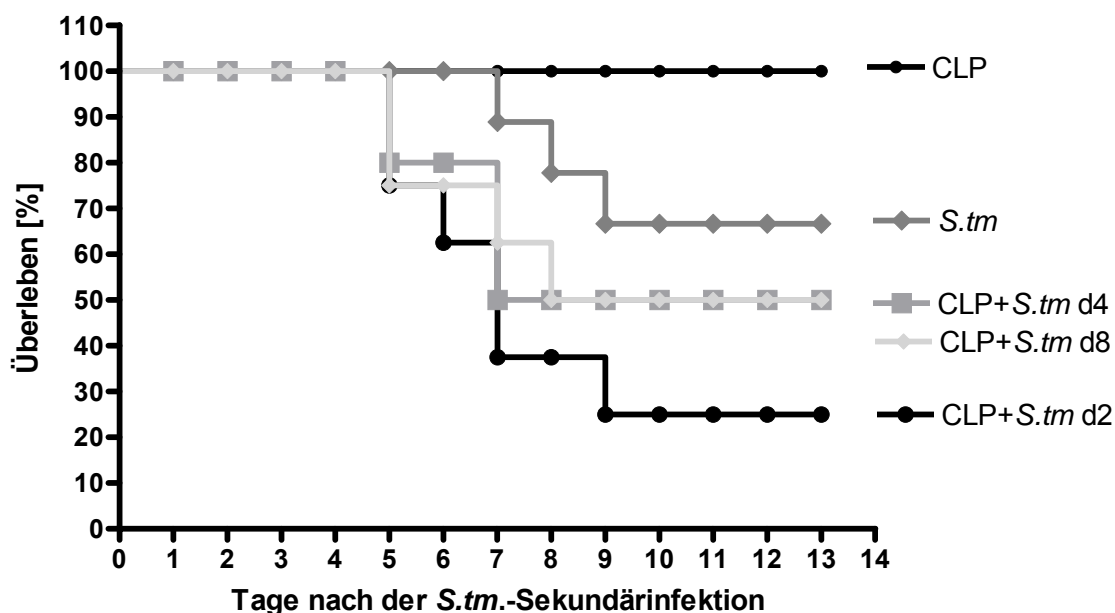
### 3.1 Immunstatus im experimentellen Modell der CLP

Eine Vorbehandlung mit MIF schützt Mäuse in der sepsisinduzierten Immunparalyse vor den Folgen einer Zweitinfektion (Pollak, Sterns *et al.* 2005). Um der Frage nachzugehen, wie dieser Schutz durch MIF induziert wird, war es wichtig den Immunstatus mit dem Fokus auf antiinflammatorische Mechanismen nach der CLP zu erfassen. Die CLP ist ein klinisch relevantes Mausmodell für die septische Peritonitis. Durch die Ligation und Perforation des Blinddarms kommt es zu einer Abszessbildung mit bakterieller Translokation, die eine systemische Entzündungsreaktion erzeugt (Echtenacher, Freudenberg *et al.* 2001). Dies bedingt, dass Mäuse 2 Tage post-CLP eine Immunparalyse haben, die sich durch das schlechtere Überleben einer bakteriellen Zweitbelastung zeigt.

#### 3.1.1 Überprüfung der Immunparalyse

##### 3.1.1.1 *Salmonella typhimurium*-Sekundärinfektion

Da diese Arbeit auf der Immunparalyse nach der CLP aufbaut, wurde die Gültigkeit dieses Mausmodells für die weitere Charakterisierung der immunologischen Vorgänge überprüft. Ein Indikator für die Immunparalyse ist die hohe Mortalität bei einer bakteriellen Infektion, die normalerweise gut überlebt wird. Um die Immunparalyse zu zeigen, wurden an NMRI-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten vor der intraperitonealen Infizierung mit dem mauspathogenem Keim *S. tm*, eine CLP durchgeführt und das Überleben der Tiere beobachtet.

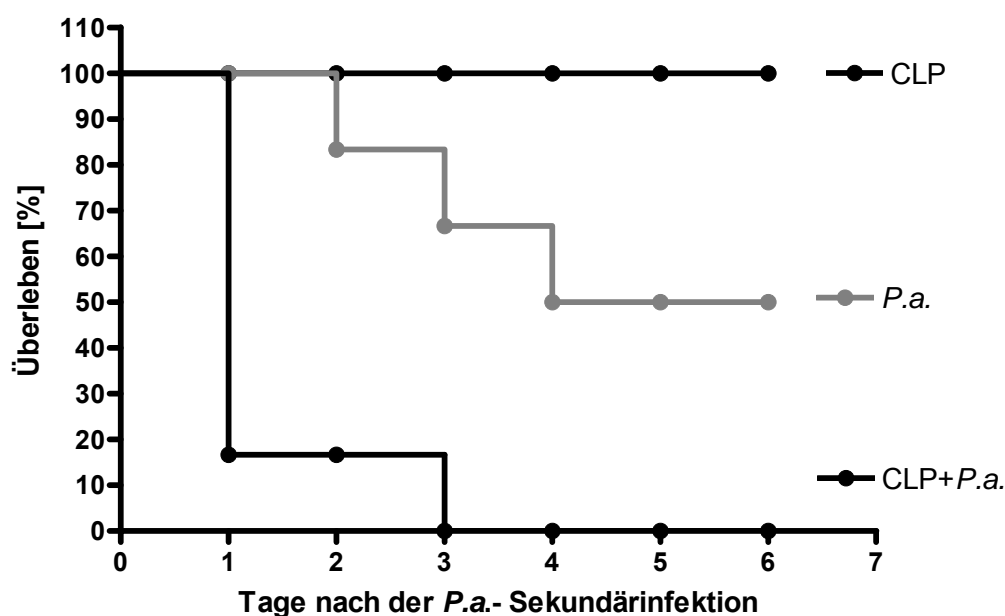


**Abbildung 5: Immunparalyse nach *S. tm*-Sekundärinfektion an verschiedenen Tagen nach CLP**  
 An NMRI-Mäusen wurde 2, 4 und 8 Tage, bevor sie mit *S. tm*  $4 \times 10^3$  i.p. infiziert wurden, eine CLP durchgeführt. Die CLP-Gruppe wurde nicht infiziert und die *S. tm*-Gruppe nicht operiert. Die Anzahl der verstorbenen Mäuse wurde mit Todeszeitpunkt notiert.  
 (n = 8 – 11 NMRI-Mäuse pro infizierter Gruppe, CLP-Gruppe ohne Sekundärinfektion n=4)

Die Abbildung 5 stellt den zeitlichen Verlauf nach der *S. tm*-Infektion dar. Dabei zeigt sich, dass die alleinige Durchführung einer CLP von allen Mäusen überlebt wurde. Die Infektion mit *S. tm*, führte zum Sterben der Tiere zwischen dem 7. und 9. Tag nach der Infektion. Ohne eine vorangegangene CLP überlebten die Mäuse die Infektion zu 67%. Deutlich früher starben die Mäuse, wenn sie vor der Infektion eine CLP erfahren hatten. So war die bakterielle Belastung am Tag 2 nach CLP für 75% der eingesetzten Tiere letal. Dieser Effekt war weniger stark ausgeprägt, wenn die CLP länger zurücklag. Tiere die am 4. und 8. Tag nach der CLP belastet wurden, überlebten die anschließende Sekundärinfektion zu 50%. Am 2. Tag nach der CLP hatten die Mäuse die höchste Wahrscheinlichkeit an einer *S. tm*-Sekundärinfektion zu sterben.

### 3.1.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*-Sekundärinfektion

Die Gültigkeit der CLP-induzierten Immunparalyse sollte mit einem weiteren Keim in der Mauslinie C57Bl/6 reproduziert werden. Hierfür wurden die Tiere nach der Operation mit *P. a.* infiziert und ihr Überleben beobachtet. Der für die Sekundärinfektion gewählte Keim *P. a.* ist ein typischer Vertreter nosokomialer Infektionen. Nicht selten führen intensivmedizinische Eingriffe zu einer Infektion mit diesem Bakterium, das gerade in immunsupprimierten Patienten die Entstehung einer Sepsis begünstigt (Astal 2004).



**Abbildung 6: Immunparalyse gezeigt bei einer *P. a.*- Sekundärinfektion am Tag 2 nach CLP**

2 Tage nach CLP wurden C57BL/6-Mäuse mit  $6 \times 10^5$  KFU *P. a.* intratrachial infiziert. Das Überleben der Mäuse wurde an den folgenden Tagen notiert. Zur Kontrolle wurde die CLP-Gruppe nicht mit *P. a.* infiziert, die *P. a.*-Gruppe nicht operiert. (n=6 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

Der paralytische Immunität am 2. Tag nach einer CLP konnte auch mit einem weiteren Überlebensversuch nach einer Sekundärinfektion mit einer *P. a.*, wie in Abbildung 6 gezeigt, bestätigt werden. Die *P. a.*-Infektion von Mäusen am Tag 2 nach einer CLP war für 84% der eingesetzten Tiere letal. Die doppelt belasteten Tiere starben innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Infektion. Zu diesem Zeitpunkt lebten noch alle Tiere, die nur die bakterielle Infektion

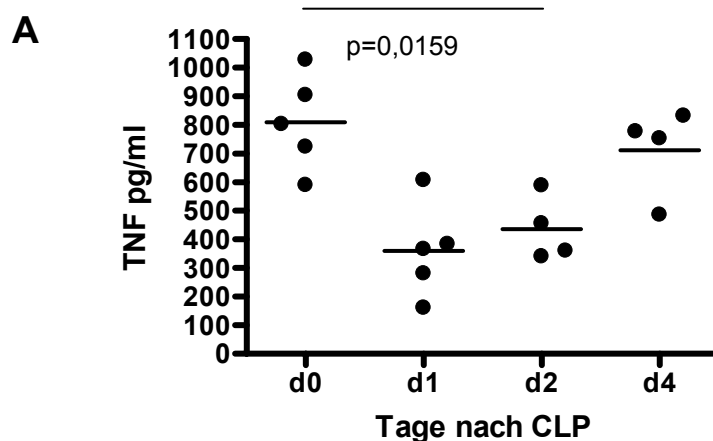
bekamen. Am 3. Tag waren alle infizierten CLP-Mäuse tot. Kontrollen, die nur infiziert worden waren, überlebten die Pseudomonaden-Infektion zu 50%. Die Immunparalyse am Tag 2 nach der CLP zeigt sich somit auch bei einer *P. a.*-Sekundärinfektion in C57Bl/6-Mäusen.

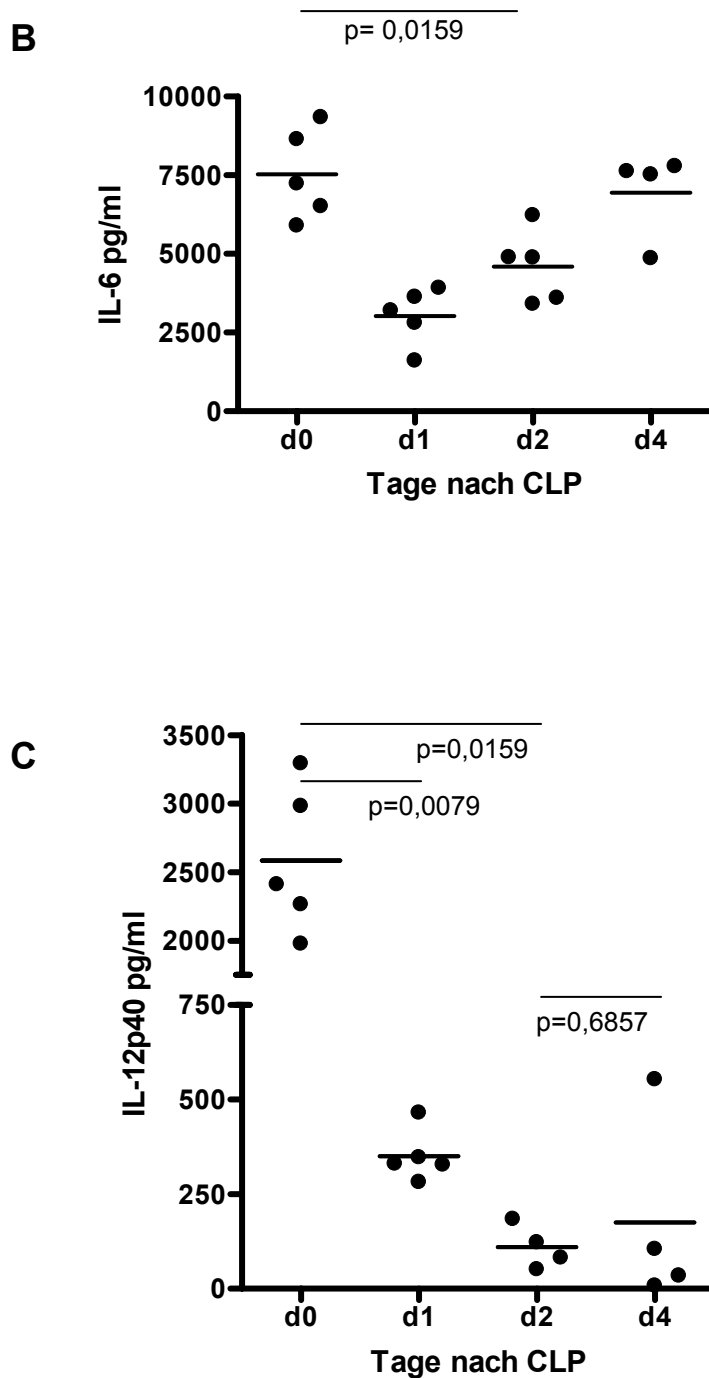
### 3.1.2 Zytokinproduktion nach Restimulierung der Milz

Zur Bestimmung des Immunstatus nach der CLP sollte die Zytokinproduktionsfähigkeit der Milzzellen untersucht werden. Die Milz wurde als lymphoides Organ zu Untersuchungen immunologischer Veränderungen der Peripherie ausgewählt.

#### 3.1.2.1 Produktionsfähigkeit von TNF, IL-6 und IL-12

Charakteristisch für eine CLP-induzierten Immunparalyse ist die Abnahme der Produktionsfähigkeit proinflammatorischer Zytokine (Pollak 2006). Dies sollte nach Restimulation von Milzzellen aus Mäusen, die eine CLP an den vorangegangenen Tagen erfahren hatten, überprüft werden. Die Zytokine TNF, IL-6 und IL-12 wurden dafür im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt.





**Abbildung 7: Produktionsfähigkeit von TNF, IL-6 und IL-12 an verschiedenen Tagen nach CLP**

$1 \times 10^6$  Milzzellen von NMRI-Mäusen wurden am Tag 1, 2 und 4 nach einer CLP mit  $5 \mu\text{g/ml}$  CpG über Nacht restimuliert. In den Kulturüberständen wurden mittels ELISA die Zytokine TNF (A), IL6 (B) und IL-12p40 (C) quantifiziert. (n=4-5 NMRI-Mäuse pro Gruppe)

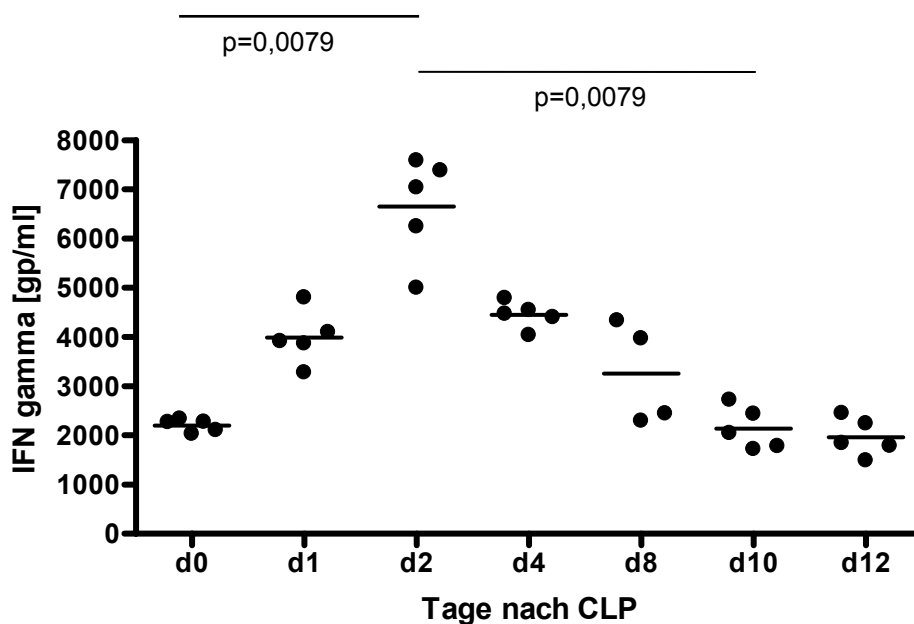
Nach CLP ist die Produktionsfähigkeit für die proinflammatorischen Zytokine TNF, IL-6 und IL-12 erniedrigt (Abbildung 7). Milzzellen naiver Mäuse ließen sich gut zur Produktion von TNF stimulieren (A). Die Kulturüberstände wiesen etwa 8ng TNF/ml auf. Schon innerhalb von 24 Stunden nach der CLP nahm die Produktionsfähigkeit für TNF deutlich ab. Das 2 Tage nach CLP produzierte TNF der Milzzellen der naiven Mäuse war signifikant erniedrigt, stieg aber bis zum 4. Tag nach der CLP wieder an.

Das proinflammatorische Zytokin IL-6 nahm wie TNF in den Kulturüberständen von Zellen aus Mäusen nach einer CLP ab. Diese Abnahme war für die Zellen aus Mäusen 2 Tage nach der CLP signifikant. Nach 2 weiteren Tagen nahm die Produktionsfähigkeit für dieses Zytokin wieder zu (B).

Im gleichen Maße wie TNF und IL-6 reduziert sich die Produktion von IL-12 signifikant, gezeigt durch dies durch die Restimulierung der Milzzellen aus Mäusen, die eine CLP erfuhren. Im Gegensatz zu den beiden zuvor analysierten Zytokinen, kann man 4 Tage nach CLP, noch keine Verbesserung der Zytokinproduktion von IL-12 durch Milzzellen feststellen.

### **3.1.2.2 Produktionsfähigkeit von IFN $\gamma$**

Des Weiteren sollte die IFN $\gamma$ -Produktionsfähigkeit von T-Zellen nach der CLP untersucht werden. IFN $\gamma$  ist ein Indikator für die T-Zellaktivität, es wird von aktivierten T-Zellen produziert (Abbas und Lichtman 2005). Es wurden Milzzellen an verschiedenen Tagen nach der CLP isoliert und für 2 Tage zusammen mit Antikörper gegen CD3 und CD28 in Kultur genommen. Mit der Zugabe dieser Antikörper sollte der TCR und sein Korezeptor auf den T-Zellen aktiviert werden. Die exprimierte IFN $\gamma$ -Menge wurde mittels ELISA bestimmt.



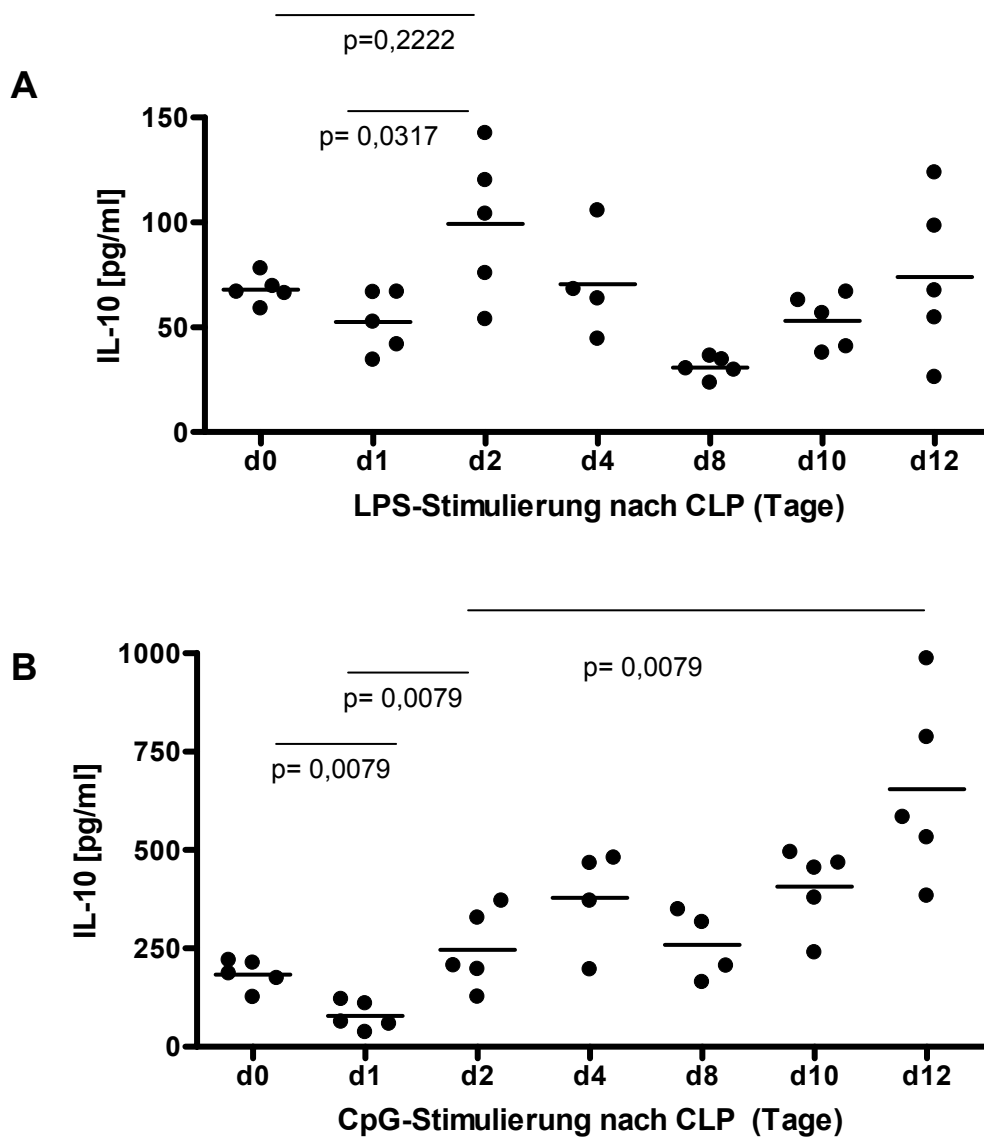
#### Abbildung 8: IFN $\gamma$ -Produktionsfähigkeit an verschiedenen Tagen nach CLP

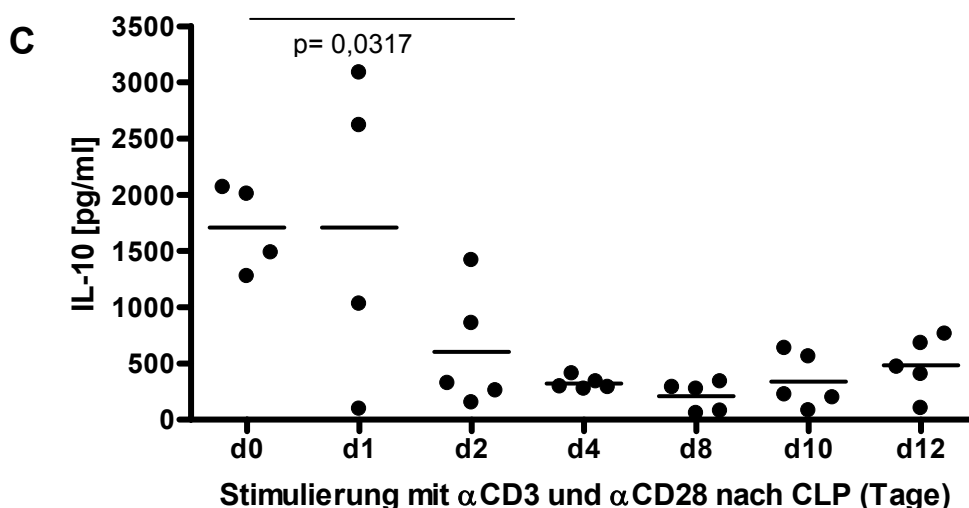
An NMRI-Mäusen wurde 1, 2, 4, 8, 10, und 12 Tage vor der Milzentnahme eine CLP durchgeführt. Jeweils  $1 \times 10^6$  Milzzellen wurden mit  $1 \mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{CD3}$  und  $2 \mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{CD28}$  für 48 Stunden stimuliert, die Überstände abgenommen und mittels ELISA die produzierte IFN $\gamma$  Menge bestimmt. (n=4-5 NMRI-Mäuse pro Gruppe)

Die Abbildung 8 zeigt, dass die maximale Produktionsfähigkeit für IFN $\gamma$  am Tag 2 nach der CLP vorliegt. Dieses Maximum ist im Vergleich zur IFN $\gamma$ -Produktion von Zellen aus naiven Tieren, welche etwa  $2200 \text{ pg/ml}$  IFN $\gamma$  in den Kulturüberstand sezernieren, signifikant. Die IFN $\gamma$ -Menge verdoppelte sich, wenn die Mäuse am Tag zuvor eine CLP bekommen hatten. Ab dem 2. Tag nach CLP nimmt die IFN $\gamma$ -Produktion stetig ab, um am 10. Tag wieder auf dem Niveau der unbehandelten Mäuse zu sein.

### 3.1.2.3 Produktionsfähigkeit von IL-10

IL-10, ein Mediator der antiinflammatorischen Immunantwort, sollte deshalb nach unterschiedlicher Stimulierung von Milzzellen aus Mäusen nach einer CLP untersucht werden. Für die Stimulierung der antigenpräsentierenden Zellen wurde LPS, ein Membranbestandteil, Gram(-) -Bakterien, bzw. CpG verwendet. T-Zellen wurden die Antikörper gegen CD3 und CD28 stimuliert.





#### Abbildung 9: IL-10-Produktionsfähigkeit nach der CLP

An NMRI-Mäusen wurde 1, 2, 4, 8, 10, und 12 Tage vor der Milzentnahme eine CLP ausgeführt.  $1 \times 10^6$  Milzzellen wurden in Kultur stimuliert und die Expression von IL-10 aus dem Überstand im ELISA quantifiziert.

(A) Stimulierung mit 100ng/ml LPS über Nacht

(B) Stimulierung mit 5 $\mu$ g/ml CpG über Nacht

(C) Stimulierung mit 1 $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3 und 2 $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD28 für 48 Stunden (n=4-5 NMRI-Mäuse pro Gruppe)

Abbildung 9 zeigt ELISA-Daten der Auswertung der IL-10-Produktionsfähigkeit von Milzzellen aus Mäusen, die 1, 2, 4, 8, 10 und 12 Tage vor der Organentnahme eine CLP erlebten hatten. Dabei zeigt sich, dass die Restimulation der Milzzellen mit LPS (A) an verschiedenen Tagen nach einer vorangegangenen CLP zu einem biphasischen Verlauf der IL-10 Expression führt. Am ersten Tag nach der CLP nimmt die IL-10 Menge im Überstand der stimulierten Zellen leicht ab, steigt dann jedoch bis zum Tag 2 signifikant zu einem Maximum an. Im weiteren Verlauf stellt man bis zum Tag 8 nach CLP eine Abnahme von IL-10 fest, welche sich jedoch bis zum 12. Tag nach CLP wieder zu regenerieren beginnt.

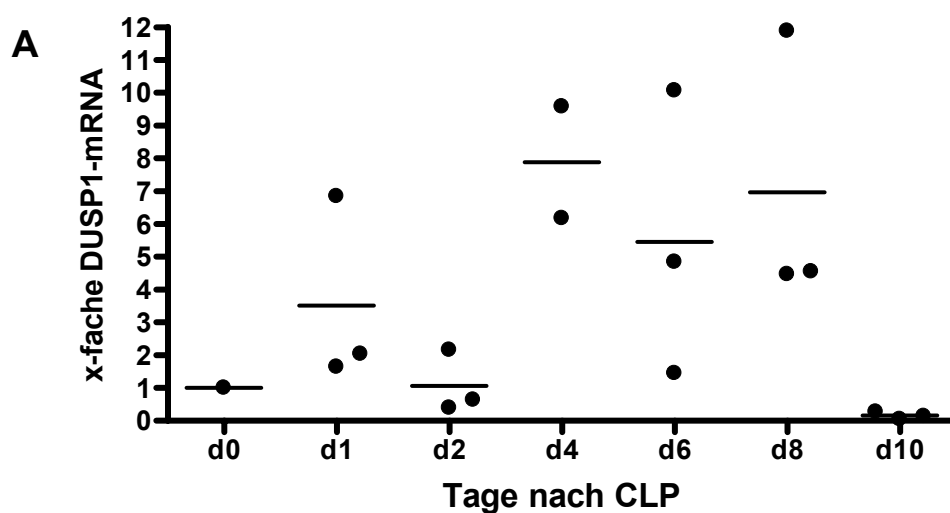
Die Stimulierung der Milzzellen mit CpG gibt ein ähnliches Bild. Am 1. Tag nach der Belastung nimmt die IL-10-Produktion leicht ab. Sie steigt bis zum nächsten Tag auf ein Niveau, das signifikant höher ist als die IL-10-Produktion von Zellen aus der naiven Maus. Bis zum 12. Tag nach der CLP nahm die IL-10 Produktionsfähigkeit kontinuierlich zu und war am Tag 12 signifikant besser als am 2. Tag nach der CLP.

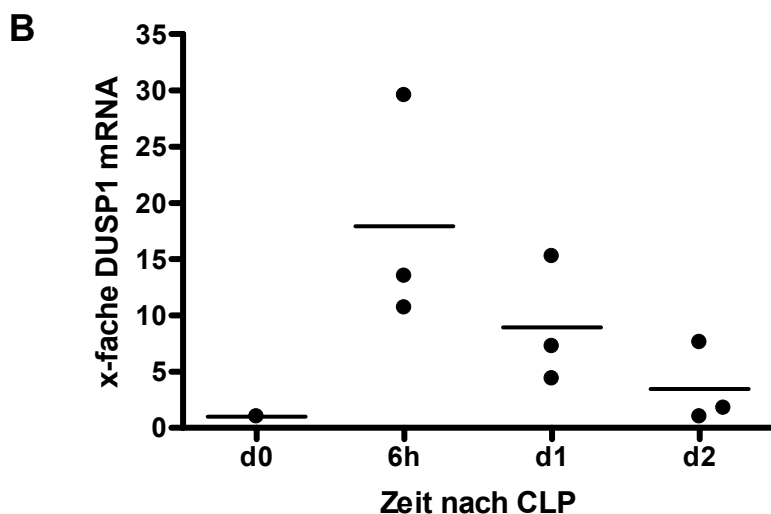
Anders verhält es sich, wenn die Milzzellen mit  $\alpha$ CD3 und  $\alpha$ CD28 (C) stimuliert wurden. Die Milzzellen aus naiven Mäusen und auch noch teilweise aus Mäusen, die am Tag zuvor eine CLP

hatten, produzierten auf den T-Zell-Stimulus hin viel IL-10. Ab dem 2. Tag nach CLP war die IL-10-Produktion der T-Zellen signifikant gegenüber Zellen naiver Mäuse erniedrigt. An den weiteren untersuchten Zeitpunkten nach dem Eingriff blieb die IL-10-Produktion in den Kulturüberständen erniedrigt.

### 3.1.3 DUSP1-Expression

Die Regulierung der Entzündungsreaktion geschieht über die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Komponenten des MAPK-Signalweges. DUSP1 ist eine spezifische Phosphatase, die der aktivierten Zytokinexpression entgegenwirkt. Das Vorhandensein dieser Kinase ist somit ein Indiz für die Induktion der inflammatorischen Immunantwort und sollte deshalb zu verschiedenen Zeiten nach einer CLP untersucht werden.





**Abbildung 10: Expression von DUSP1 mRNA nach CLP**

Dargestellt ist das Verhältnis der DUSP1-mRNA bezogen auf den Mittelwert der Werte in naiven C57Bl/6-Mäusen. Hierfür wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Zur Berechnung ist das Verhältnis der Expression der DUSP1-mRNA auf die 18S-mRNA-Expression, dem internen Standard, berechnet worden.

(A) An C57B/6-Mäusen wurde 1, 2, 4, 6, 8, und 10 Tage vor der Milzentnahme eine CLP ausgeführt.

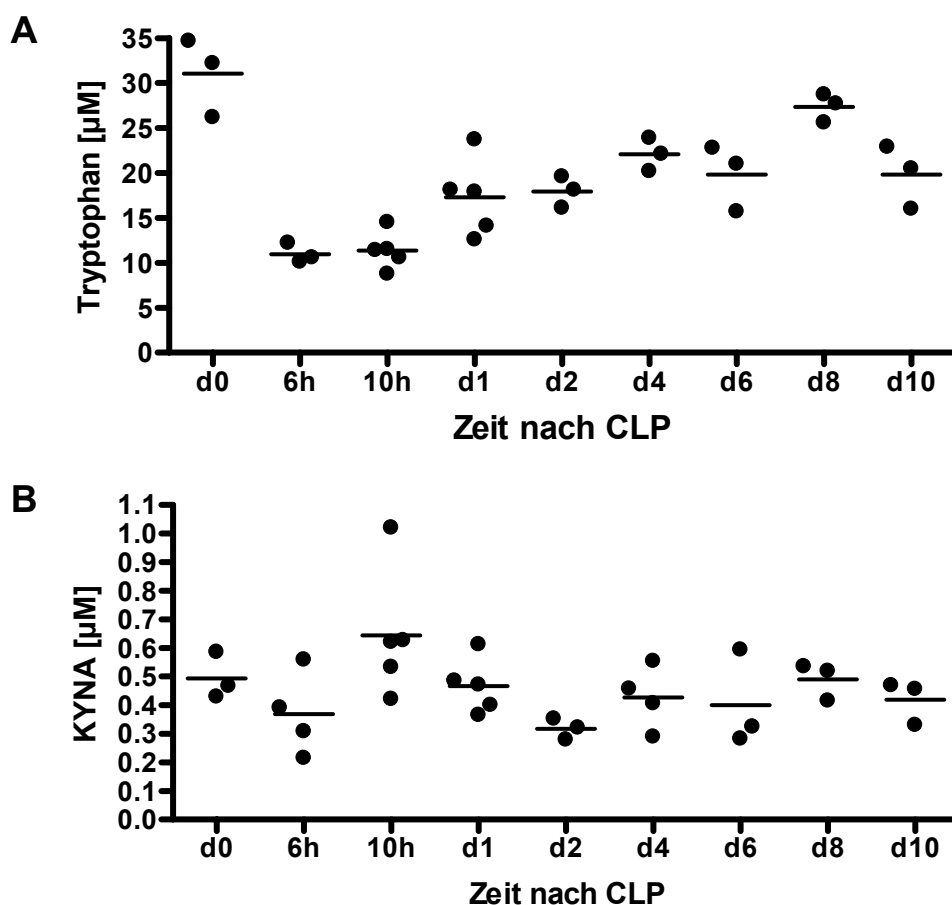
(B) An C57B/6-Mäusen wurde 6 Stunden, 1 bzw. 2 Tage vor der Milzentnahme eine CLP ausgeführt.

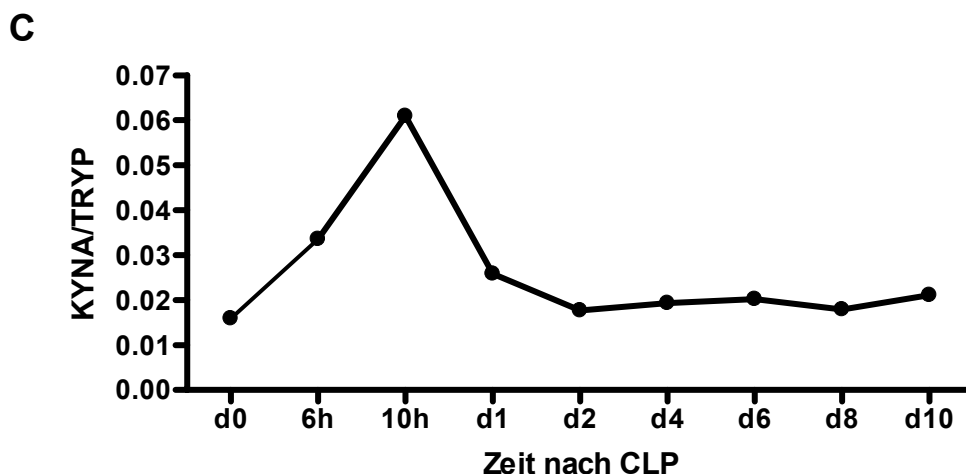
(n=3 C57Bl/6 Mäuse pro Zeitpunkt)

Die Quantifizierung der mRNA für die regulatorische Phosphatase DUSP1 zeigt, wie in Abbildung 10 (A) dargestellt, bei einer Untersuchung am 1., 2., 4., 6., 8., und 10. Tag nach der CLP einen biphasischen Verlauf. Gesteigerte Expression sieht man am ersten Tag nach der CLP und nach einer Erniedrigung am Tag 2 steigt die Expression zu den später untersuchten Zeitpunkten wieder an. Am Tag 10 nach CLP war die Expression der DUSP1-mRNA wieder unterhalb des basalen Levels un behandelter Mäuse. Da für die Zweitinfektion der 2. Tag von großem Interesse ist, wurde die Quantifizierung noch in einem engeren Zeitfenster ab der 6. Stunde nach der CLP bis zum 2. Tag durchgeführt (B). Dabei zeigte sich das Expressionsmaximum der DUSP1-mRNA bereits 6 Stunden nachdem die Mäuse operiert waren.

### 3.1.4 IDO-Aktivität über die Tryptophandepletion

Die Depletion von Tryptophan aber auch die Generierung seiner Kataboliten hemmen die T-Zellen in ihrer Funktionalität (Fallarino, Grohmann *et al.* 2002; Fallarino, Grohmann *et al.* 2003). Tryptophandepletion ist ein gültiger Hinweis auf die Aktivität von IDO (Fallarino, Vacca *et al.* 2002). Der Tryptophanspiegel im Blut nach CLP sollte daher als ein weiterer immunregulatorischer Parameter untersucht werden. Die massenspektrometrische Analyse der Plasmen erfolgte freundlicher Weise in Kooperation mit Cornelia Kiank aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schütt, Universität Greifswald.





**Abbildung 11: Aktivität von IDO an verschiedenen Tagen nach CLP**

An C57B/6-Mäusen wurden 6 und 10 Stunden sowie 1, 2, 4, 8, 10, und 12 Tage vor der Blutentnahme eine CLP ausgeführt. Die Bestimmung der Tryptophan- und Kynureninsäurekonzentration geschah mittels massenspektrometrischer Analyse.

(A) Zeitlicher Verlauf der Tryptophandepletion nach CLP.

(B) Zeitlicher Verlauf des Kynureninsäurespiegels nach CLP.

(C) Berechnung der IDO-Aktivität: Quotient von Kynureninsäure zu Tryptophan, berechnet aus den Mittelwerten der einzelnen Zeitpunkte. (n=3-5 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

In Abbildung 11 ist die Aktivität von IDO über die Depletion von Tryptophan und der Generierung seiner Metaboliten am Beispiel der Kynureninsäure zu verschiedenen Zeitpunkten nach der CLP dargestellt. Schaubild (A) zeigt die sprunghafte Abnahme des Tryptophanspiegels innerhalb der ersten 6 Stunden nach der CLP. Diese starke Abnahme gleicht sich relativ schnell aus. Mäusen, denen 24 Stunden nach der CLP das Blut entnommen worden war, hatten zwar noch immer weniger Tryptophan im Plasma, doch verblieb dieser Spiegel, trotz einer leichten Erhöhung um den 8. Tag, immer unterhalb des Normalwertes.

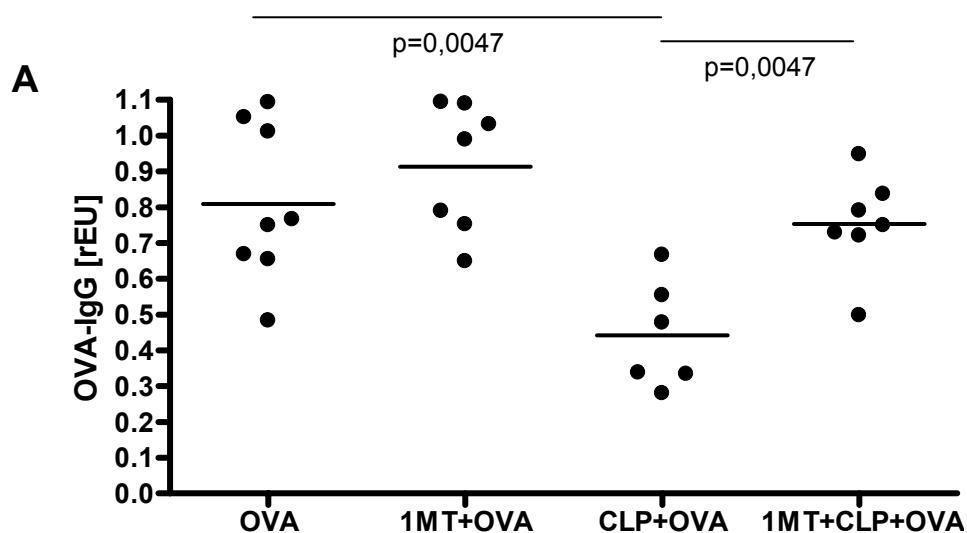
Wenn Tryptophan abgebaut wird, kommt es zu einem Anstieg seiner Metaboliten. Abbildung 11 (B) zeigt den Konzentrationsverlauf der Kynureninsäure, einem frühen Metaboliten von Tryptophan, nach CLP. Der Kynureninsäurespiegel zeigt ebenfalls an den untersuchten Tagen einen biphasischen Verlauf. Gleich nach CLP nimmt die Konzentration im Blut leicht ab, steigt dann bis zur 10. Stunde, um erneut bis zum Tag 2 auf ein Minimum abzufallen. Im Weiteren pendelt sich der Kynureninsäurespiegel um das physiologische Niveau ein.

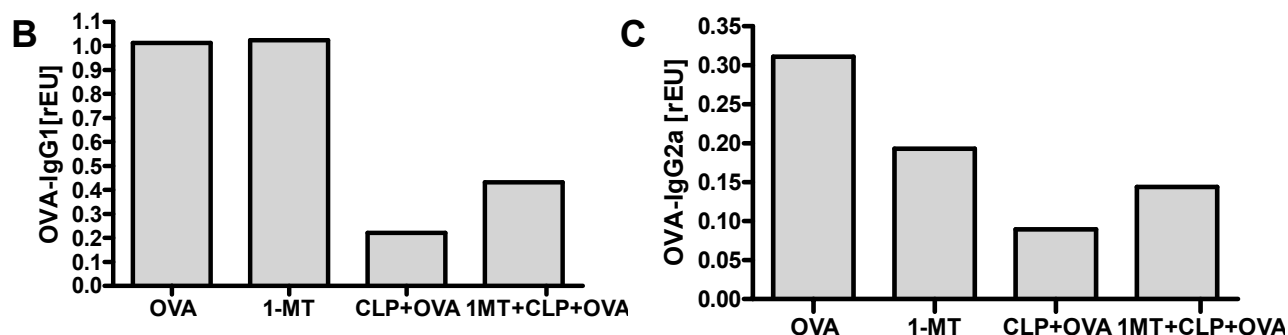
Man kann die Aktivität von IDO als Verhältnis von Tryptophan zu Kynureninsäure, wie in Abbildung 11 (C) gezeigt, darstellen. Das Maximum der Enzymaktivität liegt bei dem 10. Stundenwert. Diese IDO-Aktivität ist zum Zeitpunkt der Immunparalyse am 2. Tag nach CLP anhand der Tryptophandepletion und Substratumsetzung nicht mehr messbar.

### 3.1.4.1 Folgen derIDO-Aktivität für die primäre B-Zellantwort

Mit dem folgenden Experiment sollte die B-Zellfunktion nach CLP während der Immunparalyse überprüft werden, da sie Auswirkungen auf eine Sekundärinfektion haben könnte. Hierfür wurden Mäuse am 2. Tag nach einer CLP mit Ovalbumin (OVA) immunisiert. Ovalbumin wurde deshalb verwendet, weil es ein spezifisches Antigen darstellt, das auch für die spezifische Bestimmung der gebildeten Antikörper im ELISA genutzt werden kann. Am 8. Tag nach Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und die spezifischen OVA-Immunglobuline (IgG) im Serum quantifiziert.

Die Enzymaktivität vonIDO gilt als ein regulatorischer Mechanismus für die Aktivität der T-Zellen (Mellor und Munn 2000), weswegen es außerdem von Interesse war, ob eine Hemmung vonIDO durch 1-Methyltryptophan (1MT), das vonIDO nicht abgebaut wird, die frühe B-Zellantwort beeinflusst. Zur Hemmung vonIDO wurde das Tryptophanderivat vom fünften Tag vor der CLP bis zum Versuchsende über das Trinkwasser verabreicht.





### Abbildung 12: Die frühe B-Zellantwort nach CLP in Abhängigkeit derIDO-Aktivität

Die Antikörperantwort naiver Mäuse, und solcher, die 2 Tage zuvor eine CLP bekamen, mit 2 anderen Mausgruppen verglichen, die ab dem 5. Tag vor der CLP 1MT (2mg/ml Trinkwasser), bzw. zur Kontrolle, 1MT ohne zusätzliche CLP, erhalten hatten. Nach 8 Tagen wurde den Mäusen Blut abgenommen und im Serum die jeweiligen Antikörper quantifiziert. Die Menge der Antikörper wurde als relative ELISA-Unit (rEU) berechnet.

(A) gezeigt ist die Gesamtheit OVA-spezifischer IgG, (n=5 Einzelmäuse pro Gruppe)

(B) gezeigt sind die OVA-spezifischen IgG1, (n=5 Mäuse pro Gruppe, Seren gepoolt)

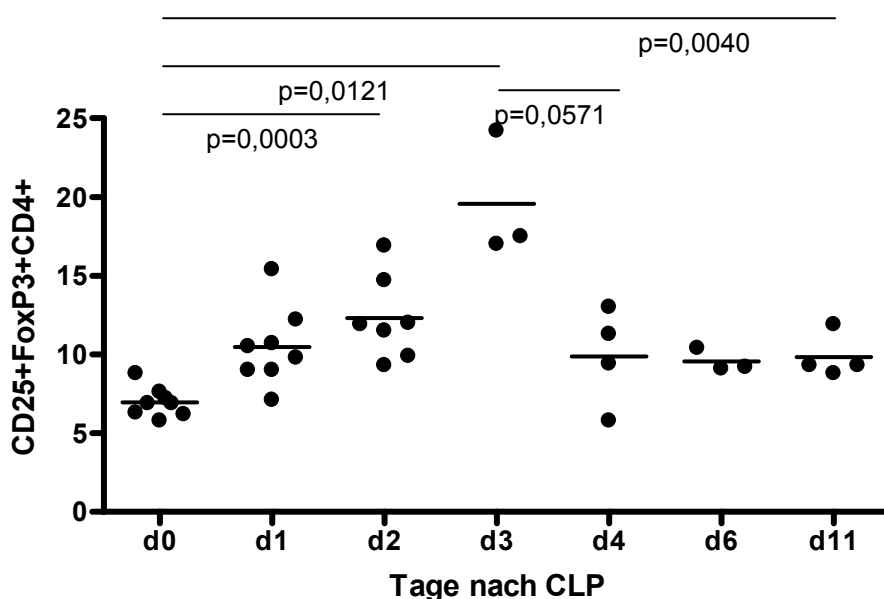
(C) gezeigt sind die OVA-spezifischen IgG2a, (n=5 Mäuse pro Gruppe, Seren gepoolt))

Die OVA-Immunisierung führt innerhalb von 8 Tagen zur Bildung OVA-spezifischer Antikörper vom Isotyp IgG. Erfuhren die Mäuse 2 Tage vor der Immunisierung eine CLP, so fiel die Menge der produzierten Immunglobuline signifikant schlechter aus. Durch die Verabreichung von 1-Methyltryptophan (1MT) wurde dieser Effekt wieder aufgehoben (Signifikanz der CLP-bedingten verschlechterten IgG-Produktion und deren Aufhebung durch 1MT jeweils  $p=0,0047$ ). Kontrollen, die 1MT aber keine CLP bekommen haben, zeigten nach der OVA-Immunisierung eine normale Immunglobulinproduktion (Abbildung 12 A).

Die nähere Klassifizierung der auf Ovalbumin-Immunisierung hin gebildeten Antikörper von Mäusen, die zwei Tage vor der Immunisierung operiert waren, zeigt, dass die CLP-induzierte Reduktion beide Immunglobulin-Subtypen, IgG1(B) und IgG2a(C), betrifft. Der Inhibitor für IDO 1MT hat ohne eine vorangegangene CLP zwar selbst einen reduzierenden Einfluss auf die Produktion der IgG2a-Antikörper (B), aber nicht auf die Produktion der Immunglobuline vom Subtyp IgG1. Dennoch führt die IDO-Blockade bei einer Immunisierung während der Immunparalyse zu einer teilweisen Aufhebung der CLP-induzierten reduzierten frühen B-Zellantwort hinsichtlich dieser Antikörpersubklassen.

### 3.1.5 Regulatorische T-Zellen

Die CD25+FoxP3+CD4+ natürlichen regulatorischen T-Zellen, die in der Milz einer naiven Maus etwa 5-10% der CD4+T-Helferzellen ausmachen, regulieren zum einem die Proliferation und Aktivierung der Th-Zellen zum anderen induzieren sie in DC einen tolerogenen Phänotyp (Hubert, Jacobs et al. 2007) Diese regulatorische T-Zellsubpopulation sollte wegen ihrer möglichen Beeinflussbarkeit durch MIF während der CLP-induzierten Immunparalyse untersucht werden.



**Abbildung 13: CD25+FoxP3+CD4+Milzzellen nach CLP**

An Mäusen wurde 1, 2, 4, 8 und 11 Tage vor der Milzentnahme eine CLP durchgeführt. Der prozentuale Anteil CD25+FoxP3+ T-Zellen innerhalb der CD4+Milzzellpopulation wurde durchflusszytometrisch ermittelt. (n=3-8 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

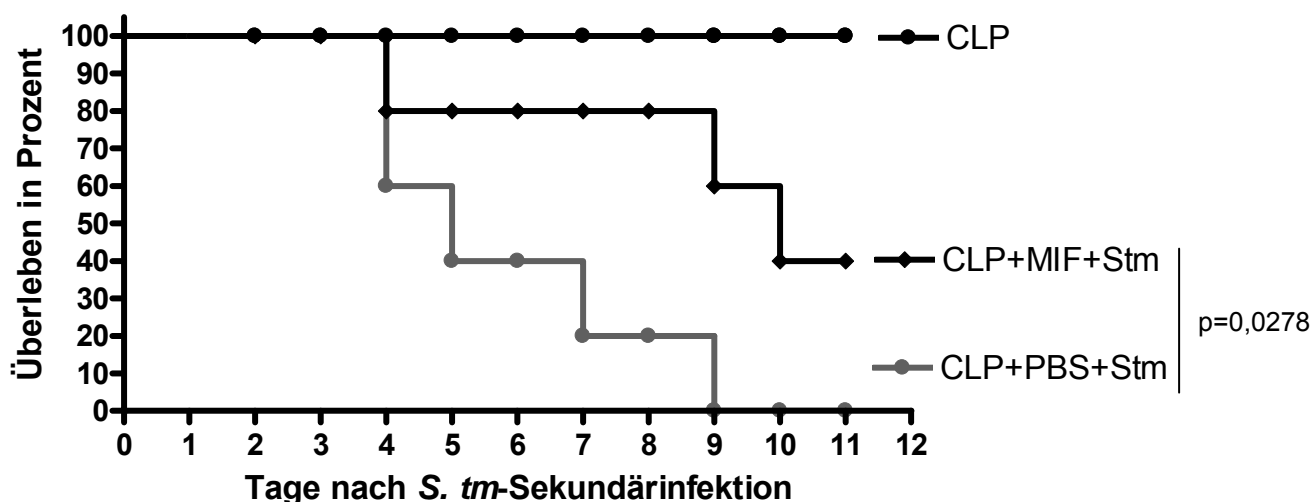
Die durchflusszytometrische Untersuchung der CD25+FoxP3+CD4+Milzzellen nach CLP zeigte, dass der Anteil dieser regulatorischen T-Zellen über den 1. und 2. bis zum 3. Tag nach CLP kontinuierlich zunimmt. Am Tag 2 nach CLP waren diese Zellen in den Milzen im Vergleich zu Milzen unbelasteter Zustand der Mäuse signifikant erhöht. Ein Maximum erreichten die Treg im Verhältnis zu den T-Helferzellen am Tag 3. Eine Abnahme dieser Zellpopulation war am 4. Tag nach einer vorausgegangenen CLP zu verzeichnen. Bis zum 11. Tag jedoch blieb der Anteil der Treg signifikant über der physiologischen Wert (Abbildung 13).

### 3.2 Einfluss einer MIF-Behandlung in der sepsisinduzierten Immunparalyse

Die exogene Verabreichung von MIF am 2. Tag nach einer CLP schützt vor den Folgen einer bakteriellen Sekundärinfektion (Pollak, Sterns et al. 2005). Im folgendem sollte die Beeinflussung verschiedener immunologischer Parameter in der CLP-induzierten Immunparalyse unter dem Einfluss einer MIF-Behandlung untersucht werden.

#### 3.2.1 Einfluss von MIF auf die Mortalität einer Sekundärinfektion mit *Salmonella typhimurium*

Der schützende Effekt einer MIF-Vorbehandlung vor einer bakteriellen Sekundärinfektion am 2. Tag nach CLP sollte reproduziert werden. Hierfür wurde exemplarisch eine Zweitbelastung mit *S. tm* gewählt. Die Mäuse erhielten 6 Stunden vor der bakteriellen Belastung entweder 20µg MIF in 1ml PBS, bzw. zur Kontrollbehandlung 1ml PBS intraperitoneal appliziert. Diese schützende Dosierung der MIF-Behandlung zu dem gegebenen Zeitpunkt vor der Sekundärinfektion, war in vorangegangene Studien für das Mausmodell der CLP-induzierten Immunparalyse, ausführlichst ermittelt worden (Pollak 2006).



**Abbildung 14: MIF in der Immunparalyse verbessert das Überleben einer Sekundärinfektion**

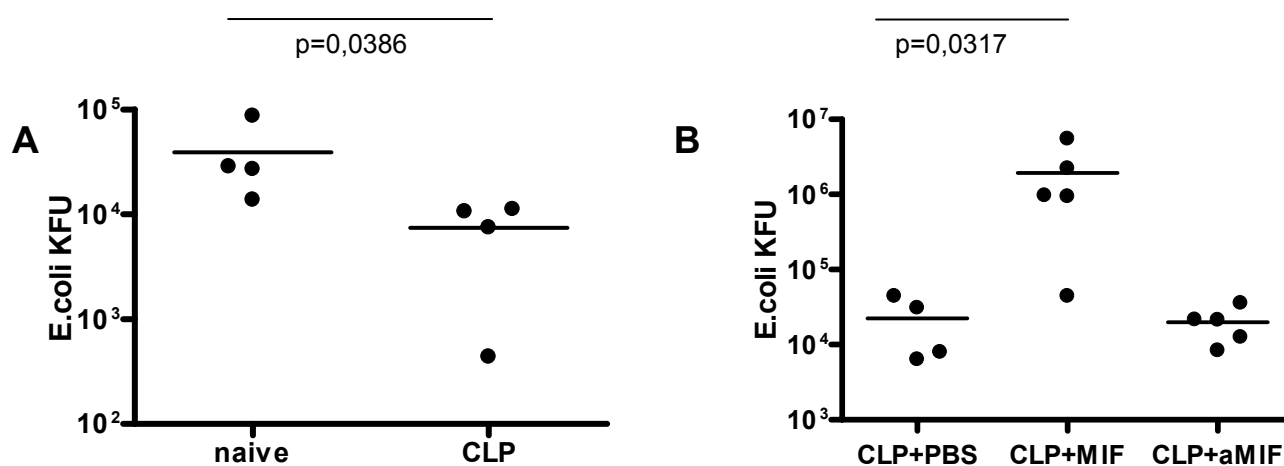
Am Tag 2 nach einer CLP wurde den Mäusen jeweils 20µg MIF bzw. als Kontrolle 1ml PBS i.p. verabreicht. 6 Stunden danach wurden die Mäuse mit  $1 \times 10^4$  KFU *S. tm* intraperitoneal belastet und an den folgenden Tagen das Überleben der Tiere beobachtet.

(n=5 NMRI-Mäuse pro Gruppe)  
(Statistik: Kaplan-Meier, SPSS)

In Abbildung 14 zeigt sich der von Pollak *et al.* (Pollak, Sterns *et al.* 2005) publizierte Schutz durch MIF am 2. Tag nach CLP für eine Sekundärinfektion mit *S. tm*. Diese *S. tm*-Sekundärinfektion führte vom 4. Tag ab zum Tod der Mäuse. Signifikanterweise führte die MIF-Behandlung der CLP-Mäuse zu einem verbesserten Überleben der *S. tm*-Infektion. MIF-behandelten Mäuse starben später und hatten im Vergleich zu den Kontrollmäusen, die alle an der Zweibelastung gestorben waren eine Überlebensrate von 40%.

### 3.2.2 Keimeliminierung nach CLP in Abhängigkeit von MIF

Die Keimlast in der Leber der Versuchstiere nach einer bakteriellen Belastung soll als ein Parameter für die Funktionalität der angeborenen Immunität herangezogen werden. Hierfür wurden Tiere mit *E. coli* am Tag 2 nach CLP intraperitoneal infiziert und am nächsten Tag die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KFU) ermittelt.



#### Abbildung 15: Bakterien-Eliminierung nach CLP in Abhängigkeit einer MIF-Behandlung

(A) Naive Mäuse und Mäuse am Tag 2 nach einer CLP wurden mit *E. coli*  $5 \times 10^6$  KFU intraperitoneal infiziert und die KFU in der Leber bestimmt. (n=4, C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

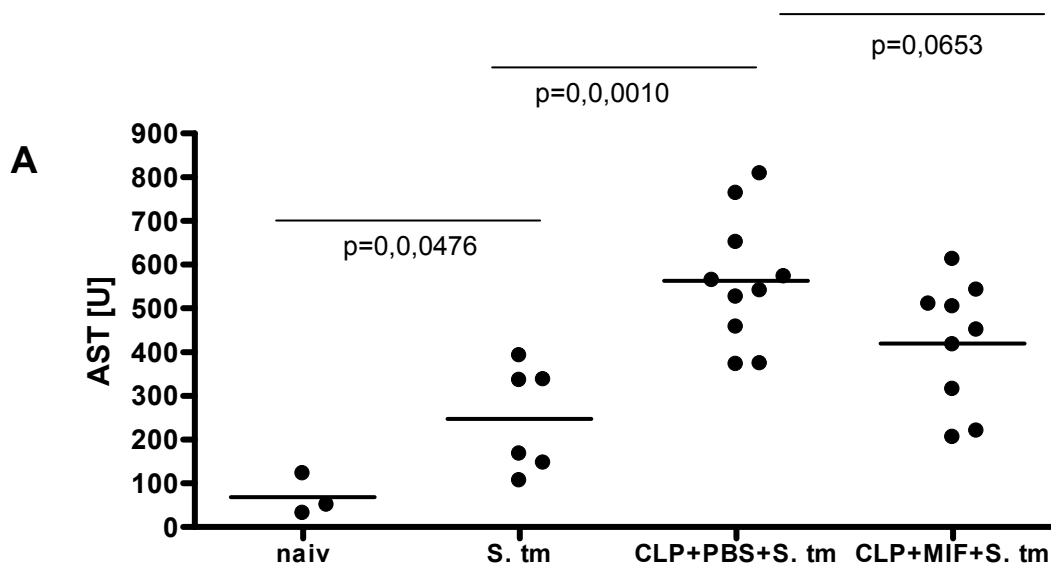
(B) Mäuse am Tag 2 nach einer CLP wurden erst mit PBS, 20 $\mu$ g MIF oder 100 $\mu$ g  $\alpha$ MIF vorbehandelt und nach 6 Stunden mit  $2 \times 10^6$  *E. coli* intraperitoneal infiziert und die KFU in der Leber bestimmt.

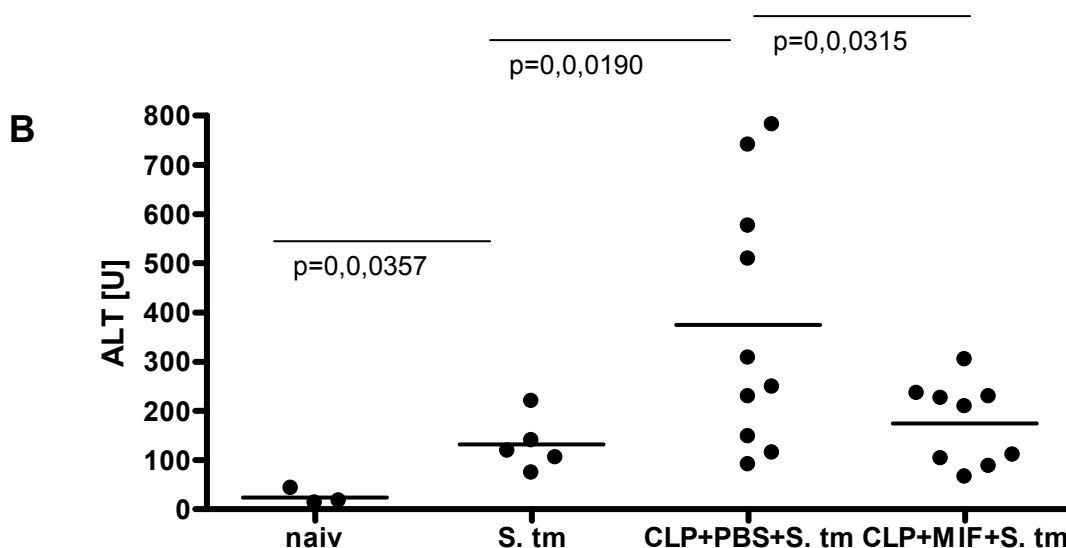
(n=4-5 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

Abbildung 15 (A) zeigt, dass eine subletale CLP vor einer Keimbelastung zu einer signifikanten Verringerung vitaler Keime in den Lebern führte. Die MIF-Vorbehandlung solcher Mäuse bewirkte, dass deutlich mehr lebende Keime in den Lebern nachweisbar wurden (B). Die Neutralisierung von endogenem MIF durch Vorbehandlung mit einem Antikörper gegen MIF hat keinen Einfluss auf die KFU in der Leber nach bakterieller Sekundärinfektion. Die Verabreichung von MIF zum Zeitpunkt der CLP-induzierten Immunparalyse führte somit zu einer verschlechterten Keimeliminierung.

### 3.2.3 Einfluss von MIF auf AST und ALT nach Sekundärinfektion

MIF reduziert am Tag 2 einer CLP-induzierten Immunparalyse die Mortalität einer bakteriellen Zweitinfektion. Es war daher von Interesse, ob sich dieser Schutz durch MIF auch in der Organbelastung widerspiegelt. AST und ALT sind Lebertransaminasen, deren Aktivität im Serum auch in der Klinik als Parameter für eine Schädigung der Leber herangezogen werden. Die Aktivität dieser Enzyme im Serum sollte daher als ein Indikator für einen Leberschaden im Sekundärinfektionsmodell untersucht werden.





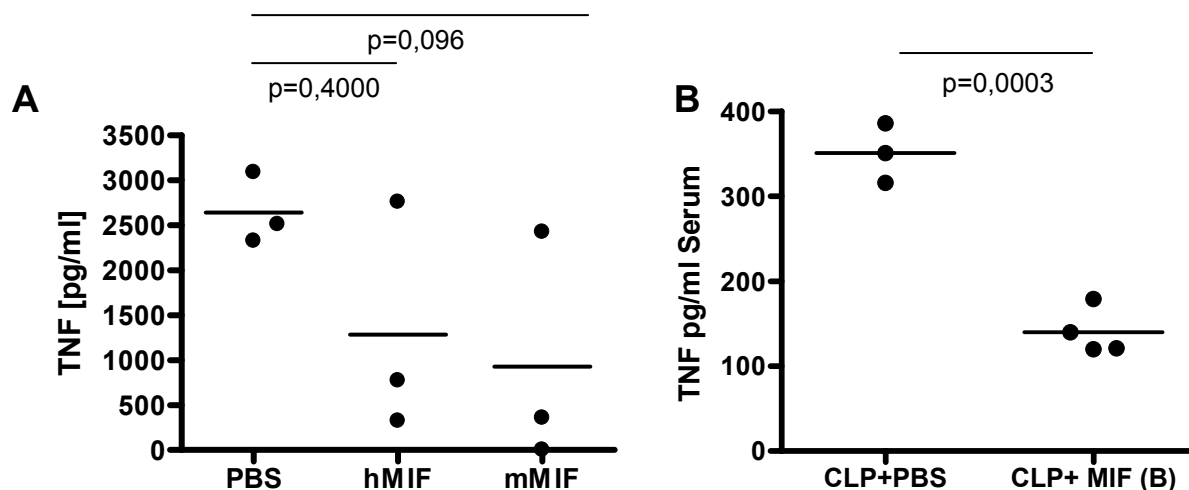
**Abbildung 16: Einfluss einer MIF-Behandlung auf die Enzymaktivität von AST und ALT im Serum nach bakterieller Sekundärinfektion**

NMRI-Mäusen wurde am Tag 2 nach CLP PBS bzw. 20µg MIF intraperitoneal verabreicht. Nach 6 Stunden wurden diese Tiere mit  $7 \times 10^4$  KFU *S. tm* infiziert. Am Tag 7 nach der *S. tm*-Infektion sind die Aktivität der Leberenzyme AST (A) und ALT (B) im Serum bestimmt worden. Kontrollen blieben unbehandelt bzw. wurden nur mit *S. tm* infiziert. (n=3-10 NMRI-Mäuse pro Gruppe)

Abbildung 16 zeigt die Enzymaktivitäten der Lebertransaminasen AST und ALT von naiven Mäusen, von naiv infizierten Mäusen und Mäusen die am Tag 2 nach einer CLP mit *S. tm* infiziert wurden. Die CLP-Mäuse bekamen 6 Stunden vor der Infektion entweder MIF oder PBS verabreicht. Die Transaminaseaktivität von AST (A) und ALT (B) wurde am 7 Tage nach der Infektion im Serum der Tiere bestimmt. Durch eine *S. tm*-Infektion stieg die Enzymaktivität von AST und ALT im Serum der Mäuse und war signifikant höher als unter physiologischen Bedingungen. Die vorangegangene CLP führt für die beiden gemessenen Enzyme zu einer signifikanten Aktivitätszunahme verglichen zu den nur mit *S. tm* infizierten Mäusen. Eine der Zweitinfektion vorausgegangene MIF-Behandlung der post-CLP Mäuse erniedrigte deutlich die AST-Aktivität. Die durch eine vorangegangene CLP bedingte erhöhte ALT-Aktivität ließ sich durch die vorangegangene MIF-Behandlung signifikant reduzieren.

### 3.2.4 Einfluss von MIF auf den TNF-Spiegel im Serum nach Stimulierung

Es gibt kontroverse Aussagen über die Beeinflussung von MIF auf die TNF-Produktion (Bernhagen, Calandra *et al.* 1994; Kudrin, Scott *et al.* 2006). Deswegen wurde die Auswirkung einer MIF-Behandlung auf die Zytokinproduktion in unserem Modell untersucht.



**Abbildung 17: MIF senkt den LPS-induzierten TNF-Serumspiegel von naiven Mäusen und Mäusen am Tag 2 nach einer CLP**

(A) Naive Mäuse erhielten PBS oder 20µg rekombinantes humanes bzw. Maus-MIF (hMIF bzw. mMIF) vor einer weiteren *in vivo* Belastung mit 1µg LPS. 90 Minuten später wurde den Mäusen Blut abgenommen und im Serum die TNF-Expression im ELISA ermittelt. (n=3 NMRI-Mäuse pro Gruppe)

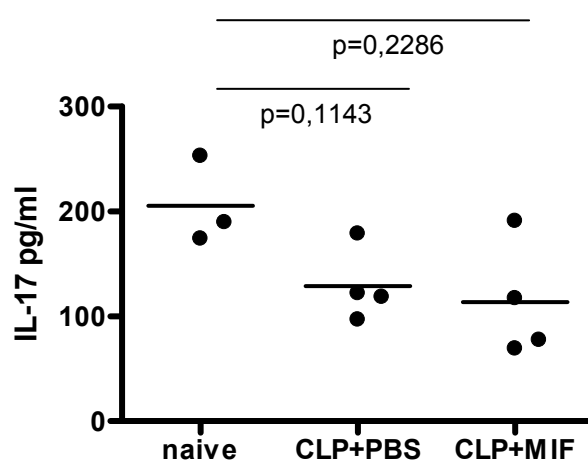
(B) Mäuse am Tag 2 nach CLP erhielten PBS bzw. 20µg rekombinantes humanes MIF (B). Allen Mäusen wurde nach 6 Stunden 1µg LPS *i.p.* gespritzt und nach 90 Minuten Blut abgenommen. Im gewonnenen Serum wurde die Menge TNF mittels ELISA bestimmt. (n=3-4 C57Bl/6-Mäuse pro Gruppe)

In Abbildung 17 (A) ist die Wirkung einer MIF-Behandlung vor der LPS-Belastung in naiven Mäusen gezeigt. Während PBS-behandelte Mäuse durchschnittlich 2,5ng/ml TNF im Serum hatten, reduzierten sich diese TNF-Werte in den mit MIF vorbehandelten Mäusen. Die Behandlung mit humanem MIF reduzierte TNF im Serum auf etwa 1,25ng/ml, während Maus-MIF die TNF-Produktion auf weniger als 1ng/ml brachte.

Abbildung 17 (B) zeigt, dass auch in der CLP-induzierten Immunparalyse die Vorbehandlung mit MIF vor einer LPS-Injektion zu einer hoch signifikanten Reduktion von TNF im Serum führte (p=0,0003). Das hierfür verwendete MIF wurde freundlicherweise von Prof. Bernhagen, Aachen zu Verfügung gestellt.

### 3.2.5 Einfluss von MIF während der Immunparalyse auf die IL-17-Produktion von stimulierten Milzzellen

Neutralisation von IL-17 reduziert den endotoxinbedingten Organschaden nach der CLP (Flierl, Rittirsch *et al.* 2008). Da die Behandlung von Mäusen mit MIF in der Immunparalyse die Organbelastung reduzierte, sollten die Auswirkungen einer CLP und einer zusätzlichen Behandlung mit MIF während der Immunparalyse auf die IL-17-Produktionsfähigkeit untersucht werden.



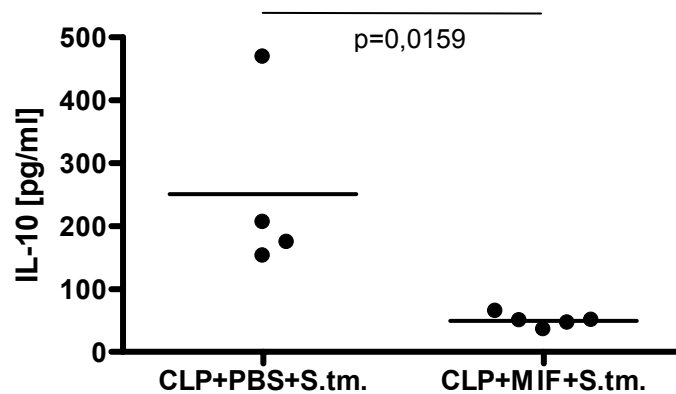
#### Abbildung 18: Einfluss von MIF auf die IL-17-Produktionsfähigkeit

Die IL-17-Produktionsfähigkeit von Milzzellen naiver Mäuse und solchen Mäusen, die am Tag 2 nach der CLP 20µg MIF bzw. PBS erhielten, wurden von Kulturüberständen im ELISA gemessen. 6 Stunden später wurden die Milzen entnommen und in Kultur restimuliert. Für die Restimulierung wurden  $1 \times 10^6$  Gesamtmilzzellen pro Maus mit 5µg/ml αCD3 und 1µg/ml αCD28 für 48 Stunden inkubiert. Die Überstände dieser Kulturen wurden für die Quantifizierung in einem IL-17-ELISA eingesetzt. (n=3-4 C57Bl/6-Mäuse pro Gruppe)

Die Restimulierung der Milzzellen über den T-Zellrezeptor führt zur IL-17-Produktion von T-Zellen (Abbildung 18). Es zeigte sich, dass Mäuse 2 Tage nach einer CLP weniger IL-17 produzieren. Die Vorbehandlung der CLP-Mäuse mit MIF hatte auf die produzierte IL-17-Menge restimulierter Milzzellen keinen Einfluss.

### 3.2.6 Einfluss von IL-10-Serumspiegel nach CLP und Sekundärinfektion

Zwei Tage post-CLP produzieren Milzzellen ex vivo nach Stimulierung IL-10. IL-10 gilt als ein antiinflammatorisches Zytokin, das in der Sepsis mit der Mortalität korreliert (Fiorentino, Zlotnik et al. 1991; Fiorentino, Zlotnik et al. 1991; Miller, Rashid et al. 2007). Es wurde überprüft, ob die MIF-Vorbehandlung von Mäusen während der CLP-induzierten Immunparalyse einen Einfluss auf die IL-10-Produktion hat, wenn diese Tiere nach weiteren 6 Stunden mit *S. tm* infiziert werden.



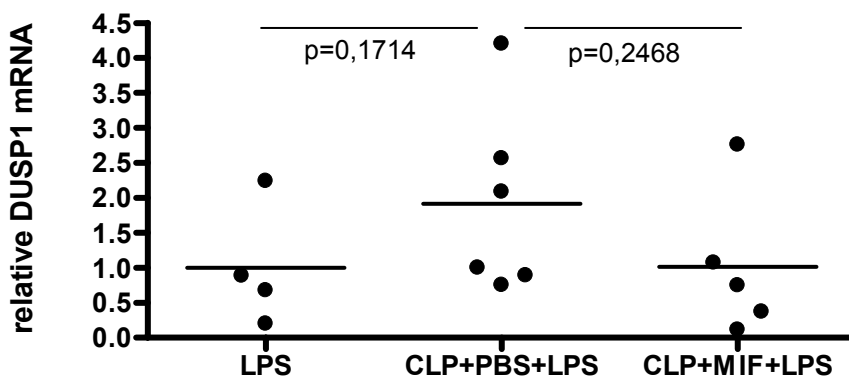
#### Abbildung 19: MIF führt bei *S. tm*-Sekundärinfektion zu einer Reduktion von IL-10

Mäusen wurde nach der CLP, 6 Stunden vor einer Sekundärinfektion mit  $6 \times 10^4$  *S. tm*, PBS bzw. 20  $\mu$ g MIF intraperitoneal appliziert. Am Tag nach der Infektion wurde den Mäusen Blut entnommen und im Serum die IL-10-Expression mittels ELISA bestimmt. (n=4-5 C57Bl/6-Mäuse pro Gruppe)

Die Quantifizierung der ELISA-Daten zeigt in Abbildung 19 eine signifikante Reduzierung der IL-10-Werte im Serum von Mäusen, die vor der Sekundärinfektion mit MIF behandelt worden waren. Während die Kontrollmäuse im Mittel etwa 250pg/ml IL-10 im Serum hatten, reduzierten sich die IL-10-Werte der MIF-behandelten Mäuse auf etwa 50pg/ml. Diese Reduktion der IL-10-Produktion durch die MIF-Verabreichung in der CLP-induzierten Immunparalyse ist signifikant ( $p=0,0159$ ).

### 3.2.7 Einfluss von MIF auf DUSP1-Expression

Es wurde gezeigt, dass MIF die Expression von DUSP1 reguliert (Aeberli, Yang et al. 2006). DUSP1 ist eine spezifische Phosphatase, die der Aktivierung des MAPK-Signalweges entgegenwirkt. Wegen der veränderten Zytokinproduktion einer MIF-Behandlung in der CLP-induzierten Immunparalyse, sollte die DUSP1-Expression in diesem Modell untersucht werden. Die Expression der DUSP1-mRNA zeigte in einem vorangegangenen Versuch 6 Stunden nach CLP eine maximale Expression (Abbildung 10). Es sollte überprüft werden, wie eine LPS-Belastung anstelle einer bakteriellen Infektion sich auf die Expression von DUSP1 verhält, wenn die CLP-Mäuse 6 Stunden zuvor mit MIF vorbehandelt waren.



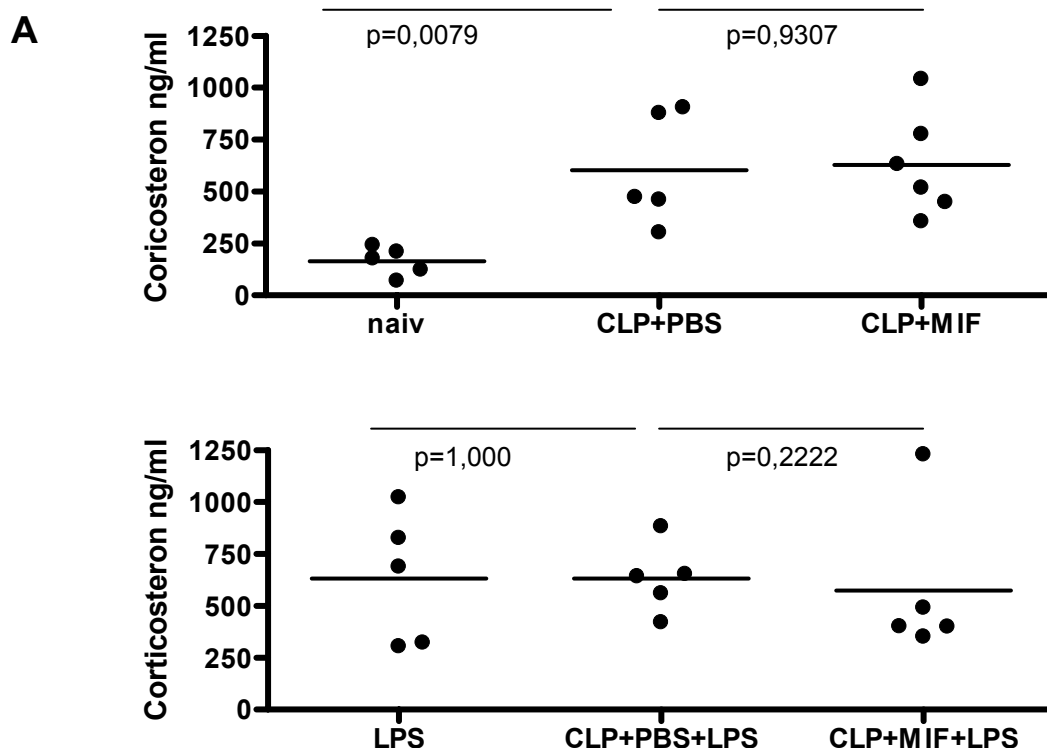
**Abbildung 20: Einfluss von MIF am Tag 2 nach einer CLP auf die Expression von DUSP1 nach LPS-Behandlung**

Gezeigt wird die relative Expression von DUSP1-mRNA aus Milzgewebe von Versuchstieren. Hierfür wurde Gewebe von unbehandelten Mäusen mit Mäusen verglichen, die am Tag 2 nach CLP entweder mit PBS oder MIF vorbehandelt worden waren, bevor sie 6 Stunden später mit 1µg LPS i.p. belastet wurden. Die Organentnahme erfolgte weitere 6 Stunden nach der LPS-Behandlung. Zur Quantifizierung der DUSP1-mRNA wurde die Expression der 18S-mRNA mitgeführt. (n=5-6 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

Die quantitative PCR führte zu dem Ergebnis, dass alle Mausgruppen, egal ob die Tiere vor der LPS-Behandlung naiv waren oder 2 Tage zuvor eine CLP erfuhren, ein annähernd gleiches Expressionsniveau der DUSP1-mRNA zeigen, wobei die Werte der Einzelmäuse stark streuen (Abbildung 20). Die MIF-Behandlung in der Immunparalyse, die der LPS-Belastung vorausging, hat das Niveau der DUSP1-Expression nur wenig erhöht und eine zusätzliche MIF-Behandlung hat diese leicht erhöhten Werte wieder auf den Wert der naiven Mäuse zurückgeführt.

### 3.2.8 Corticosteron-Werte im Serum nach MIF-Behandlung

Für MIF wurde beschrieben, dass es die glucocorticoidinduzierte Immunsuppression aufhebt (Calandra und Bucala 1997). Daher war es von Interesse, ob durch die MIF-Behandlung am Tag 2 der CLP-induzierten Immunparalyse der Corticosteronspiegel in der Maus beeinflusst ist. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob sich der Corticosteronspiegel solcher Mäuse während der Immunparalyse durch eine anschließende LPS-Belastung, anstelle einer bakteriellen Sekundärinfektion, verändert.



#### Abbildung 21: Einfluss von MIF auf den Corticosteronspiegel

Zur Quantifizierung der Corticosteronlevel im Serum wurde eine Corticosteron-ELISA verwendet. (A) Der Corticosteronspiegel im Serum von naiven Mäusen und solchen, die 2 Tage zuvor eine CLP bekommen haben und 6 Stunden vor der Blutentnahme entweder mit PBS oder mit MIF behandelt worden sind, wurde bestimmt. (n=5-6 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

(B) wie (A) mit dem Unterschied, dass diese zusätzlich 5 $\mu$ g LPS bekommen haben. Die Blutentnahme erfolgte nach weiteren 6 Stunden. (n=5 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

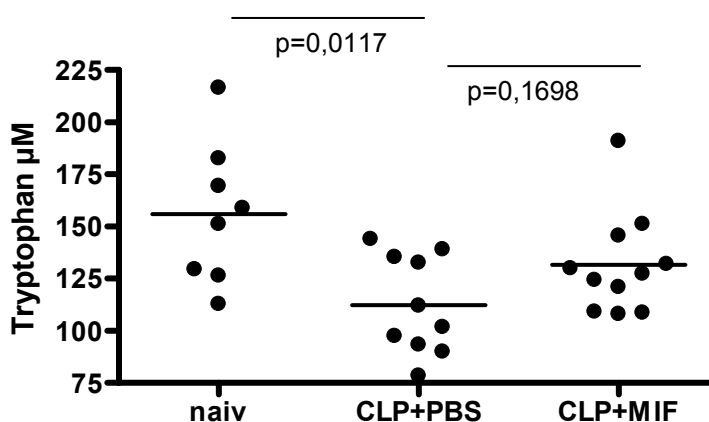
Abbildung 21 zeigt die im Serum gemessenen Corticosteronwerte von naiven Mäusen und Mäusen am Tag 2 nach einer CLP. Die vorangegangene CLP führt zu einer Erhöhung von Corticosteron (A). Die Zunahme dieses Hormons durch die Entzündungsreaktion einer CLP war

signifikant. Es gab keinen Unterschied zwischen den Mäusen die 6 Stunden vor Blutentnahme MIF bzw. zur Kontrolle PBS erhalten hatten.

Misst man den Corticosteronwert erst nach einer zusätzlichen Behandlung mit LPS, um die Situation einer Zweitinfektion nachzustellen (B), so zeigt sich, dass sich die gemittelten Corticosteronlevel 6 Stunden nach der LPS-Behandlung zwischen den untersuchten Mausgruppen gleichen. Naive Mäuse nach der LPS-Behandlung hatten den gleichen Corticosteronspiegel wie Mäuse, die zuvor eine CLP erfahren hatten. Der Corticosteronspiegel wurde durch die MIF-Behandlung der post-CLP-Mäuse nicht beeinflusst.

### 3.2.9 Einfluss von MIF auf die Serum-Tryptophandepletion

Nach CLP kommt es zu einer Tryptophandepletion im Serum auf Grund der Aktivität seines abbauenden Enzyms IDO (Abbildung 11). Es sollte daher überprüft werden, ob diese Tryptophandepletion von MIF innerhalb von 6 Stunden, also innerhalb der Zeit, in der die MIF-Behandlung schützend auf die bakterielle Sekundärinfektion wirkt, einen Einfluss auf den Tryptophanspiegel im Serum hat.



#### Abbildung 22: Einfluss von MIF auf Serum-Tryptophandepletion

Von naiven Mäusen und solchen, die 2 Tage zuvor eine CLP erfahren, wurde die Tryptophanmenge im Serum massenspektrometrisch untersucht. Die operierten Mäuse bekamen 6 Stunden vor der Blutabnahme entweder PBS oder 20 µg MIF appliziert. (n=5-7 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

Die massenspektrometrische Analyse der Seren, die freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Prof. Oeffner, Regensburg durchgeführt wurde, zeigt die aus Abbildung 11 bekannte Depletion von Tryptophan nach CLP. Die MIF-Behandlung von CLP-Mäusen, 6 Stunden vor Blutentnahme, führte zu leicht erhöhten Tryptophan-Werten im Serum der Mäuse.

### **3.2.9 Einfluss von MIF am Tag 2 nach einer CLP auf die Zellzusammensetzung der Milz**

Im Folgenden soll die Wirkung von MIF auf zellulärer Ebene untersucht werden. Dazu wurde die Anzahl und Funktion von Makrophagen und DC in der Milz analysiert. Des Weiteren wurde die Auswirkung einer MIF-Gabe während der Immunparalyse auf die Zahl der T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen mit einem Fokus auf regulatorische T-Zellen überprüft.

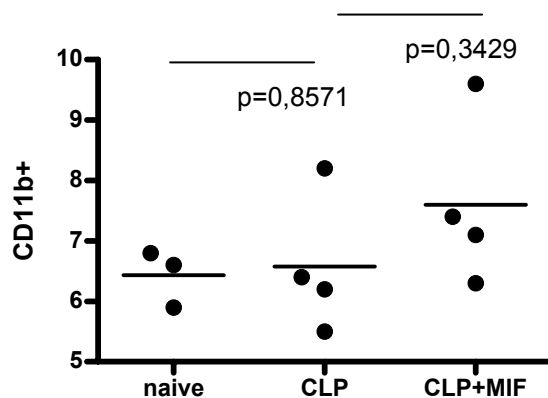
#### **3.2.10.1 Einfluss von MIF auf die Makrophagen der Milz**

Da Makrophagen durch MIF aktiviert werden (Roger, David *et al.* 2001), sollte dieser Zelltyp in Anzahl und auf funktionaler Ebene näher untersucht werden. Es galt daher zu überprüfen, ob die Ursache der verschlechterten Keimeliminierung durch MIF (Abbildung 15) in einer Veränderung der Anzahl der Makrophagen oder in deren Funktion begründet ist.

Makrophagen sind phagozytierende Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen Erreger über die sogenannten *Pattern-Recognition-Rezeptoren*. Eine daraufhin ausgelöste Signalweiterleitung führt zur Expression proinflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF, IL-6 und IL-12, wodurch eine adaptive Immunantwort induziert und unterstützt wird.

##### **3.2.10.1.1 Anzahl der CD11b+Zellen**

Durchflusszytometrisch kann der Oberflächenmarker CD11b wegen seiner hohen Expression auf Makrophagen zu deren Quantifizierung genutzt werden. Im Folgenden ist das Ergebnis der Bestimmung der CD11b+Zellen aus einer durchflusszytometrischen Analyse von Milzzellen dargestellt. Die Zellen stammten aus Mäusen, die entweder naiv waren oder 2 Tage zuvor eine CLP erlitten. Die operierten Tiere haben 6 Stunden vor der Organentnahme MIF bzw. PBS erhalten. In vorherigen Versuchen führte die MIF-Gabe während der Immunparalyse zu einem Schutz für eine anschließende bakterielle Sekundärinfektion (Abbildung 14, Abbildung 16).



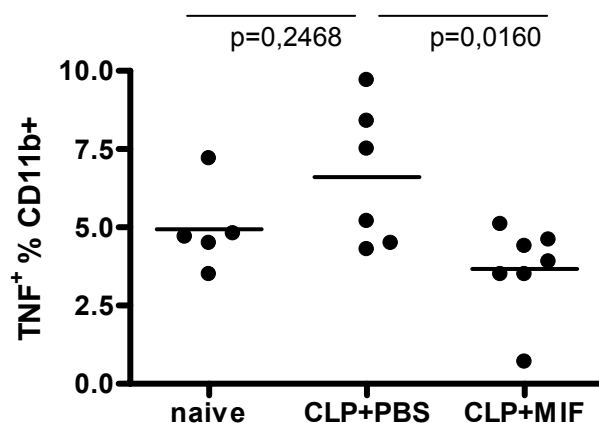
### Abbildung 23: Einfluss von MIF auf die Anzahl CD11b+Zellen in der Milz

Von naiven Mäusen und Mäusen, die am Tag 2, 6 Stunden vor der Milzentnahme entweder mit PBS oder mit 20µg MIF behandelt worden waren ist die Anzahl der CD11b+Milzzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt worden. (n=3-4 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt zum Zeitpunkt der Immunparalyse am Tag 2 nach CLP keinen Einfluss von CLP auf die Anzahl der CD11b+Zellen in der Milz (Abbildung 23). Wurde den Mäusen 6 Stunden vor der Organentnahme MIF verabreicht, so stieg der prozentuale Anteil der CD11b+Zellen in der Milz von 6,5% auf etwa 7,5%. Der MIF-bedingte Anstieg der Makrophagen nach der CLP war jedoch nicht signifikant.

#### 3.2.10.1.2 TNF-Produktionsfähigkeit von CD11b+Zellen

Es erfolgte eine funktionelle Untersuchung der Makrophagen am Tag 2 nach CLP mit oder ohne vorausgegangener MIF-Behandlung. Hierfür wurde die TNF-Produktion von Makrophagen intrazellulär durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Messung intrazellulärer Zytokinen hat den Vorteil, dass ungebundenes und somit aktiv vorliegendes Zytokin zelltypspezifisch quantitativ erfasst werden kann. Viele Zytokine werden nach ihrer Ausschüttung von ihren löslichen Rezeptoren abgefangen und biologisch inaktiviert. Im Falle von TNF sind dies die jeweiligen TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2, die als Inhibitoren wirken (Bradley 2008). Die durchflusszytometrische Quantifizierung ermöglicht zudem eine Zuordnung zum zytokinproduzierenden Zelltyp.

**Abbildung 24: MIF reduziert die Anzahl der TNF-produzierenden CD11b+Milzzellen**

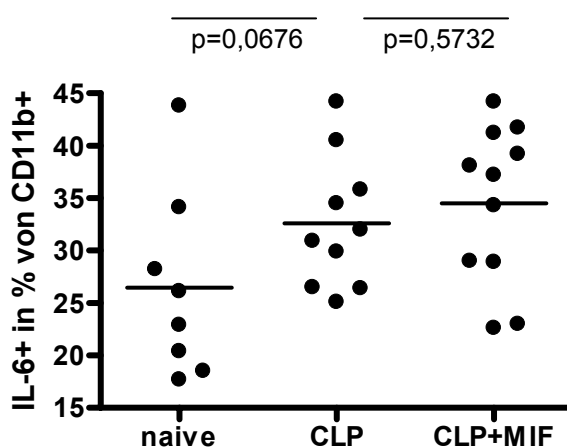
Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse von TNF+ Zellen in Prozent der CD11b+Milzzellen naiver Mäuse bzw. Mäusen am Tag 2 post-CLP nach einer Stimulierung mit 5µg/ml CpG. Die CLP-Mäuse waren 6 Stunden vor der Organentnahme mit 20µg MIF bzw. PBS behandelt worden.

(n=5-7 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

Eine leichte Erhöhung der Anzahl TNF+CD11b+Zellen der CLP-Mäuse nach der ex vivo Stimulierung der Zellen messbar (Abbildung 24). Die Behandlung der operierten Tiere mit MIF führte innerhalb von 6 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl dieser TNF-produzierenden Zellen (p=0,0160).

### 3.2.10.1.3 IL-6 Produktionsfähigkeit von CD11b+Zellen

Da die Behandlung mit MIF am Tag 2 nach einer CLP vor weiteren Belastungen schützt, wurde die IL-6 Produktion intrazellulär in stimulierten CD11b+Zellen in Abhängigkeit einer MIF-Applikation untersucht. IL-6 ist ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, von welchem beschrieben ist, dass es durch MIF reguliert wird (Bernhagen, Calandra *et al.* 1994). Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch nach intrazellulärer Markierung von IL-6 und in Korrelation zu CD11b+Milzzellen.



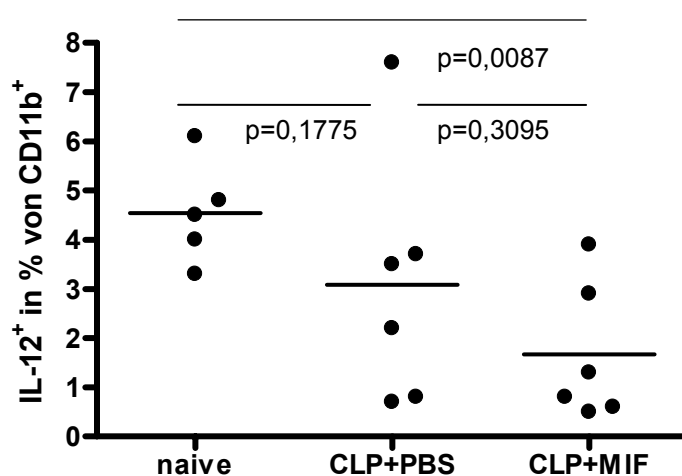
#### Abbildung 25: Einfluss von MIF auf IL-6 Produktion in CD11b+ Milzzellen

Bei naiven Mäusen und solchen, die 2 Tage zuvor eine CLP erfuhren, wurde die Prozentzahl der IL-6+Zellen innerhalb der CD11b+Milzzellpopulation nach einer Stimulierung mit CpG 5µg/ml intrazellulär mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die CLP-behandelten Mäuse bekamen 6 Stunden vor der Organentnahme 20µg MIF bzw. PBS zur Kontrolle verabreicht. (n=8-11 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

Eine vorangegangene CLP führte bei einer weiteren ex vivo Stimulierung mit CpG von Milzzellen zu einem deutlichen, jedoch nicht signifikanten Anstieg der intrazellulär detektierbaren Menge an IL-6. Die MIF-Behandlung von CLP-Mäusen führte in den restimulierten CD11b+Milzzellen zu keiner Veränderung der IL-6-Produktionsfähigkeit.

### 3.2.10.1.4 IL-12 Expression von CD11b+Zellen

Die primären Quellen für das Zytokin IL-12 sind Makrophagen und Dendritische Zellen. IL-12 hat eine wichtige Funktion in der Aktivierung der adaptiven Immunität, indem es die IFN $\gamma$ -Produktion von T- und NK-Zellen stimuliert (Abbas und Lichtman 2005). Die durchflusszytometrische Quantifizierung nach der Restimulierung von Milzzellen wurde benutzt, um den Anteil der IL-12+Zellen unter den CD11b+Milzzellen zu bestimmen. Verglichen wurden Zellen aus naiven Mäusen mit solchen, die während der CLP-induzierten Immunparalyse entweder MIF oder zur Kontrolle PBS erhalten hatten.



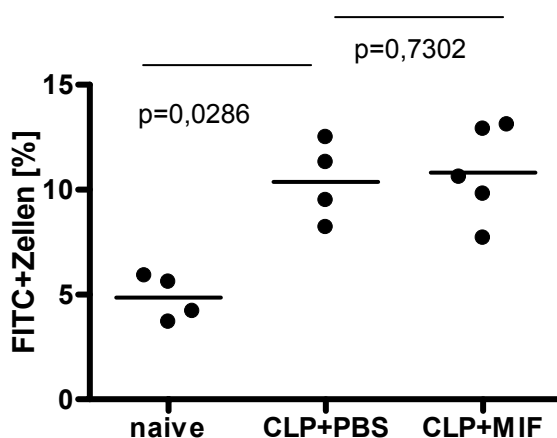
#### Abbildung 26: Einfluss von MIF auf die IL-12 Produktion von Makrophagen

Bei naiven Mäusen und solchen, die 2 Tage zuvor eine CLP bekommen hatten, wurden die Prozentzahlen der IL-12+Zellen innerhalb der CD11b+Milzzellpopulation nach einer Stimulation von 5 $\mu$ g/ml CpG intrazellulär mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Mäuse mit einer CLP bekamen 6 Stunden vor der Organentnahme 20 $\mu$ g MIF bzw. zur Kontrolle PBS appliziert. (n=5-6 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

Die Produktionsfähigkeit der CD11b+Milzzellen für IL-12 verringert sich innerhalb von 2 Tagen nach einer CLP (Abbildung 26). Wurden CLP-Mäuse 6 Stunde vor der Organentnahme mit 20 $\mu$ g MIF behandelt, so nahm diese intrazellulär nachgewiesene Menge von IL-12 noch weiter ab. Die Reduktion der intrazellulär detektierten IL-12-Produktion bei den MIF-behandelten Mäusen im Vergleich zu naiven Mäusen hat sich signifikant ( $p=0,0087$ ) reduziert.

### 3.2.10.1.5 Phagozytose von CD11b+Milzzellen

Phagozytose von Erregern ist eine der Hauptfunktionen der Makrophagen. In Abbildung 15 wird gezeigt, dass durch eine vorangegangene CLP die Keimlast nach einer bakteriellen Zweitinfektion reduziert ist. Die MIF-Behandlung an Tag 2 nach einer CLP hingegen hob diesen Effekt auf. Es sollte daher untersucht werden, ob diese Beobachtung auf eine MIF-erzielte Veränderung der Phagozytoseleistung von Makrophagen zurückzuführen ist. Für die Untersuchung wurden Makrophagen aus Milzen isoliert und ihre Phagozytoseleistung bei einer Stimulierung mit LPS und IFN $\gamma$  anhand der Aufnahme FITC-markierter Latexkügelchen durchflusszytometrisch gemessen.



**Abbildung 27: Einfluss von MIF auf die Phagozytoserate von Makrophagen am Tag 2 nach CLP**  
Frisch isolierte Milzen von 3 Mausgruppen: Mäuse in einer Gruppe waren naiv, die Mäuse in den 2 anderen Gruppen erfuhren 2 Tage zuvor eine CLP. Die operierten Tiere wurden 6 Stunden vor der Organentnahme mit PBS bzw. 20 $\mu$ g MIF i.p. behandelt. Nach der Gewinnung von Einzelzellen wurden die Makrophagen über Adhärenz angereichert und für 2 Stunden mit FITC-Latexkügelchen in Gegenwart von 100ng/ml LPS und 50ng/ml IFN $\gamma$  bei 37°C inkubiert. Die der prozentuale Anteil FITC+Makrophagen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. (n= 4-5 C57Bl/6 Mäuse)

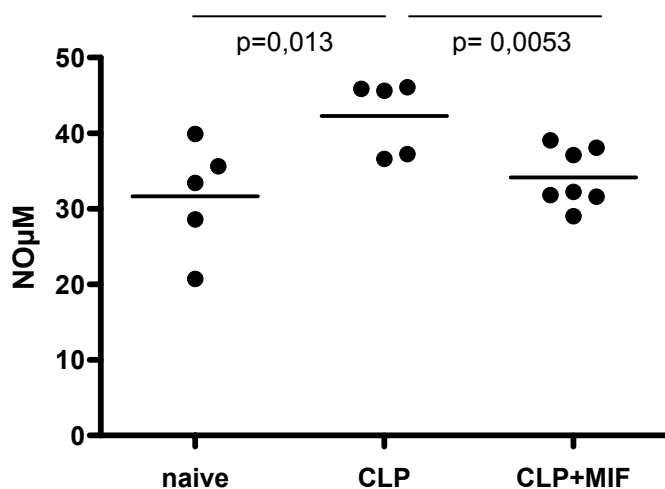
Abbildung 27 zeigt, dass in der Gruppe der naiven Mäuse 5% der durch Adhärenz isolierten Makrophagen die angebotenen FITC-Latexkügelchen aufnahmen, was am Anstieg der Makrophagen mit einem FITC-positiven Signal in der durchflusszytometrischen Analyse zu sehen war. Dieser Anstieg der FITC-positiven Zellen war signifikant, da doppelt so viele CD11b+Makrophagen detektiert wurden. Eine MIF-Vorbehandlung 6 Stunden vor der Organentnahme zeigte keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil FITC+Makrophagen.

### 3.2.10.1.6 Nitrit-Produktion von Makrophagen

Nitrit (NO) ist ein gasförmiges Radikal. Es reguliert den Blutdruck, die Blutgerinnung, die Leukozytenadhäsion, die neuronale Transmission und beeinflusst die zytostatische und zytotoxische Funktion der Makrophagen (Nathan und Xie 1994). Produziert wird es enzymatisch durch NO-Synthetasen (NOSs). Diese Synthetasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: eine Gruppe exprimiert Nitrit konstitutiv und wird deshalb als cNOS bezeichnet, während die andere Gruppe (iNOS) bei Infektionen durch bakterielle Bestandteile wie LPS aber auch durch Zytokine induziert (Gray, Julou-Schaeffer *et al.* 1990).

Eine hohe Nitritproduktion führt zu einer Organschädigung und erhöht somit die Mortalität der Sepsis (Hauser, Bracht *et al.* 2005). Da MIF nicht nur das Überleben nach einer Sekundärinfektion (Abbildung 14), sondern auch die Organbelastung reduziert (Abbildung 16), sollte die NO-Produktion der Makrophagen in diesem Model überprüft werden.

Die aus den Milzen der Mäuse isolierten Makrophagen wurden für 3 Tage mit IFN $\gamma$  und LPS kultiviert und im Überstand Nitrit mit dem Gries-Reagenz photometrisch quantifiziert.



**Abbildung 28: Einfluss von MIF auf die NO Produktion von Makrophagen am Tag 2 nach einer CLP** Verglichen wurden die NO-Produktion im Kulturüberstand von  $2,5 \times 10^6$  Milz-Makrophagen aus Mäusen, die naiv waren bzw. am Tag 2 nach der CLP entweder 20 $\mu$ g MIF oder als Kontrolle PBS bekommen hatten. (n=5-6 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

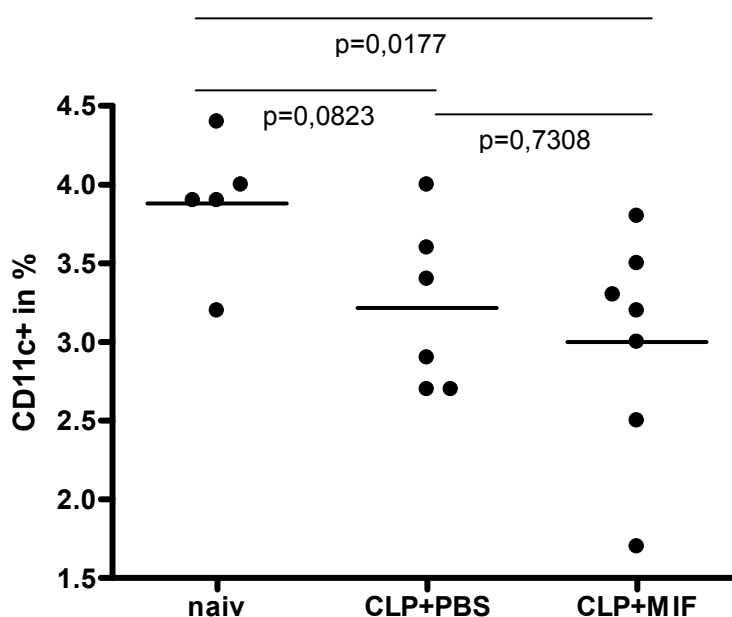
Die Restimulierung von Makrophagen aus Mäusen, die 2 Tage zuvor eine CLP erlitten hatten, führte zu einer signifikanten Erhöhung ( $p=0,013$ ) der produzierten Nitritmenge. Diese Erhöhung zeigte sich nicht in den Zellen, die aus den operierten Mäusen mit zusätzlicher MIF-Behandlung gewonnen wurden. Die Abnahme der NO-Produktion in Zellen der MIF-behandelten Mäuse gegenüber der PBS-behandelten Kontrollgruppe war signifikant ( $p=0,0053$ ).

### 3.2.10.2 Einfluss von MIF auf Dendritische Zellen (DC)

Dendritische Zellen sind ein Bindeglied der frühen angeborenen und der späteren erworbenen Immunantwort (Abbas und Lichtman 2005). Ihre Zellzahl und Aktivität sollten als immunologische Parameter für den schützenden Effekt einer MIF-Behandlung von immunparalytischen Mäusen bestimmt werden. Durch MIF könnte sich sowohl Anzahl als auch Funktion dieser Zellen ändern.

#### 3.2.10.2.1 Einfluss von MIF auf die Anzahl der Dendritischen Zellen

Zunächst wurde die Anzahl der Dendritischen Milzzellen über den Oberflächenmarker CD11c in den Milzen von Mäusen nach einer CLP durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür sind Mäuse am Tag 2 nach einer CLP, die entweder 6 Stunden vor der Milzentnahme PBS oder MIF bekommen hatten, verglichen worden.



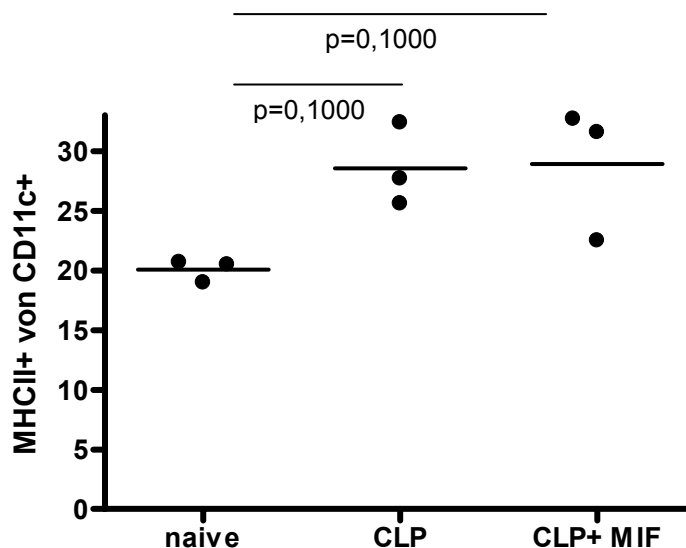
**Abbildung 29: Einfluss von MIF auf die CD11c+ Zellen der Milz**

In der Milzzellpopulation wurde der prozentuale Anteil der CD11c+ Zellen in Prozent bestimmt. Verglichen wurden Milzzellen aus naiven Mäusen mit solchen aus Mäusen, die am 2 Tag 6 Stunden vor der Organentnahme MIF bzw. PBS als Kontrolle erhalten hatten. (n=5-7 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

Die durchflusszytometrische Analyse der Milzzellen ergab, dass am Tag 2 nach einer CLP die CD11c+Milzzellen um etwa 18% abnahmen. Eine MIF-Gabe 6 Stunden vor der Organentnahme, also zum Zeitpunkt des MIF-Schutzes vor bakterieller Sekundärinfektion, zeigte keinen Einfluss auf die Anzahl der DC operierten Tiere.

### 3.2.10.2.2 Aktivierungszustand der CD11c+Milzzellen

Der Aktivierungszustand der DC sollte überprüft werden, um Hinweise auf einen Einfluss von MIF auf die Aktivierung dieser Zellpopulation zu erhalten. Der *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) ist wichtig für die Präsentation von Antigenen aktivierter DCs und wurde als ein Marker zur Bestimmung des Aktivierungszustandes gewählt.



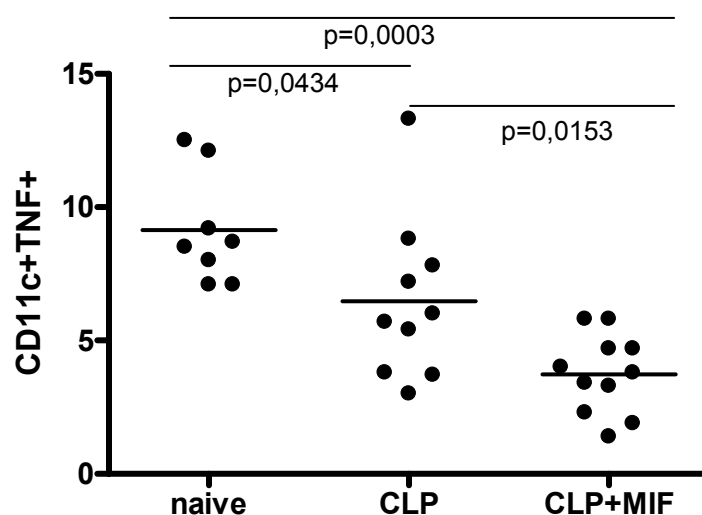
**Abbildung 30: Einfluss von MIF auf den Aktivierungszustand CD11c+Milzzellen**

In der Milzzellpopulation wurde der Anteil MHCII-tragender CD11c+Zellen bestimmt. Verglichen wurden Milzzellen aus naiven Mäusen mit Milzzellen aus Mäusen, die an Tag 2 6 Stunden vor der Organentnahme MIF bzw. PBS als Kontrolle erhalten hatten. (n=3 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

Die CLP führte zu einer Erhöhung von MHCII auf der Oberfläche von CD11c+Milzzellen innerhalb der ersten 2 Tage. Wurde den Mäusen post-CLP, 6 Stunden vor Organentnahme, nach der CLP MIF verabreicht, so hatte dies keine weitere Auswirkung auf die Prozentzahl der MHCII+CD11c+Milzzellen.

### 3.2.10.2.2 TNF-Expression der CD11c+Milzzellen

DC sollten auf ihre Fähigkeit zur TNF-Produktion während der Immunparalyse durchflusszytometrisch geprüft werden. Zur Überprüfung des MIF-Einflusses während der Immunparalyse wurden Mäuse am 2. Tag nach einer CLP entweder mit PBS oder MIF behandelt. Analysiert wurde der Prozentsatz der TNF-positiven Zellen innerhalb der CD11c+Milzzellpopulation nach einer Restimulierung mit CpG.



**Abbildung 31: Einfluss von MIF auf die TNF- Produktion in CD11c+ Milzzellen**

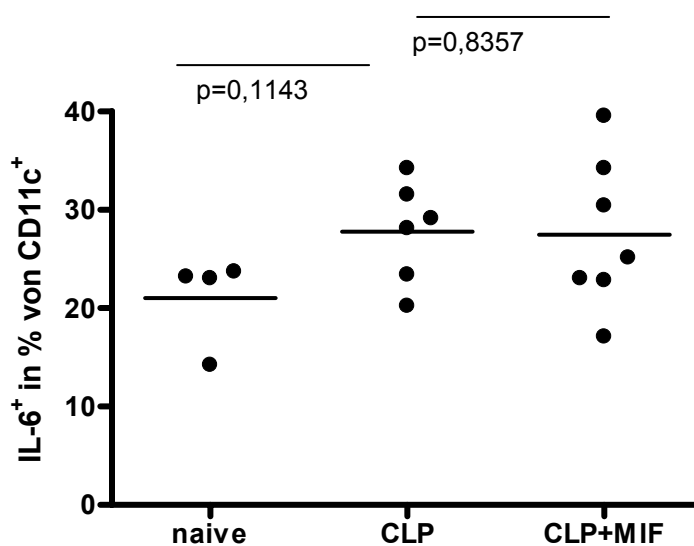
Innerhalb der Milzzellpopulation wurde der Anteil der TNF+Zellen in Prozent von den CD11c+Milzzellen bestimmt. Verglichen wurden Milzzellen aus naiven Mäusen und solchen, die an Tag 2, also 6 Stunden vor der Organentnahme, MIF bzw. PBS erhalten hatten. Für die Restimulation der Milzzellen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit  $5 \mu\text{g/ml}$  CpG für 4 Stunden zusammen mit dem GolgiStop® inkubiert.

(n=8-11 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

Der prozentuale Anteil der TNF-produzierenden CD11c+Milzzellen der untersuchten Tiere ist in Abbildung 31 dargestellt. CD11c+Milzzellen aus naiven Tieren produzierten nach Restimulierung mit CpG das inflammatorische Zytokin TNF. Die Mausgruppe, die 2 Tage zuvor einer CLP unterzogen worden war, zeigte eine signifikant ( $p=0,0434$ ) verminderte Expression für TNF. Wurde solchen immunparalytischen Mäusen 6 Stunden vor der Organentnahme MIF verabreicht, so sank die Anzahl TNF-produzierender DC nochmals signifikant ( $p=0,0153$ ). Verglichen zu naiven Mäusen ist diese TNF-Abnahme hoch signifikant.

### 3.2.10.2.4 IL-6-Expression von CD11c+Zellen

DC wurden neben Makrophagen ebenfalls als IL-6-Quelle nach der MIF-Verabreichung in Mäusen nach einer CLP durchflusszytometrisch untersucht.



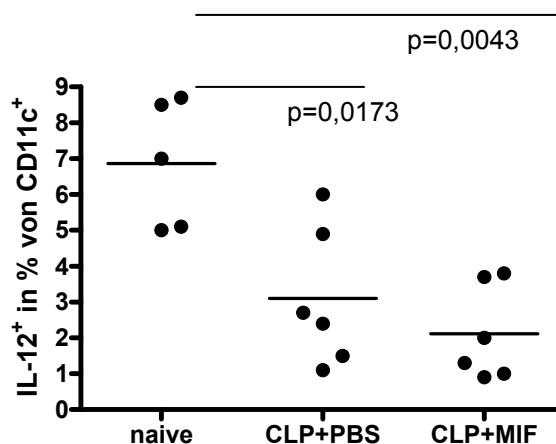
**Abbildung 32: Einfluss von MIF auf die intrazelluläre IL-6-Produktion in CD11c+ Milzzellen nach einer CLP**

In naiven Mäusen und solchen, die 2 Tage zuvor eine CLP bekommen hatten, wurden die Prozentzahlen der IL-6+Zellen innerhalb der CD11c+Milzzellpopulation nach einer Stimulation mit 5µg/ml intrazellulär mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Mäuse mit einer CLP bekamen 6 Stunden vor der Organentnahme 20µg MIF bzw. PBS zur Kontrolle. (n=4-7 Mäuse pro Gruppe)

Die Restimulierung der Milzzellen zeigte, dass die IL-6-Produktionsfähigkeit der CD11c+Zellen aus der Milz durch eine vorangegangene CLP erhöht war (Abbildung 32). Diese Erhöhung von IL-6 war nicht signifikant und wurde durch eine vorausgegangene MIF-Behandlung innerhalb von 6 Stunden auch nicht erhöht.

### 3.2.10.2.5 IL-12-Expression von DC

Aus der Milzen der Mäuse sollten DC neben Makrophagen als weitere bedeutende IL-12-Produzenten im Durchflusszytometer auf die Expression von IL-12 untersucht werden. Auch hier waren Mäuse am 2. Tag nach einer CLP und 6 Stunden vor der Organentnahme mit MIF behandelt worden.



#### Abbildung 33: Einfluss von MIF auf die intrazelluläre IL-12-Produktion in CD11c+ Milzzellen

Bei naiven Mäusen und solchen, die 2 Tage zuvor eine CLP erhalten hatten, wurde die Prozentzahl der IL-12+Zellen innerhalb der CD11c+Milzzellpopulation nach einer Stimulation von 5µg/ml CpG intrazellulär mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Mäuse, die eine CLP erfahren hatten, bekamen 6 Stunden vor der Organentnahme 20µg MIF bzw. PBS zur Kontrolle. (n=5-6 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

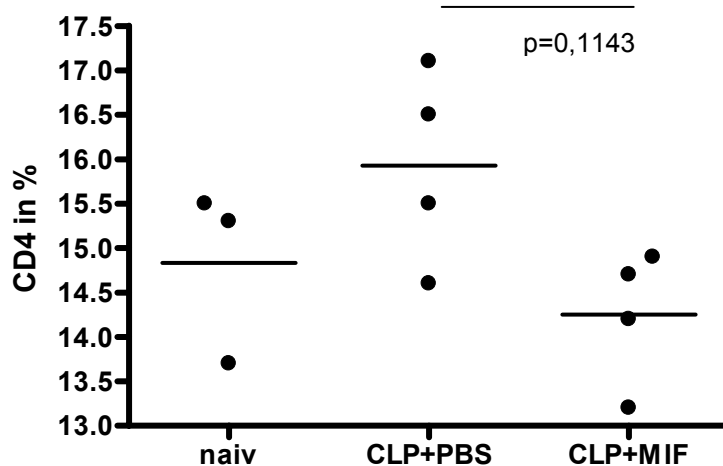
In den mit CpG restimulierten Milzzellen aus naiven Mäusen waren etwa 7% CD11c+Milzzellen auch positiv für IL-12 (Abbildung 33). Die CLP bewirkte innerhalb von 2 Tagen eine signifikant ( $p=0,0173$ ) verminderte Fähigkeit IL-12 zu produzieren. Diese IL-12-Produktion nahm nochmals weiter ab, wenn die Mäuse 6 Stunden vor der Organentnahme MIF verabreicht bekommen hatten. Gegenüber der naiven Mausgruppe ist diese Abnahme der IL-12 Produktionsfähigkeit hoch signifikant ( $p=0,043$ ).

### 3.2.10.3 Der Einfluss von MIF auf die T-Zellen

Es wurde überprüft, wie sich die Behandlung der Mäuse am Tag 2 nach einer CLP auf T-Zellen auswirkt. Dafür wurde die Anzahl der T-Helferzellen und der regulatorischen T-Zellen bestimmt.

#### 3.2.10.3.1 Einfluss von MIF auf die Anzahl der T-Helferzellen

Um den Einfluss auf MIF zum Zeitpunkt der sepsisinduzierten Immunparalyse besser zu verstehen, sollte untersucht werden, ob sich die Anzahl der T-Zellen in der Milz nach der MIF-Applikation in der sepsisinduzierten Immunparalyse verändert.



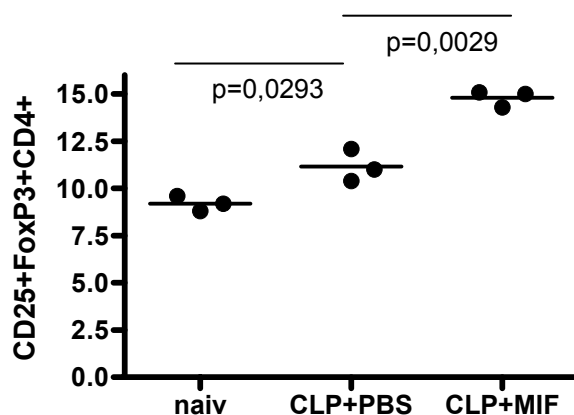
#### Abbildung 34: Anzahl der CD4+Milzzellen

Bei naiven Mäusen und Mäusen, die an Tag 2, 6 Stunden vor der Milzentnahme, entweder mit PBS oder mit 20µg MIF behandelt worden waren, wurde die Anzahl der CD4+Milzzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (n=3-4 C57Bl/6 Mäuse pro Gruppe)

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt in Abbildung 34 einen leichten Anstieg der T-Helferzellen in Milzen aus solchen Mäusen, die 2 Tage zuvor eine CLP erfahren hatten. Wurde den Mäusen 6 Stunden vor der Organentnahme MIF verabreicht, so zeigte sich in der Durchflusszytometrischen Analyse wieder eine Reduktion der T-Helferzellen. Diese Veränderung der T-Helferzellen, in der Milz ist allerdings statistisch nicht signifikant.

### 3.2.10.3.2 Einfluss von MIF auf CD25+FoxP3+CD4+Zellen

Die Auswirkung einer MIF-Applikation sollte an Tag 2 nach einer CLP auf die Anzahl der regulatorischen T-Zellen, wegen deren immunregulatorischer Funktion (Hubert, Jacobs et al. 2007), in der Milz untersucht werden. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Oberflächenmarker CD25 und FoxP3 zur Identifizierung der regulatorischen CD4+Milzzellen verwendet.



#### Abbildung 35: Einfluss von MIF auf CD25+FoxP3+CD4+Zellen

Innerhalb der Milzzellpopulation wurde der Anteil an CD25+FoxP3+ Zellen in Prozent der CD4+Milzzellen bestimmt. Verglichen wurden Milzzellen aus naiven Mäusen mit solchen Mäusen, die an Tag 2, 6 Stunden vor der Organentnahme, MIF bzw. PBS als Kontrolle erhalten hatten. (n=3 Mäuse pro Gruppe)

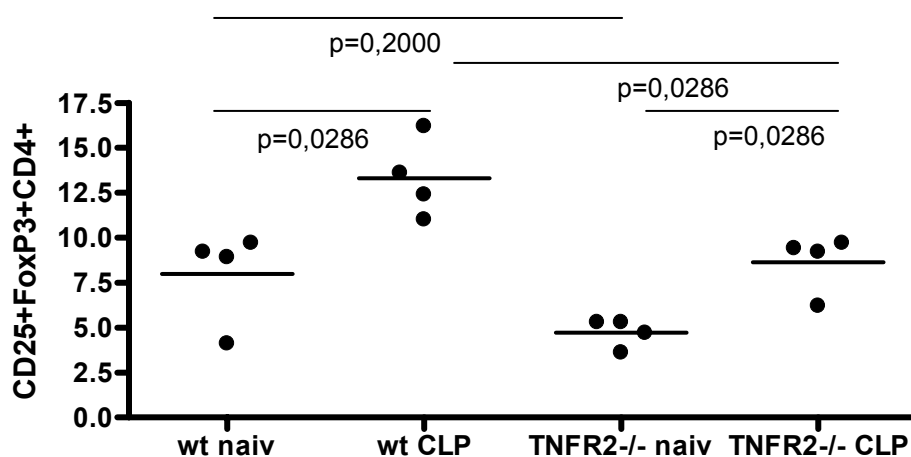
Natürliche regulatorische T-Zellen nahmen nach CLP innerhalb von 2 Tagen signifikant ( $p=0,0231$ ) um 20% zu. Erhielten die Mäuse 48 Stunden nach dem Eingriff  $20\mu\text{g}$  MIF i.p. war eine Erhöhung von regulatorischen T-Zellen um weitere 32% gegenüber den PBS-behandelten Mäusen nach der CLP zu beobachten. Dieser Anstieg an regulatorischen T-Zellen von MIF-behandelten CLP-Mäusen gegenüber derjenigen Mausgruppe, die nach der Operation PBS erhalten hatten, ist hochsignifikant ( $p=0,0029$ ).

### 3.3 Beeinflussung regulatorischer T-Zellen durch TNF

Die Gabe von MIF während der Immunparalyse führte zu einer Reduktion der TNF-Produktion, daher wurde die Bedeutung von TNF für die Funktion regulatorischer T-Zellen untersucht.

#### 3.3.1 Die Bedeutung des TNFR2 für CD25+FoxP3+CD4+Zellen

Regulatorische T-Zellen hemmen die Proliferation der T-Zellen (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995) und sind somit für die Gegenregulation einer angehenden T-Zellexpansion wichtig. Im Gegensatz zu T-Helferzellen tragen Treg viel TNFR2 auf ihrer Zelloberfläche. Die Bedeutung des TNFR2 für die Generierung regulatorischer Zellen nach der CLP wurde durchflusszytometrisch untersucht.



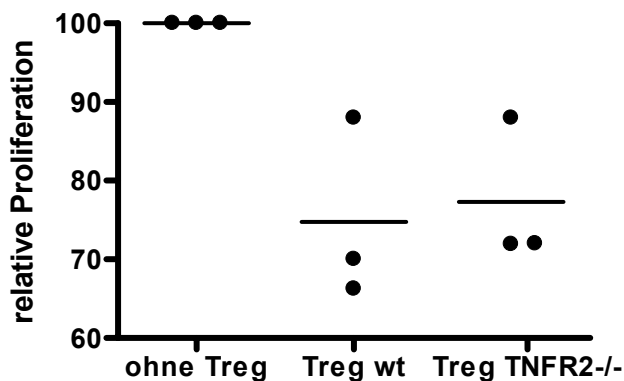
**Abbildung 36: Proliferation von CD4+Milzzellen in Abhängigkeit des TNFR2.**

Es wurden C57Bl/6 Mäuse und TNFR2<sup>-/-</sup>-Mäuse zum einen im naiven Zustand, zum anderen am Tag 2 nach einer CLP auf die Zahl ihrer CD25+FoxP3+CD4+Milzzellen mittels Durchflusszytometer analysiert. (n=4 Mäuse pro Gruppe)

Bei naiven Wildtyp-Mäusen waren zwischen 5 und 10% der CD4+Milzzellen natürliche regulatorische T-Zellen (Abbildung 36). Mäuse, die defizient für den TNFR2 sind, hatten etwas weniger Treg. Nach CLP kam es in beiden Mauslinien zu einem gleich starken Anstieg der Treg (jeweils  $p=0,0286$ ). Verglich man naive Wildtyp-Mäuse mit TNFR2-defizienten Mäusen, so hatten die TNFR2-defizienten Mäuse nach der CLP signifikant weniger CD25+FoxP3+Zellen in der CD4+Milzzellpopulation.

### 3.3.2 Suppressivität regulatorischer T-Zellen in Abhängigkeit des TNFR2

Die beobachtete verminderte Anzahl von CD25+FoxP3+CD4+Milzzellen in TNFR2-defizienten Mäusen nach CLP, veranlasste eine genauere Untersuchung der regulatorischen T-Zellen in Abhängigkeit des TNFR2. Es sollte *in vitro* überprüft werden, ob für die Suppressivität regulatorischer T-Zellen der TNFR2 von funktioneller Bedeutung ist.



#### Abbildung 37: Suppressivität der CD25+FoxP3+CD4+Milzzellen in Abhängigkeit des TNFR2

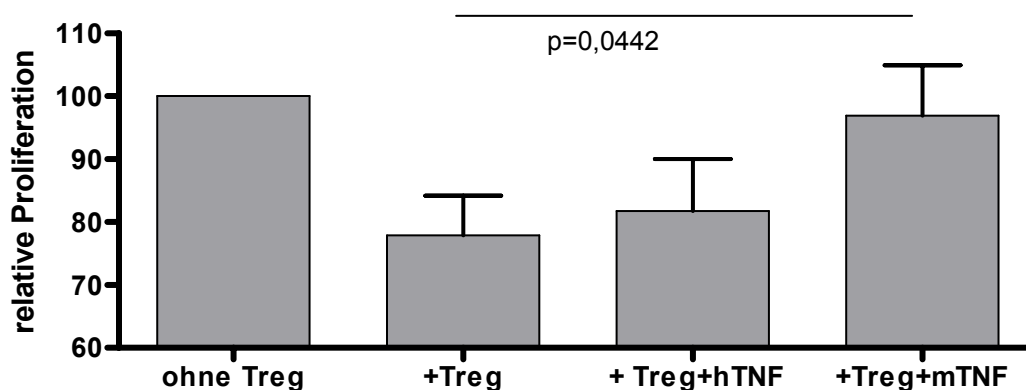
Gezeigt ist die relative Suppression von CD25+FoxP3+CD4+Milzzellen auf CFSE-markierten CD25-CD4+Milzzellen. Die Proliferation wurde nach 2 Tagen Kultivierung in Gegenwart von 0,1µg/ml αCD3 durchflusszytometrisch gemessen.

Da es sich um 3 einzelne Experimente mit jeweils 10 gepoolten Milzen von C57Bl/6 Mäusen handelt, wurde die Proliferation der CFSE-markierten CD25-CD4+Zellen der 3 Experimente auf jeweils 100 Prozent gesetzt. Die Proliferation in Gegenwart von CD25+CD4+Milzzellen ist in Relation zu den proliferierten T-Effektoren dargestellt.

Die Abbildung 37 zeigt, dass CD25+FoxP3+CD4+Zellen die Proliferation von CD25-CD4+Milzzellen hemmen. Die Suppression betrug unabhängig davon, ob die CD25+CD4+Zellen aus den Wildtyp-, oder aus den TNFR2-defizienten Mäusen isoliert wurden, ungefähr 25%.

### 3.3.3 Einfluss von TNF auf die Suppression von CD25+FoxP3+CD4+Zellen

TNF hemmt die suppressorische Wirkung von CD25+FoxP3+CD4+Zellen auf die Proliferation von T-Zellen (Valencia, Stephens et al. 2006). Post-CLP-Mäuse die mit MIF behandelt wurden zeigten eine erniedrigte TNF-Produktionsfähigkeit. Es sollte daher *in vitro* überprüft werden, ob TNF zur Proliferationshemmung von CD4+T-Zellen durch Treg führt. Für die Untersuchung wurde die gezielte Stimulierbarkeit des TNFR1 über humanes TNF und die unspezifische Stimulierung beider Rezeptoren mit Maus-TNF (Lewis, Tartaglia *et al.* 1991) zu nutze gemacht. Vorversuche zeigten, dass humanes TNF um den Faktor 10 besser zum Absterben der L929-Zellen führt. Deshalb wurden in diesem Versuchsansatz biologisch äquivalente Mengen von humanen und Maus-TNF eingesetzt.



**Abbildung 38: Aufhebung der Suppressivität von CD25+FoxP3+CD4+Zellen aus der Milz durch Maus-TNF**

Verglichen ist die Proliferation von CD25-CD4+Zellen nach einer Stimulierung mit 0,1µg/ml Antikörpern gegen CD3 und antigenpräsentierenden Zellen. Den Kulturen wurde bei Zugabe von CD25+FoxP3+CD4+Zellen entweder kein TNF bzw. 1ng/ml humanes TNF oder 10ng/ml Maus-TNF zugegeben. Dargestellt sind 3 Experimente, wobei die Proliferation der CD25-CD4+Zellen jeweils auf 100% gesetzt wurde, und die Proliferation in der Gegenwart von CD25+FoxP3+CD4+Zellen in Relation zu diesem Wert dargestellt ist.

(Zellen wurden gepoolt n= 10 Mäusen pro Experiment; Proliferation jeweils in Triplikat-Kulturen, die vor der durchflusszytometrischen Messung vereinigt wurden) (Statistik: T-Test, gepaarter Merkmale)

Abbildung 38 zeigt eine Hemmung der Proliferation von CD4+Milzzellen nach Kokultur mit Treg. Durch die Zugabe von humanem TNF veränderte sich diese Suppression nicht. Wurde der Kultur Maus-TNF zugegeben, so reduzierte sich die suppressive Aktivität der regulatorischen T-Zellen bzw. wurde aufgehoben.

## 4. Zusammenfassung

Untersuchungen am klinisch relevanten Mausmodell für septische Peritonitis, hervorgerufen durch CLP zeigen, dass sich nach zwei Tage eine erhöhte Empfindlichkeit für bakterielle Sekundärinfektionen entwickelte. Der MIF-Spiegel im Serum von Mäusen nach einer CLP steigt innerhalb weniger Stunden an und fällt dann unter einen basalen Spiegel ab. Der reduzierte MIF-Spiegel geht mit einer erhöhten Empfindlichkeit für bakterielle Zweitinfektionen einher, die Mäuse befinden sich in der sogenannten Immunparalyse. Eine MIF-Behandlung sechs Stunden vor der Zweitbelastung führt zu einem deutlichen Schutz der Mäuse (Pollak, Sterns et al. 2005). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die schützende Wirkung einer MIF-Behandlung nach CLP auf die Beeinflussung entzündungsrelevanter Parameter zurückzuführen ist.

CLP bewirkte eine verminderte Produktionsfähigkeit proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-6 und IL-12, - wohingegen IL-10 und IFN $\gamma$  nach einer CLP gut induzierbar waren. Durch die MIF-Behandlung von post-CLP-Mäusen ließen sich die inflammatorischen Zytokine TNF, IL-12 und IL-10 weniger gut induzieren.

Die rasche Tryptophandepletion nach CLP spricht für die Aktivierung derIDO-Aktivität. Die verminderte primäre B-Zellantwort zu diesem frühen Zeitpunkt nach CLP konnte durch das Tryptophanderivat 1MT, das als IDO-Inhibitor wirkt, verbessert werden.

Die prozentuale Zunahme regulatorischer T-Zellen nach CLP wurde durch MIF verstärkt. Gezeigt wurde auf funktionaler Ebene, dass die Suppressivität dieser regulatorischer Zellen auf die T-Zellproliferation durch TNF aufgehoben werden konnte.

Zum Infektionszeitpunkt nahm die MIF-Behandlung neben inflammatorischer Zytokine auch die gute Nitrit-Produktionsfähigkeit der Milzmakrophagen CLP-Mäusen ab.

Die nach CLP verbesserte Keimeliminierung reduzierte sich ebenfalls durch die MIF-Behandlung wieder. Dies zeigt, dass die geringere Fähigkeit Keime zu eliminieren mit dem Überlebensvorteil MIF-behandelter immunsupprimierter Mäuse einhergeht.

Die schützende Wirkung von MIF für immunparalytische Mäuse beruhte somit auf einer generellen Reduzierung entzündlicher Parameter, was zu geringeren Organschäden, gezeigt über die Aktivitätsabnahme der Lebertransaminasen AST und ALT, führte. Dies begünstigte somit das Überleben einer bakteriellen Sekundärinfektion.

## 5. Diskussion

Die Sepsis ist noch heute trotz vieler intensivmedizinischer Fortschritte eine schwer kontrollierbare Erkrankung. Um sie bestmöglichst therapieren zu können, ist es notwendig, diese Erkrankung in ihren Ursachen und Folgen für das Immunsystem besser zu verstehen und sich über Therapiemöglichkeiten klar zu werden.

Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass das Serumlevel von MIF in der sepsisinduzierten Immunparalyse unterhalb des physiologischen Spiegels liegt. Die erhöhte bakterielle Empfindlichkeit für eine bakterielle Zweitinfektion kann zu diesem Zeitpunkt durch eine Behandlung mit MIF reduziert werden (Pollak, Sterns et al. 2005).

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die sogenannte Immunparalyse, die sich durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer bakteriellen Zweitinfektion zeigt, im Mausmodell überprüft. Hierfür wurden Mäuse an verschiedenen Tagen nach einer CLP mit *S. tm* infiziert. Die Beobachtung der Tiere an den folgenden Tagen zeigte, dass die vorangegangene CLP dazu führte, dass weniger Mäuse die Zweitbelastung überlebten. Dabei fiel auf, dass die Immunparalyse gemessen an der Mortalität der Tiere bei Belastung am Tag 2 nach CLP stärker ausfiel als nach der Sekundärinfektion 4 oder 8 Tage nach der CLP (Abbildung 5). Die Sensibilisierung durch CLP trifft auch für Zweitinfektionen mit anderen pathogenen Keimen zu. Als eine weitere Sekundärinfektion wurde eine *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion gewählt. Auch mit diesem Keim zeigte sich eine erhöhte Mortalität von Mäusen die 2 Tage zuvor eine CLP erfahren hatten (Abbildung 6). Diese zwei Belastungsversuche bestätigten die Immunparalyse am 2. Tag nach CLP, die zum einen nicht Erreger-spezifisch ist und zum anderen Gültigkeit für die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme C57Bl/6 und NMRI hat.

Ziel dieser Arbeit war es, die schützende Wirkung einer exogenen Verabreichung von MIF zu untersuchen. Deshalb wurde die Gültigkeit dieser Schutzfunktion einer MIF-Vorbehandlung 6 Stunden vor einer bakteriellen Sekundärinfektion am 2. Tag einer CLP überprüft. Zu diesem Zeitpunkt liegt der endogene MIF-Spiegel unterhalb seines normalen Levels und kann nicht durch LPS an Stelle einer bakteriellen Infektion induziert werden (Abbildung 2). Dieser schützende Effekt einer MIF-Applikation zum Zeitpunkt der Immunparalyse wurde repräsentativ an NMRI Mäusen mit einer *S. tm*-Infektion reproduziert (Abbildung 14). Somit waren die experimentellen Voraussetzungen für eine Untersuchung der Immunparalyse durch MIF erfüllt.

Bisher war für die Immunparalyse die Mortalität der einzige Parameter, der für den Schutz von MIF herangezogen werden konnte. Es sollte überprüft werden, woran die Tiere in einer bakteriellen Zweitinfektion sterben und wie MIF immunologische Parameter beeinflusst.

Sepsispatienten versterben nicht selten durch ein generelles Multiorganversagen. Dieses kann auf Ausfälle des Herz-Kreislaufsystems, aber auch auf Versagen der Nieren oder der Leber zurückgeführt werden. Die beiden Enzyme Aspartataminotransferase (AST) und Alaninaminotransferase (ALT), die überwiegend in der Leber vorkommen, gelten im klinischen Bereich als ein zuverlässiger Indikator für Funktionsstörungen dieses Organs.

Um den Organschaden der Mäuse in unserem Model der bakteriellen Sekundärinfektion in der Immunparalyse zu untersuchen, sind die Enzymaktivitäten von AST und ALT bestimmt worden. Die Bestimmung des „besten Zeitpunktes“ für die Untersuchung der Leberbelastung durch *S. tm*-Sekundärinfektion erwies sich als schwierig. Das Sekundärinfektionsmodell führte zu relativ heterogenen Ergebnissen in den einzelnen Versuchsgruppen. Erklärbar ist an der unterschiedlich lange Zeit die verging bis sich in den CLP-Mäusen nach einer *S. tm*-Infektion die Mortalität der einzelnen Tiere zeigte. Wurde die AST/ALT-Aktivitätsbestimmung am 1. Tag bzw. 4. Tage nach dieser Sekundärinfektion durchgeführt, war nur manchmal ein Unterschied in der AST- und ALT-Aktivität zwischen den MIF-vorbehandelten CLP-Mäusen und den PBS-behandelten Kontrolltieren zu verzeichnen (nicht gezeigte Daten). In diesem Zeitraum blieben die mit *S. tm* infizierten post-CLP-Mäuse auch noch am Leben.

Es konnte für beide Lebertransaminasen gezeigt werden, dass sich diese sowohl durch die *S. tm*-Belastung als auch durch eine CLP erhöhten (Abbildung 16). Ein kumulativer Effekt dieser Enzymaktivität trat dann auf, wenn Mäuse nach der CLP zusätzlich mit *S. tm* infiziert worden waren. Dies ließ vermuten, dass die Zweitinfektion zu einem Organschaden der Mäuse führte. Die MIF-Behandlung vor der *S. tm*-Belastung führte zu einer deutlichen Reduktion der AST-Aktivität. Auch die Aktivität von ALT wurde durch die MIF-Vorbehandlung signifikant reduziert. In der Mausgruppe, die nicht mit MIF vorbehandelt wurde, schwankten die Enzymaktivitäten von ALT unter den einzelnen Tieren. Diese Streuung der Enzymreaktion sieht man nicht bei den MIF-vorbehandelten Mäusen. Möglicherweise sind die Kontrolltiere mit hohen Enzymaktivitäten diejenigen, die ohne das durch die Versuchsplanung bestimmte Versuchsende an der *S. tm*-Belastung gestorben wären.

Bei der Erforschung der Schutz-Wirkung einer MIF-Behandlung in der Immunparalyse war es von großem Interesse, ob die Belastung durch die Sekundärinfektion in unserem Modell auf eine fehlende Eliminierung der Keime zurückzuführen ist. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die erste massive bakterielle Belastung durch CLP Konsequenzen für die Bewältigung der

anschließend injizierten Bakterien haben könnte. Die Anzahl vitaler Keime wurde am Tag nach der bakteriellen Infektion im Lebergewebe der Versuchstiere quantifiziert. Bei einem Vergleich zwischen jenen Mäusen, welche 2 Tage vor der Belastung mit *E. coli* einer CLP unterworfen worden waren, mit Mäusen, die nur *E. coli* erhielten, zeigte sich, dass die vorangegangene CLP zu einer reduzierten Keimlast im untersuchten Organ führt (Abbildung 15). Die CLP-bedingte gute Keimeliminierung trifft auch auf Belastung mit anderen Keimen zu. Diese Beobachtung und weitere in dieser Arbeit nicht gezeigte Daten mit ähnlichem Versuchsaufbau, in dem die Mäuse anstelle der *E. coli*-Belastung nach der CLP mit *S. tm* oder mit *P. a.* infiziert worden sind, lassen den Schluss zu, dass die Keimeliminierung nach der CLP keinesfalls verschlechtert ist. Demnach korreliert die Keimeliminierung nicht mit dem Überleben einer bakteriellen Infektion. Diese fehlende Korrelation kann durch die Literatur belegt werden (Pene, Zuber *et al.* 2008).

Für die Eliminierung der Bakterien spielen NK-Zellen und Makrophagen eine wichtige Rolle. Für MIF war beschrieben worden, dass es die Phagozytoseleistung der Makrophagen verbessern würde (Onodera, Suzuki *et al.* 1997). Überraschend war daher das Resultat der reduzierten bakteriellen Eliminierung, wenn die Mäuse 6 Stunden vor der Sekundärinfektion MIF bekommen hatten. Bei den MIF-behandelten Mäusen wurden signifikant mehr koloniebildende Keime im untersuchten Organ gefunden (Abbildung 15). Dieser Befund durch Studien an MIF-defizienten Mäusen bestätigt, dass die Defizienz von endogenem MIF in diesen Tieren zu einer verbesserten Keimeliminierung führt (Bozza, Satoskar *et al.* 1999).

Um die verschlechterte Keimeliminierung durch die MIF-Behandlung vor einer bakteriellen Zweitbelastung näher zu untersuchen, wurde die Phagozytoseleistung von Makrophagen überprüft. Hierfür wurden die Makrophagen aus der Milz *ex vivo* mit FITC-markierten Latexkügelchen zusammen mit den makrophagenaktivierenden Stimuli LPS und IFN $\gamma$  inkubiert. Die von den Makrophagen aufgenommenen Latexkügelchen wurden durchflusszytometrisch quantifiziert. Der Versuch zeigte, dass sich durch die vorangegangene CLP die Phagozytoseleistung der Makrophagen erhöht. Eine Vorbehandlung mit MIF hatte auf die Phagozytoseleistung in unserem Studiendesign allerdings keinen Einfluss (Abbildung 15). Die verschlechterte Keimbewältigung durch MIF scheint somit nicht mit einer reduzierten Phagozytoseleistung der Makrophagen erklärt werden zu können, weswegen die Funktionalität der Makrophagen genauer untersucht wurde.

Die Nitrit-Produktion ist eine wichtige Funktion von Makrophagen zur Eliminierung von Erregern. Die Untersuchung der Nitritproduktionsfähigkeit von Makrophagen aus CLP-Mäusen zeigte, dass die durch CLP ausgelöste Entzündungsreaktion zu einer signifikant erhöhten Nitritproduktion führt. Diese Erhöhung kann zur Erklärung der verbesserten Keimeliminierung in

CLP-Mäusen herangezogen werden. Eine der Sekundärinfektion vorangegangene MIF-Behandlung führte in den Mäusen nicht nur zu Defiziten in der Beseitigung von Bakterien, sondern auch zu einer signifikant erniedrigten Nitrit-Produktionsfähigkeit von Milz-Makrophagen (Abbildung 28). Dabei ist zu beachten, dass nach der CLP der Anteil der Makrophagen in der Milz gleich bleibt, bzw. sich nach einer MIF-Behandlung tendenziell sogar erhöht (Abbildung 23). Der Effekt der Nitrit-Produktionsreduzierung durch MIF-Behandlung in der Immunparalyse wird dadurch noch bedeutender. Auch korreliert dieser Befund wieder mit den Forschungsergebnissen aus MIF-defizienten Mäusen (Bozza, Satoskar *et al.* 1999). In umgekehrter Weise produzieren Makrophagen aus diesen Mäusen nach einer LPS-Stimulierung mehr Nitrit. Die Beeinflussung der Keimeliminierung lässt sich demnach mit der reduzierten Nitrit-Produktionsfähigkeit der Makrophagen erklären. Möglicherweise ist gerade dies auch ein Indiz für die Schutzfunktion durch MIF in der Immunparalyse. Organschäden in der Sepsis werden auch mit einem hohen Aufkommen von Nitrit in Verbindung gebracht (Rosselet, Feihl *et al.* 1998). Dieses wiederum wird auf eine verstärkte iNOS-Aktivität, welche für diese Nitritgenerierung verantwortlich ist, zurückgeführt (Liu, Adcock *et al.* 1996). In Tierstudien konnten durch die selektive iNOS-Hemmung Organschäden reduziert werden, womit auch die Ausbildung eines septischen Schocks gering gehalten werden konnte. Somit ist anzunehmen, dass die Hemmung der Nitritproduktion einen interessanten therapeutischen Ansatz zur Beeinflussung der Sepsis darstellt (Holstad, Jansson *et al.* 1997; Rosselet, Feihl *et al.* 1998).

Publiziert ist, dass eine MIF-Stimulierung von Makrophagen zur Verbesserung ihrer Aktivität führt - gemessen an einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine (Bernhagen, Calandra *et al.* 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass die MIF-Behandlung von immunparalytischen Mäusen zu einer erniedrigten intrazellulären TNF-Menge in Makrophagen führt (Abbildung 24), Dadurch kommt es möglicherweise zu einer geringeren Aktivierung von TNF-abhängigen Immunreaktionen. Wie in unserer Arbeitsgruppe überzeugend gezeigt werden konnte, haben TNFR2-defiziente Mäuse unter den Versuchsbedingungen, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden, ebenfalls Defizite in der Nitrit-Produktion, die auf die reduzierte Expression von iNOS zurückgeführt wird (aktuelle unpublizierte Daten J. Polz). Die regulierte NO-Produktion nach der Behandlung mit MIF könnte somit eine therapeutisch nutzbare Strategie darstellen, die die Organbelastung in der Sepsis reduziert und damit hilft, die Mortalität während der Sepsis zu mindern.

Aus neueren Sepsisstudien ist bekannt, dass die Neutralisation von IL-17 ein möglicher Ansatz zur Reduzierung eines sepsisbedingten Organschadens ist (Flierl, Rittirsch *et al.* 2008). Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass mit der Neutralisation von IL-17 auch die in der Sepsis vorkommenden, für Organschäden verantwortlichen proinflammatorischen Zytokine reduziert vorliegen. Da die MIF-Behandlung wie in dieser Arbeit gezeigt, die Organbelastung reduziert, wurde die IL-17-Produktionsfähigkeit von Milzzellen überprüft (Abbildung 18). Interessanterweise nimmt die IL-17-Produktion bis zum 2. Tag nach einer CLP in Milzzellen ab. Die MIF-Verabreichung an Tag 2 beeinflusste die Produktion von IL-17 in der Milz nicht. Auch eine gründliche durchflusszytometrische Untersuchung von drainierenden und peripheren Lymphknotenzellen in diesem Modell zeigte zwar ebenfalls die Erniedrigung der IL-17-Produktion nach CLP, ließ aber auch keine Beeinflussung durch MIF erkennen (nicht gezeigte eigene Daten). Ausgeschlossen werden kann allerdings nicht, dass die IL-17-Expression im späteren Entzündungsgeschehen bzw. an anderer Stelle des immunparalytischen Organismus von Bedeutung ist.

Organschäden können aber auch von anderen Zytokinen herrühren. Beispielsweise wäre die Reduzierung inflammatorischer Zytokine in immunparalytischen Mäusen ein möglicher Benefit der MIF-Behandlung um weitere Organschädigungen zu vermeiden. Aus vorangegangener Arbeit unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass nach der CLP das proinflammatorische Zytokin IL-6 im Serum zunimmt (Sterns 2005). Eine Analyse von intrazellulärem IL-6 in Milz-Makrophagen (Abbildung 25) und Milz-DC (Abbildung 32) bestätigte, dass dieses Zytokin in einer *ex vivo*-Restimulation nach einer CLP erhöht ist. Zum untersuchten Zeitpunkt aber war es durch eine MIF-Vorbehandlung nicht beeinflusst.

Die Durchflusszytometrische Analyse der Makrophagen und DC zeigten, dass weder die Anzahl dieser Zellen, noch der Reifegrad der DC durch die MIF-Behandlung beeinflusst wurden (Abbildung 29, Abbildung 30). Obwohl sich am 2. Tag nach der CLP der Phänotyp der untersuchten Zellen nach einer MIF-Applikation innerhalb von 6 Stunden nicht veränderte, zeigten sich doch bereits funktionelle Unterschiede in der Produktion von IL-12 und TNF. IL-12 ist ein wichtiger Parameter für die aktivierte Funktion von Makrophagen und DC im Entzündungszustand (Abbas und Lichtman 2005). Die IL-12-Produktion anitgenpräsentierender Zellen fördert die T-Zellaktivierung, die sich in der Produktion von IFN $\gamma$ , einem proinflammatorischen Zytokin, zeigt. Die Untersuchung der Makrophagen aus Mäusen mit vorangegangener CLP zeigt einen erhöhten Anteil von IL-12-Produzenten. Die MIF-Injektion 6 Stunden vor der Organentnahme führte bei der Restimulation dieser Zellen zu einem geringeren

Anteil IL-12-positiver Makrophagen (Abbildung 26). Auch die Durchflusszytometrische Analyse der DCs aus gleich behandelten Mäusen zeigte die Erhöhung von IL-12 nach einer CLP, die durch MIF weniger stark ausfällt (Abbildung 33). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass auch die IFN $\gamma$ -Produktionsfähigkeit von T-Zellen aus der Milz nach dem 2. Tag nach der CLP anfänglich anstieg und dann wieder abfiel (Abbildung 8).

Die MIF-Vorbehandlung führte also zu reduzierter IL-12-Produktion und, wie zuvor schon angedeutet, zu einem verminderten TNF-Spiegel. Auch hier zeigte sich eine Parallelität zu TNFR2-defizienten Mäusen (aktuelle bisher unpublizierte Daten E. Martin). Die fehlende Signalweiterleitung von TNF über dessen Rezeptor TNFR2 bedingt eine reduzierte IL-12-Produktion in DC und Makrophagen.

Die gezeigte MIF-bedingte Abnahme der IL-12-Produktion von Makrophagen und DC kann somit ein Grund dafür sein, dass die mit MIF behandelten Mäuse die Zweitbelastung während der Immunparalyse besser überleben (Abbildung 14). Möglicherweise ist auch die Regulierung der IL-12-Produktionsfähigkeit durch MIF für den reduzierten Organschaden in den doppelt belasteten Mäusen ursächlich (Abbildung 16). Hinweise für diese Interpretation der MIF-Wirkung findet man in der Literatur. So kann ein Leberorganschaden, gemessen an AST und ALT, in Mäusen nach einer subletalen Dosis LPS durch die spezifische Behandlung der Tiere durch Antikörper gegen IL-12 reduziert werden (Ono, Ueno et al. 2003).

Besonders interessant ist das Ergebnis der TNF-Produktion nach der Behandlung mit MIF. Wie vielfach in der Arbeit gezeigt wurde, wird TNF in unserem System durch die Behandlung der Mäuse mit MIF reduziert. Hiermit wären wir wohl bei der am diversesten beschriebenen Wirkung von MIF. MIF wurde in der Literatur meist als ein proinflammatorisches Zytokin eingestuft. Dies erfolgte primär auf Grund der Beobachtung, dass unter Zellkulturbedingung die Stimulierung mit einem im *E. coli*-Proteinexpressionssystem hergestellten MIF, eine proinflammatorische Immunantwort induziert (Bernhagen, Calandra et al. 1993). Diesen Ergebnissen zufolge wurde postuliert, dass der schützende Effekt einer MIF-Applikation zwei Tage nach einer CLP zu einer Wiederabrufbarkeit des inflammatorischen Zytokins TNF führt (Pollak, Sterns et al. 2005). Dieser Effekt wurde in vorliegender Arbeit jedoch nicht beobachtet.

Zur Untersuchung der TNF-induzierenden Wirkung wurden verschiedene Quellen von MIF verwendet. Da MIF hoch konserviert ist (Kudrin und Ray 2008), wirkt bei der Maus sowohl das humane, als auch das rekombinant hergestellte Maus-MIF. Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit überprüft. Hierfür wurden naive NMRI-Mäuse erst mit MIF und nach 6 Stunden mit LPS behandelt. 90 Minuten später wurde der TNF-Spiegel im Serum dieser Tiere analysiert. Überraschenderweise zeigte sich, dass sowohl das in *Drosophila*-Schneiderzellen generierte

humane als auch das Maus-MIF zu einer Abnahme der TNF-Konzentration im Serum führte. Der Vorteil des eukaryontisch-exprimierten MIF ist, dass das verwendete Expressionssystem wahrscheinlich mit einer viel geringeren LPS-Kontamination als das *E. coli*-System einhergeht.

Dieses Ergebnis der TNF-reduzierenden Wirkung von MIF war unerwartet. Da aber primär der schützende Effekt von MIF in der Immunparalyse von Interesse war, wurde dieser Versuchsaufbau an C57Bl/6 Mäusen wiederholt, welche 2 Tage zuvor eine CLP erlebt hatten. Im Unterschied zum vorherigen Versuch wurde nun ein MIF benutzt, welches nach der *E.coli*-Expression nahezu LPS-frei gereinigt worden war. Auch dieses MIF reduzierte signifikant die TNF-Antwort auf LPS am Tag 2 nach CLP (Abbildung 17).

Die TNF-Produktions-reduzierende Wirkung von MIF konnte somit mehrfach gezeigt werden: im Serum von naiven Mäusen und solchen Mäusen, die 2 Tage zuvor eine CLP erfuhren, unabhängig davon, ob die Untersuchung der MIF-Wirkung auf die TNF-Level an NMRI- oder C57Bl/6-Mäusen durchgeführt wurde.

Wie bereits erwähnt konnte gezeigt werden, dass sich diese reduzierte TNF-Expression durch MIF in der CLP-bedingten Immunparalyse sich auch intrazellulär in Makrophagen und DC signifikant darstellen lässt (Abbildung 24, Abbildung 31).

Dieses Ergebnis hat Konsequenzen für die Interpretation der schützenden Wirkung von MIF in der sepsisinduzierten Immunparalyse. Die therapeutische Wirkung von MIF scheint in unserem System nicht über eine verstärkte Induktion der TNF-Produktion abzulaufen (Pollak, Sterns *et al.* 2005), sondern über eine Reduktion der TNF-Produktion. Diese Erkenntnis geht einher mit den Befunden aus unserer Arbeitsgruppe, die zeigen, dass sich Mäuse am Tag 2 nach einer CLP nicht durch eine exogene Gabe von TNF vor den Folgen der bakteriellen Sekundärinfektion schützen lassen (Echtenacher, Urbaschek *et al.* 2003).

An dieser Stelle soll noch einmal auf die kontroverse Datenlage zur Wirkung von MIF auf die TNF-Produktion hingewiesen werden. Einiges deutet darauf hin, dass die proinflammatorischen Eigenschaften von MIF auf LPS-Kontaminationen zurückzuführen sind (Kudrin und Ray 2008). Kudrin *et al.* verwendeten ein von LPS gereinigtes MIF, welches nach Angaben etwa 500-fach weniger LPS enthielt als das in anderen publizierten Studien verwendete MIF. Als Kudrin *et al.* dieses „saubere“ MIF für die Stimulierung von Monozyten und Fibroblasten einsetzten, wurde die proinflammatorische Wirkung von MIF ebenfalls nicht gesehen. Eine Ausnahme war die Induktion des Zytokins IL-8, welches weiterhin mit der MIF-Stimulierung induziert werden konnte. Auch konnte die proinflammatorische Wirkung von MIF gezeigt werden, wenn der MIF-Stimulierung kleine Menge an LPS wieder zugegeben wurden. Die TNF-Antwort fiel dann sogar

noch stärker aus, als nach alleiniger LPS-Stimulierung. Daraus wurde geschlossen, dass ein „LPS-verunreinigtes“ MIF einen synergistischen Effekt auf die proinflammatorische Antwort hat (Kudrin, Scott *et al.* 2006).

Schon früher gab es erste Hinweise darauf, dass MIF diese „proinflammatorischen Eigenschaften“ nicht immer zeigt. Im Kolitismodell konnten de Jong und seine Kollegen durch die Behandlung mit MIF keine TNF-Produktion in Peritonealmakrophagen induzieren (de Jong, Abadia-Molina *et al.* 2001). Zu einem ähnlichen Ergebnis führte das aus einem humanen T-Zellhybridomüberstand aufgereinigte MIF, das in dieser Studie als „Glykolisation inhibitorischen Faktor“ bezeichnet wurde, jedoch gleiche Aminosäuresequenz wie humanes MIF hat. Dieses aus dem eukaryontischen Expressionssystem gewonnene MIF führte ebenfalls nicht zu der vielfach publizierten Expression proinflammatorischer Zytokine.

Ähnlich fassettenreiche Beschreibungen über den TNF-Effekt von MIF kommen aus dem Lager der Forscher, die die MIF-defiziente Maus zur Herleitung der MIF-Wirkung einsetzten. Einige Arbeiten zeigen, dass diese Knockout-Tiere weniger TNF produzieren können (Bozza, Satoskar *et al.* 1999). Andere fanden nach einer LPS-Behandlung gleich hohe TNF Spiegel sowohl in den MIF-defizienten, als auch in den Wildtyp-Mäusen (Honma, Koseki *et al.* 2000). Erst kürzlich wurde veröffentlicht, dass MIF-defiziente Mäuse nach einer lebertoxischen ConcavalinA-Behandlung sogar erhöhte TNF-Produktion hatten (Stojanovic, Cvjeticanin *et al.* 2009).

Ein weiterer Hinweis dafür, dass MIF nicht unbedingt zu einer erhöhten TNF-Produktion führen muss, geht aus einer Kolitis-Studie mit TLR4-defizienten Mäusen, die keine Signalweiterleitung von LPS haben, hervor. Die TLR4-Kockout-Mäuse haben in der DSS-induzierten Kolitis eine erhöhte MIF-Expression, die nicht zu einer Induktion von TNF führt (Ohkawara, Takeda *et al.* 2005).

Mit der TNF-reduzierenden Wirkung von MIF kann auch der Effekt einer MIF-Behandlung auf die Generierung regulatorischer T-Zellen hergeleitet werden. Nach einer MIF-Behandlung kommt es schon innerhalb von 6 Stunden zu einer prozentualen Erhöhung der Anzahl regulatorischer T-Zellen innerhalb der CD4-positiven T-Zellpopulation (Abbildung 35). Treg gelten wegen ihrer T-Zellproliferations-hemmenden Eigenschaft als antiinflammatorisch (Sakaguchi, Sakaguchi *et al.* 1995).

Unmittelbar nach CLP steigt die TNF-Produktion, fällt aber innerhalb weniger Stunden wieder ab (Abbildung 7). Die anfängliche TNF-Freisetzung (Pollak, Sterns *et al.* 2005) ist für die Aktivierung weiterer Entzündungsreaktionen wichtig. Auch die Proliferation der T-Helferzellen nimmt in der Gegenwart von TNF zu (nicht gezeigte eigene Daten). Diese Expansion wird auf

verschiedenen Ebenen reguliert. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, nehmen nach der CLP beispielsweise die regulatorischen CD25+FoxP3+CD4+T-Zellen zu. Diese Treg sind potente Inhibitoren für die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen, wirken aber auch der Aktivierung von NK-Zellen, NKT-Zellen, B-Zellen und DC entgegen (Hubert, Jacobs et al. 2007). Schon ab dem 1. Tag nach der CLP nimmt der Anteil der regulatorischen CD25+FoxP3+Zellen innerhalb der T-Helferzellen zu. Ohne eine induzierte Sekundärinfektion steigt diese Zellpopulation kontinuierlich bis zum 3. Tag nach der CLP an (Abbildung 7). Wie in Abbildung 8 gezeigt, fällt nach dem 2. Tag nach CLP auch die IFN $\gamma$ -Produktionsfähigkeit der T-Zellen wieder ab. Parallel dazu nimmt auch die TNF-Produktionsfähigkeit ab (Abbildung 13). Diese Abnahme von TNF wurde auch in vivo gemessen (Pollak 2006). Der Zusammenhang einer Induktion von funktionell aktiven regulatorischen T-Zellen durch die Reduktion von TNF wurde auch in Patienten gezeigt, die auf Grund von starkem allergischem Asthma mit TNF-neutralisierenden Antikörpern therapiert worden waren. Dieser therapeutisch erzeugte „TNF-Mangel“ bewirkte die Hochregulation des für die Suppression wichtigen Transkriptionsfaktors FoxP3 (Lin, Shieh *et al.* 2008).

Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass für die Induktion der regulatorischen T-Zellen nach der CLP die Signalweiterleitung über den TNFR2 wichtig ist (Chen, Baumel *et al.* 2007). Dies konnte in vorliegender Arbeit bestätigt werden (Abbildung 36). Interessanterweise ist das Vorhandensein dieses Rezeptors auf der Oberfläche der Regulatoren nicht für die suppressorische Aktivität dieser Zellen essentiell (Abbildung 37). Dennoch wird die suppressorische Funktion dieser Zellen durch das Zytokinmilieu reguliert. Proinflammatorische Zytokine wie IL-6 oder TNF, die vor allem in einer angehenden Entzündungsreaktion vorhanden sind, steuern der Hemmung einer T-Zellaktivierung und Zellproliferation durch Treg entgegen (Pasare und Medzhitov 2003; Lin, Wang et al. 2008; Lin, Shieh et al. 2008). Die IL-6 Produktionsfähigkeit der Makrophagen und DC wurde bis zum Zeitpunkt der Untersuchung nach der MIF-Behandlung zwar nicht beeinflusst (Abbildung 25, Abbildung 32), wie aber mehrfach gezeigt, nahm die TNF-Produktion nach der MIF-Injektion ab (Abbildung 17, Abbildung 24, Abbildung 31). Der Einfluss von TNF auf die suppressive Aktivität der Treg wurde deshalb in Abhängigkeit einer TNF-Stimulierung in vitro untersucht. Die selektive Stimulierbarkeit des Maus-TNF-Rezeptors TNFR1 durch humanes TNF und die Stimulierung beider TNF-Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2) durch das Maus-TNF (Lewis, Tartaglia *et al.* 1991) wurden bei der Untersuchung der Auswirkung einer TNF-Stimulierung auf die suppressorische Funktion regulatorischer T-Zellen auf T-Helferzellen genutzt. Die Stimulierung beider Rezeptoren durch das Maus-TNF führte zu einer Reduzierung der Proliferationshemmung, während eine Hemmung durch die Stimulierung mit humanem TNF in unserem System nicht beobachtet wurde (Abbildung 38). TNF steigert also die Proliferation von

T-Effektorzellen und reduziert die suppressorische Aktivität der Treg. Da MIF die TNF-Antwort reduziert, kann dies als ein weiterer antiinflammatorischer Aspekt der Wirkung von MIF gedeutet werden. Zudem bewirkt MIF schon innerhalb von 6 Stunden einen signifikanten Anstieg der Treg (Abbildung 35). Gleichzeitig mit der Erhöhung der Treg nach der MIF-Behandlung während der Immunparalyse der Mäuse findet man in den Milzen eine tendenzielle Reduzierung T-Helferzellzahl. Wie dieser Anstieg der Treg durch MIF induziert wird, wurde im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es könnte jedoch sein, dass MIF eine direkte Induktion regulatorischer T-Zellen bewirkt. Möglicherweise ist die Erhöhung der Treg auf eine gesteigerte Empfindlichkeit der T-Helferzellen auf den programmierten Zelltod nach der CLP (Hotchkiss, Swanson *et al.* 1997) oder auf die Abnahme der Apoptose regulatorischer T-Zellen zurückzuführen. Studien belegen eine antiapoptotische Wirkung von MIF (Nguyen, Lue *et al.* 2003; Lue, Kapurniotu *et al.* 2006; Lue, Thiele *et al.* 2007).

Es ist durchaus möglich, dass die Behandlung mit MIF in der Immunparalyse über die Hemmung der Tryptophandepletion vor den Folgen einer Zweitinfektion schützt. Tryptophan ist eine limitierte Aminosäure, die für T-Zellen im Teilungsprozess essentiell ist. In der Entzündungsreaktion wird Tryptophan über das EnzymIDO zu seinen Kataboliten, den Kynureninen, umgesetzt (Mellor, Munn *et al.* 2003; Mellor und Munn 2003). Diese Kynurenine gelten als Auslöser für die Induktion der Apoptose von Th1-Zellen (Fallarino, Grohmann *et al.* 2006). Nach der CLP kommt es schon innerhalb weniger Stunden zu einer raschen Tryptophandepletion und einem zeitlich versetzten Anstieg seiner antiinflammatorischen Kataboliten (Abbildung 11).

Die Zweitinfektion in unserem Modell fand am Tag 2 statt. Dies ist der Zeitpunkt, an welchem der Tryptophan-Spiegel zwar wieder ansteigt, sich aber noch unterhalb des Basalwertes befindet. Es konnte gezeigt werden, dass MIF bereits innerhalb von 6 Stunden zu einer tendenziellen Aufhebung der geringeren Tryptophandepletion führt (Abbildung 22).

In dieser Arbeit wurde anstelle einer Zweitinfektion eine Immunisierung mit Ovalbumin gewählt, um zu überprüfen, wie sich dieIDO-Aktivität auf die primäre Antikörperproduktion von B-Zellen auswirkt. Hierfür wurden Mäuse am Tag 2 nach der CLP immunisiert und nach 8 weiteren Tagen deren Antigen-spezifische Antikörperproduktion im Serum quantifiziert (Abbildung 12). Die Immunisierung am Tag 2 nach einer CLP führte zu einer stark reduzierten spezifischen Antikörperproduktion während die unspezifischen Antikörper anstiegen (Grießl und Mohr, Manuskript in Vorbereitung). Diese Reduktion ist auf beide untersuchte Subklassen, IgG1 und IgG2a, der Immunglobuline zurückzuführen.

Für eine effiziente B-Zellaktivierung bedarf es neben der Erkennung des Antigens einer zusätzlichen Aktivierung durch T-Helferzellen. Möglicherweise ist dies nach der Abnahme der essentiellen Aminosäure Tryptophan nicht adäquat gegeben. Daher wurde dieser Immunisierungsversuch während der Immunparalyse unter der spezifischenIDO-Hemmung durch Gabe von 1-Methyltryptophan im Trinkwasser durchgeführt. Diese spezifischeIDO-Blockade zeigte eine Möglichkeit auf, die spezifische Antikörperproduktion während der Immunparalyse, wie sie am Tag 2 nach einer CLP vorliegt, zu verbessern (Abbildung 12).

Diese Verbesserung betrifft sowohl die Produktion von IgG1, den Immunglobulinen typisch für eine Th2-Antwort, als auch der Bildung des Immunglobulinsubtyps IgG2a, welches typisch ist für eine Th1-Antwort. Es fällt auf, dass eine Verschiebung auf eine Th2-Antwort, gezeigt durch die bessere IgG1-Antwort, stattfindet. Da aber beide Ig-Subtypen durch die Behandlung von 1MT während des Experimentes die spezifische Ig-Produktion anheben, kann man davon ausgehen, dass es zum untersuchten Zeitpunkt noch zu einer Überlappung beider Th-Anworten kommt.

In Abbildung 22 wurde gezeigt, dass die MIF-Verabreichung während der Immunparalyse schon innerhalb von 6 Stunden zu einer höheren Tryptophankonzentration im Serum der Tiere führt. Dieser Effekt von MIF auf den Tryptophanspiegel sollte weiter untersucht werden, um festzustellen, ob MIF gezielt für eine Verbesserung einer spezifischen Immunabwehr zum Zeitpunkt der Immunsuppression eingesetzt werden kann.

Die Funktion von T- und B-Zellen wird auch durch eine hohe IL-10-Produktion gehemmt (Cua, Groux et al. 1999). Somit könnte die Behandlung von Mäusen während der Immunparalyse mit MIF auch auf der Reduzierung von IL-10 liegen. Die Produktion von IL-10 während der Immunparalyse wurde in der vorliegenden Arbeit ausführlich durch differentielle Restimulierung der Milzzellen aus Mäusen an verschiedenen Tagen nach einer CLP untersucht (Abbildung 9). Zwar kann die IL-10-Produktion von T-Zellen aus naiven Mäusen gut induziert werden, jedoch nimmt die IL-10-Produktion in den Tagen nach einer CLP kontinuierlich ab. Somit scheint die IL-10-Produktion durch T-Zellen am 2. Tag nicht für die Immunparalyse von Bedeutung zu sein, wobei jedoch nicht auszuschließen ist, dass diese Zellen im späteren Erkrankungsverlauf nicht auch IL-10 produzieren können. Im Gegensatz zu den T-Zellen lassen sich die Makrophagen und DC am 2. Tag nach der CLP gut zur IL-10-Produktion mit den bakteriellen Komponenten LPS und CpG stimulieren. Dieses Ergebnis würde die Hypothese unterstützen, dass die am 2. Tag nach der CLP auftretende Mortalität in einer bakteriellen Sekundärinfektion auf kompensatorische antiinflammatorische Mechanismen zurückgeführt werden kann. Dafür

würden auch die hohen Corticosteronwerte im Serum zu diesem Zeitpunkt nach der CLP sprechen (Abbildung 21). Allerdings sind die Corticosteronspiegel in den Seren der Mäuse, die in der Immunparalyse mit MIF behandelt wurden, identisch mit den Spiegeln jener Kontrolltiere, die in der Immunparalyse nur PBS erhielten. Dabei spielte es keine Rolle, ob das Corticosteron 6 Stunden nach der MIF-Verabreichung oder erst nach einer darauf folgenden LPS-Behandlung bestimmt wurde (Abbildung 21). In dieser Arbeit konnte die MIF-bedingte Corticosteron-Induktion, die zuvor beobachtet worden war (Pollak 2006), nicht gezeigt werden. Eine Glucocorticoidbehandlung reduziert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, führt aber zu einer gesteigerten IL-10-Produktion (van der Poll, Barber et al. 1996). Diese antiinflammatorische Wirkung ähnelt den in dieser Arbeit gezeigten Effekten einer MIF-Behandlung von Mäusen in der Immunparalyse. MIF führte in unserem Mausmodell zur Reduktion von TNF, IL-6 und IL-12 jedoch hatten die Mäuse nach der Sekundärinfektion einen reduzierten IL-10-Spiegel (Abbildung 19). Dieser regulierende Effekt auf IL-10-Werte ist lang anhaltend und konnte auch noch eine Woche nach der *S. tm*-Zweitbelastung gemessen werden (nicht gezeigte eigene Daten). Die IL-10-Reduktion ist ein weiterer Parameter, der durch die Behandlung von immunparalysierten Mäusen mit MIF verändert ist. Er könnte als ein therapeutischer Effekt von MIF in der sepsisinduzierten Immunparalyse interpretiert werden.

In einem andern Sepsismodell an Mäusen wurde gezeigt, dass ein zur Sepsis führendes Trauma durch Verbrennungen eine Erhöhung von IL-10 mit sich bringt. Auch dieses Modell führte nach einer Zweitbelastung der Tiere, gezeigt durch eine anschließende CLP, zu einer Immunparalyse. Die Immunparalyse dieser Mäuse brachte eine eindeutig reduzierte Mortalitätsrate mit sich, wenn Antikörper gegen IL-10 verabreicht wurden (Lyons, Kelly et al. 1997).

Anscheinend hat IL-10 in der Sepsis eine andere, nicht zur Genesung beitragende Funktion. Interessanterweise sind Mäuse die kein IL-10 produzieren vor dem Endotoxin-verursachten Schock geschützt (Berg, Kuhn et al. 1995; Berg, Leach et al. 1995). Offensichtlich gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem anfänglich erhöhten IL-10-Spiegel bei Sepsispatienten und den darauf folgenden schweren Komplikationen, wie beispielsweise dem Multiorganversagen. Diese Korrelation findet man sowohl in der Klinik als auch im Mausmodell nach der CLP (Neidhardt, Keel et al. 1997; Plitas, Burt et al. 2008). Die Produktion von IL-10 kann somit als Marker für den Schweregrad einer vorliegenden Sepsis herangezogen werden.

Unsere Daten unterstützen die Korrelation hoher IL-10-Werte mit der Mortalitätsrate in der Sepsis. Die Vorbehandlung mit MIF führte zu niedrigeren IL-10-Werten und verbesserte die Überlebenschancen der Mäuse bei der Sekundärinfektion (Abbildung 19, Abbildung 3).

Die IL-10-Reduktion durch MIF-Behandlung kann als Erklärung der induzierten gefundenen Keimeliminierung nach MIF während der Sekundärinfektion in immunparalytischen Mäusen herangezogen werden (Abbildung 15). Von IL-10 ist bekannt, dass es zytotoxische NK-Zellen stimuliert (Mocellin, Panelli *et al.* 2003). Dies wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. MIF-Behandlung könnte also zu weniger zytotoxischen NK-Zellen führen. Wenn dem so wäre, würde das bedeuten, dass die antigenpräsentierenden Zellen auch über weniger anfallende bakterielle Bestandteile aktiviert würden. Weniger Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen bedeutet eine geringere proinflammatorische Zytokin-Produktion dieser Zellen. Die reduzierte Produktion von TNF und IL-12, aber nicht von IL-6, wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen durch die Behandlung der Mäuse nach der CLP mit MIF für Makrophagen und DC gezeigt (Abbildung 17, Abbildung 24, Abbildung 26, Abbildung 31, Abbildung 33, Abbildung 25, Abbildung 32).

Die Produktion von inflammatorischen Zytokinen, aber auch von IL-10, ließ sich in der vorliegenden Arbeit durch MIF regulieren. Ein weiterer Regulationsmechanismus für die Zytokinproduktion ist, neben einer Induktion der Glucocorticoidspiegel, die Regulierung von zur Zytokinexpression notwendigen Signalkaskaden. Exemplarisch wurde die Expression von DUSP1 in der Immunparalyse gemessen. DUSP1 ist eine durch glucocorticoidinduzierte Phosphatase, die den aktivierten p38-MAPK-Signalweg durch Abspaltung der für die Aktivität wichtigen Phosphatreste katalysiert (Kassel, Sancono *et al.* 2001; Lasa, Abraham *et al.* 2002; Engelbrecht, de Wet *et al.* 2003). Studien zeigten, dass die Stimulierung mit MIF die Phosphatase DUSP1 hemmt und somit den Weg für eine erneute Aktivierung dieses Signalweges freimacht (Roger, Chanson *et al.* 2005). Dieser Effekt wurde auch mit MIF-defizienten Zellen in Gegenwart von Dexamethason gezeigt (Aeberli, Yang *et al.* 2006). Da Corticosteronlevel am Tag 2 nach der CLP erhöht sind, ist die DUSP1-Induktion ein möglicher Wirkmechanismus der MIF-Behandlung von Mäusen in der Immunparalyse. In dieser Arbeit ergab die der Expression von DUSP1 nach CLP, dass schon innerhalb weniger Stunden die DUSP1-mRNA hochreguliert war. Am Tag 2 nach einer CLP, dem Tag der erhöhten Empfindlichkeit für Zweitinfektionen, hat das Enzym seine Ausgangsexpression wieder erreicht. In den darauf folgenden Tagen steigt die Expression von DUSP1 wieder an.

Dieser biphasische Verlauf nach CLP zeigt sich übrigens auch in der IL-10-Produktion nach LPS-Stimulierung und in der Aktivität vonIDO. Die frühe Expression nach CLP geht einher mit der für diesen Zeitpunkt hohen Zytokinproduktion nach einer CLP (Sterns 2005). Der zweite Expressionsanstieg, der nach 2 Tagen eintritt, könnte ein Indiz für die Entzündungsbereitschaft nach der CLP sein (Abbildung 10).

Aus diesem Grund wurde DUSP1-Expression in naiven und CLP-Mäusen überprüft, die am 2. Tag nach der Operation MIF bzw. PBS erhalten hatten. Induziert werden sollte die DUSP1-Expression über eine Zweitbelastung mit LPS. Nach der LPS-Injektion, die zur Vereinfachung anstelle einer Zweitinfektion gewählt wurde, waren keine Unterschiede in diesen Mausgruppen zum untersuchten Zeitpunkt zu verzeichnen (Abbildung 20). Das Experiment gibt somit keine Auskunft über die Veränderung des DUSP1-Expressionslevels nach MIF.

Es wurden in dieser Arbeit mehrere Parameter aufgezeigt, die als Erklärung für die schützende Wirkung von MIF für die Folgen einer bakteriellen Sekundärinfektion herangezogen werden können. Dabei kristallisierte sich vor allem die antiinflammatorische Wirkung durch die MIF-Behandlung von immunparalytischen Mäusen heraus. Die generierten Daten führen zu der Überlegung, ob hohe MIF-Expressionen in entzündlichen Erkrankungen wie der Sepsis weniger als Ursache, sondern je nach Krankheit, auch als ein Kompensationsmechanismus einer nicht mehr kontrollierbaren Über-Entzündung zu interpretieren wären. Interessanterweise lassen sich Parallelen zu anderen untersuchten immunsuppressiven Mechanismen ziehen.

Neben MIF (Armstrong, Gantier *et al.* 2008; Hamatake, Yoshino *et al.* 2008; He, Chen *et al.* 2009) ist auch die Aktivität vonIDO in Tumoren erhöht (Hou, Muller *et al.* 2007; Banerjee, Duhadaway *et al.* 2008). Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass regulatorische T-Zellen durch die MIF-Behandlung zunehmen (Abbildung 35). Die Ergebnisse der Tumorforschung zeigte die tumorbedingte Erhöhung von regulatorischen T-Zellen (Hinz, Pagerols-Raluy *et al.* 2007; Li, Li *et al.* 2007; Chen, Subleski *et al.* 2008; Clark, Huang *et al.* 2008).

Auch im immunsupprimierten Zustand einer Schwangerschaft wird MIF von Zellen der Plazenta produziert (Arcuri, Cintorino *et al.* 1999; Hristoskova, Holzgreve *et al.* 2006). Dies ist eine weitere Gemeinsamkeit zu IDO. Über die IDO-Aktivität wird eine Abstoßung des Fötus durch das maternale Immunsystem unterdrückt (Munn, Zhou *et al.* 1998; Suzuki, Tone *et al.* 2001; Uyttenhove, Pilotte *et al.* 2003). Dafür werden auch regulatorische T-Zellen in einer Schwangerschaft verantwortlich gemacht (Thuere, Zenclussen *et al.* 2007).

Häufig findet man Studien, die hohe MIF-Produktion in Krankheiten nachweisen ((Bozza, Gomes *et al.* 2004; Xia, Lam *et al.* 2004; Becker, Willeke *et al.* 2008; Camlica, Duranyildiz *et al.* 2008; Kim, Kwok *et al.* 2008; Bruchfeld, Carrero *et al.* 2009). Es gibt nur wenige Daten, die das Fehlen von MIF im Zusammenhang mit der Schwere eines Krankheitsverlaufes zeigen. In einer HIV-Studie konnte die Korrelation einer niedrigen MIF-Produktion mit erhöhter Mortalitätsrate festgestellt werden (Kibiki, van der Ven *et al.* 2007).

Wahrscheinlich muss differenziert werden, in welcher Phase MIF nützlich oder auch schädlich wirkt. Dafür muss das vorliegende Krankheitsbild auf zellulärer und molekularer Ebene verstanden werden. Dies zeigt sich auch durch die ambivalente Wirkung von MIF in der Sepsis. Die MIF-Neutralisierung zum Zeitpunkt einer subletalen CLP reduziert die Mortalität der Mäuse nach einer letalen CLP (Pollak, Sterns et al. 2005). Die Applikation MIF zum Zeitpunkt einer solchen CLP erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die Tiere an den Folgen der CLP zu sterben (Pollak, Sterns et al. 2005). Hier wirkt MIF als entzündungsfördernder Kostimulus. Wie in dieser Arbeit gezeigt, schützt die MIF-Behandlung in der sepsisinduzierten Immunparalyse jedoch schon nach wenigen Stunden vor den Folgen einer bakteriellen Sekundärinfektion, indem es als Hemmer einer erneuten Entzündungsreaktion wirkt.

MIF ist im Entzündungsverlauf früh nachweisbar (Calandra, Echtenacher *et al.* 2000; Pollak, Sterns *et al.* 2005) und scheint in unserem Modell bei Verabreichung 2 Tage nach der CLP als ein wesentlicher Faktor für die Gegenregulation von TNF zu agieren. Die Hypothese, dass TNF MIF induziert, wurde von aktuellen Studien belegt. Diese zeigen, dass eine Anti-TNF-Therapie bei Patienten, die an einer schweren Form der Rheumatoiden Arthritis litten, durch die TNF-abfangende Therapie auch den MIF-Spiegel dieser Patienten senken konnte (Wijbrandts, van Leuven *et al.* 2008).

Die MIF-induzierte TNF-Aufnahme in der vorliegenden Arbeit hat eine weitreichende Wirkung. So änderten sich nach der MIF-Behandlung der Mäuse in der Immunparalyse viele immunologische Parameter: die Expression von IL-12 und IL-10 nahm ab, es wurde weniger NO von Makrophagen produziert, Organschäden, bestimmt über AST und ALT, waren weniger ausgeprägt. Durch die TNF-Reduzierung wurde die Proliferation der T-Helferzellen aber auch die Generierung und Suppression von regulatorischen T-Zellen reguliert. Es ist davon auszugehen, dass es weitere für die Immunparalyse bedeutende Auswirkungen einer MIF-Behandlung gibt. Die weitere Erforschung der Effekte einer MIF-Verabreichung in der Immunparalyse tragen eventuell dazu bei, das Risiko an einer Sepsis zu versterben, zu reduzieren.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

-/-	defizient
°C	Grad Celsius
A	Adenin und Absorption
ad	auffüllen auf
ALT	Alanin-Transaminase
APC	Allophycocyanin o Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AST	Aspartat-Transaminase
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder Serum Albumin)
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CFSE	5,6-Carboxyfluorescein-succinimidylester
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i>
CpG	Cytosin-Guanosin Dinucleotid
Da	Dalton
DD	<i>death domain</i> (Todesdomäne)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleosid-triphosphat
DSS	<i>dextran sulfate sodium</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent-assay</i>
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead box</i> P3
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanin
GM-CSF	<i>granulocyte-/macrophage-colony stimulating factor</i>
h	human
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
i.p.	intraperitoneal
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KFU	koloniebildende Einheit
LB	<i>Luria Broth</i> , Bakterienmedium
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
m	aus der Maus oder milli (10 <sup>-3</sup> ) oder Meter
M	molar (mol/l)
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)

MDH	Malatdehydrogenase
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	nano ( $10^{-9}$ ) oder Anzahl
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NF-κB	<i>nuclear factor</i> κB (Nukleärer Faktor κB)
NO	Nitrit
OD	optische Dichte
P.a.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	<i>phosphate buffered salt solution</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
Per-CP	Peridinin Chlorophyll-a Protein
r	rekombinant
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
s	<i>soluble</i> (löslich)
<i>S. tm</i>	<i>Salmonella thypimurium</i>
s.c.	subcutan
sTNF	lösliches TNF
T	Thymidin
TACE	<i>TNF-alpha converting enzyme</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
tg	transgen
Th	T-Helfer-Zeller
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (1 internationale Einheit)
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
wt	Wildtyp
α	Antikörper gegen
μ	mikro ( $10^{-6}$ )

## 7. Literaturverzeichnis

- Abbas, A. und A. Lichtman (2005). "Cellular and Molecular Immunology." Elsevier Saunders.
- Abe, R., T. Peng, et al. (2001). "Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor." J Immunol **166**(2): 747-53.
- Aeberli, D., Y. Yang, et al. (2006). "Endogenous macrophage migration inhibitory factor modulates glucocorticoid sensitivity in macrophages via effects on MAP kinase phosphatase-1 and p38 MAP kinase." FEBS Lett **580**(3): 974-81.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Arcuri, F., M. Cintorino, et al. (1999). "Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first-trimester human trophoblasts." Biol Reprod **60**(6): 1299-303.
- Arisawa, T., T. Tahara, et al. (2007). "Functional polymorphisms in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor and chronic gastritis." Int J Mol Med **20**(4): 539-44.
- Armstrong, M. E., M. Gantier, et al. (2008). "Small interfering RNAs induce macrophage migration inhibitory factor production and proliferation in breast cancer cells via a double-stranded RNA-dependent protein kinase-dependent mechanism." J Immunol **180**(11): 7125-33.
- Astal, Z. (2004). "Susceptibility patterns in *Pseudomonas aeruginosa* causing nosocomial infections." J Chemother **16**(3): 264-8.
- Banerjee, T., J. B. Duhadaway, et al. (2008). "A key in vivo antitumor mechanism of action of natural product-based brassinins is inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase." Oncogene **27**(20): 2851-7.
- Becker, H., P. Willeke, et al. (2008). "Macrophage migration inhibitory factor may contribute to vasculopathy in systemic sclerosis." Clin Rheumatol **27**(10): 1307-11.
- Berg, D. J., R. Kuhn, et al. (1995). "Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance." J Clin Invest **96**(5): 2339-47.
- Berg, D. J., M. W. Leach, et al. (1995). "Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses." J Exp Med **182**(1): 99-108.
- Bernhagen, J., T. Calandra, et al. (1994). "The emerging role of MIF in septic shock and infection." Biotherapy **8**(2): 123-7.
- Bernhagen, J., T. Calandra, et al. (1994). "Macrophage migration inhibitory factor is a neuroendocrine mediator of endotoxaemia." Trends Microbiol **2**(6): 198-201.
- Bernhagen, J., T. Calandra, et al. (1993). "MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia." Nature **365**(6448): 756-9.

- Bloom BR, B. B. (1966). "Mechanism of a reaction *in vitro* associated with delayed-type hypersensitivity." Science **67**: 80-82.
- Bopp, T., C. Becker, et al. (2007). "Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression." J Exp Med **204**(6): 1303-10.
- Bozza, F. A., R. N. Gomes, et al. (2004). "Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis." Shock **22**(4): 309-13.
- Bozza, M., A. R. Satoskar, et al. (1999). "Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis." J Exp Med **189**(2): 341-6.
- Bradley, J. R. (2008). "TNF-mediated inflammatory disease." J Pathol **214**(2): 149-60.
- Bruchfeld, A., J. J. Carrero, et al. (2009). "Elevated serum macrophage migration inhibitory factor (MIF) concentrations in chronic kidney disease (CKD) are associated with markers of oxidative stress and endothelial activation." Mol Med **15**(3-4): 70-5.
- Bruhn, A., C. Verdant, et al. (2006). "Effects of dexamethasone on macrophage migration inhibitory factor production in sepsis." Shock **26**(2): 169-73.
- Calandra, T. und R. Bucala (1997). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system." Crit Rev Immunol **17**(1): 77-88.
- Calandra, T., B. Echtenacher, et al. (2000). "Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor." Nat Med **6**(2): 164-70.
- Camlica, H., D. Duranyildiz, et al. (2008). "The diagnostic value of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer." Pathol Oncol Res **14**(1): 79-83.
- Chen, X., M. Baumel, et al. (2007). "Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells." J Immunol **179**(1): 154-61.
- Chen, X., J. J. Subleski, et al. (2008). "Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells." J Immunol **180**(10): 6467-71.
- Chi, H., S. P. Barry, et al. (2006). "Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(7): 2274-9.
- Clark, R. A., S. J. Huang, et al. (2008). "Human squamous cell carcinomas evade the immune response by down-regulation of vascular E-selectin and recruitment of regulatory T cells." J Exp Med **205**(10): 2221-34.
- Cua, D. J., H. Groux, et al. (1999). "Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **189**(6): 1005-10.
- Cvetkovic, I., Stosic-Grujicic (2006). "Neutralization of macrophage migration inhibitory factor-novel approach for the treatment of immunoinflammatory disorders." Int Immunopharmacol **6**: 1527-1534.
- Daun, J. M. und J. G. Cannon (2000). "Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I $\kappa$ B $\alpha$ ." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **279**(3): R1043-9.

- David, J. (1966). "Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction." Proc Natl Acad Sci U S A **56**: 72-77.
- de Jong, Y. P., A. C. Abadia-Molina, et al. (2001). "Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF." Nat Immunol **2**(11): 1061-6.
- Echtenacher, B., M. A. Freudenberg, et al. (2001). "Differences in innate defense mechanisms in endotoxemia and polymicrobial septic peritonitis." Infect Immun **69**(12): 7271-6.
- Echtenacher, B., R. Urbaschek, et al. (2003). "Treatment of experimental sepsis-induced immunoparalysis with TNF." Immunobiology **208**(4): 381-9.
- Engelbrecht, Y., H. de Wet, et al. (2003). "Glucocorticoids induce rapid up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and impair proliferation in human and mouse osteoblast cell lines." Endocrinology **144**(2): 412-22.
- Erickson, S. L., F. J. de Sauvage, et al. (1994). "Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice." Nature **372**(6506): 560-3.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2002). "T cell apoptosis by tryptophan catabolism." Cell Death Differ **9**(10): 1069-77.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2003). "T cell apoptosis by kynurenines." Adv Exp Med Biol **527**: 183-90.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2006). "The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells." J Immunol **176**(11): 6752-61.
- Fallarino, F., C. Vacca, et al. (2002). "Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells." Int Immunol **14**(1): 65-8.
- Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, et al. (1991). "IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages." J Immunol **147**(11): 3815-22.
- Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, et al. (1991). "IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells." J Immunol **146**(10): 3444-51.
- Flierl, M. A., D. Rittirsch, et al. (2008). "Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis." Faseb J **22**(7): 2198-205.
- Gray, G. A., G. Julou-Schaeffer, et al. (1990). "An L-arginine-derived factor mediates endotoxin-induced vascular hyposensitivity to calcium." Eur J Pharmacol **191**(1): 89-92.
- Grell, M., F. M. Becke, et al. (1998). "TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1." Eur J Immunol **28**(1): 257-63.
- Grell, M., H. Wajant, et al. (1998). "The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 570-5.
- Grohmann, U., F. Fallarino, et al. (2003). "Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO." Trends Immunol **24**(5): 242-8.

- Hamatake, M., I. Yoshino, et al. (2008). "Intratumoral expression of macrophage migration inhibitory factor is correlated with serum C-reactive protein and interleukin-6 in patients with non-small cell lung cancer." Surg Today **38**(10): 921-5.
- Hammer, M., J. Mages, et al. (2006). "Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock." J Exp Med **203**(1): 15-20.
- Hassanain, H. H., S. Y. Chon, et al. (1993). "Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor." J Biol Chem **268**(7): 5077-84.
- Hauser, B., H. Bracht, et al. (2005). "Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies." Anesth Analg **101**(2): 488-98.
- He, X. X., K. Chen, et al. (2009). "Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer." Mol Med **15**(1-2): 1-10.
- Hehlgans, T. und D. N. Männel (2002). "The TNF-TNF receptor system." Biol Chem **383**(10): 1581-5.
- Hinz, S., L. Pagerols-Raluy, et al. (2007). "Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer." Cancer Res **67**(17): 8344-50.
- Holstad, M., L. Jansson, et al. (1997). "Inhibition of nitric oxide formation by aminoguanidine: an attempt to prevent insulin-dependent diabetes mellitus." Gen Pharmacol **29**(5): 697-700.
- Honma, N., H. Koseki, et al. (2000). "Deficiency of the macrophage migration inhibitory factor gene has no significant effect on endotoxaemia." Immunology **100**(1): 84-90.
- Hotchkiss, R. S., P. E. Swanson, et al. (1997). "Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice." Crit Care Med **25**(8): 1298-307.
- Hou, D. Y., A. J. Muller, et al. (2007). "Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses." Cancer Res **67**(2): 792-801.
- Hristoskova, S., W. Holzgreve, et al. (2006). "Macrophage migration inhibition factor is elevated in pregnancy, but not to a greater extent in preeclampsia." Arch Gynecol Obstet **274**(1): 25-8.
- Hubert, P., N. Jacobs, et al. (2007). "The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil?" J Leukoc Biol **82**(4): 781-94.
- Ichiyama, H., S. Onodera, et al. (2004). "Inhibition of joint inflammation and destruction induced by anti-type II collagen antibody/lipopolysaccharide (LPS)-induced arthritis in mice due to deletion of macrophage migration inhibitory factor (MIF)." Cytokine **26**(5): 187-94.
- Kassel, O., A. Sancono, et al. (2001). "Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1." Embo J **20**(24): 7108-16.

- Kibiki, G. S., A. J. van der Ven, et al. (2007). "Serum and BAL macrophage migration inhibitory factor levels in HIV infected Tanzanians with pulmonary tuberculosis or other lung diseases." Clin Immunol **123**(1): 60-5.
- Kim, J. Y., S. K. Kwok, et al. (2008). "Up-regulated macrophage migration inhibitory factor protects apoptosis of dermal fibroblasts in patients with systemic sclerosis." Clin Exp Immunol **152**(2): 328-35.
- Kleemann, R., M. Grell, et al. (2002). "Receptor binding and cellular uptake studies of macrophage migration inhibitory factor (MIF): use of biologically active labeled MIF derivatives." J Interferon Cytokine Res **22**(3): 351-63.
- Koebernick, H., L. Grode, et al. (2002). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against Salmonella typhimurium." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13681-6.
- Kudrin, A. und D. Ray (2008). "Cunning factor: macrophage migration inhibitory factor as a redox-regulated target." Immunol Cell Biol **86**(3): 232-8.
- Kudrin, A., M. Scott, et al. (2006). "Human macrophage migration inhibitory factor: a proven immunomodulatory cytokine?" J Biol Chem **281**(40): 29641-51.
- Kyriakis, J. M. und J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev **81**(2): 807-69.
- Lan, H. Y., W. Mu, et al. (1996). "De Novo renal expression of macrophage migration inhibitory factor during the development of rat crescentic glomerulonephritis." Am J Pathol **149**(4): 1119-27.
- Lasa, M., S. M. Abraham, et al. (2002). "Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38." Mol Cell Biol **22**(22): 7802-11.
- Leech, M., C. Metz, et al. (1999). "Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids." Arthritis Rheum **42**(8): 1601-8.
- Leng, L., C. N. Metz, et al. (2003). "MIF signal transduction initiated by binding to CD74." J Exp Med **197**(11): 1467-76.
- Lewis, M., L. A. Tartaglia, et al. (1991). "Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(7): 2830-4.
- Li, L., S. P. Li, et al. (2007). "Hepatoma cells inhibit the differentiation and maturation of dendritic cells and increase the production of regulatory T cells." Immunol Lett **114**(1): 38-45.
- Lin, H. L., S. Y. Wang, et al. (2008). "Exercise behavior in asthmatic children: effects of a summer camp fitness program in Taiwan." Kaohsiung J Med Sci **24**(6): 297-305.
- Lin, Y. L., C. C. Shieh, et al. (2008). "The functional insufficiency of human CD4+CD25 high T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF-alpha modulation." Allergy **63**(1): 67-74.

- Liu, S. F., I. M. Adcock, et al. (1996). "Differential regulation of the constitutive and inducible nitric oxide synthase mRNA by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat." Crit Care Med **24**(7): 1219-25.
- Lue, H., A. Kapurniotu, et al. (2006). "Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity." Cell Signal **18**(5): 688-703.
- Lue, H., M. Thiele, et al. (2007). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity." Oncogene **26**(35): 5046-59.
- Lyons, A., J. L. Kelly, et al. (1997). "Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection." Ann Surg **226**(4): 450-8; discussion 458-60.
- Makita, H., M. Nishimura, et al. (1998). "Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation." Am J Respir Crit Care Med **158**(2): 573-9.
- Männel, D. N. und B. Echtenacher (2000). "TNF in the inflammatory response." Chem Immunol **74**: 141-61.
- Männel, D. N., R. N. Moore, et al. (1980). "Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor)." Infect Immun **30**(2): 523-30.
- Mellor, A. L., D. Munn, et al. (2003). "Tryptophan catabolism and T cell responses." Adv Exp Med Biol **527**: 27-35.
- Mellor, A. L. und D. H. Munn (2000). "Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression." Annu Rev Immunol **18**: 367-91.
- Mellor, A. L. und D. H. Munn (2003). "Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity." J Immunol **170**(12): 5809-13.
- Mellor, A. L. und D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." Nat Rev Immunol **4**(10): 762-74.
- Miller, A. C., R. M. Rashid, et al. (2007). "The "T" in trauma: the helper T-cell response and the role of immunomodulation in trauma and burn patients." J Trauma **63**(6): 1407-17.
- Mocellin, S., M. C. Panelli, et al. (2003). "The dual role of IL-10." Trends Immunol **24**(1): 36-43.
- Munn, D. H., M. Zhou, et al. (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." Science **281**(5380): 1191-3.
- Nathan, C. und Q. W. Xie (1994). "Regulation of biosynthesis of nitric oxide." J Biol Chem **269**(19): 13725-8.
- Neidhardt, R., M. Keel, et al. (1997). "Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients." J Trauma **42**(5): 863-70; discussion 870-1.
- Nguyen, M. T., H. Lue, et al. (2003). "The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis." J Immunol **170**(6): 3337-47.

- Ohkawara, T., H. Takeda, et al. (2005). "Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice." Clin Exp Immunol **141**(3): 412-21.
- Ono, S., C. Ueno, et al. (2003). "Interleukin-12 and -18 induce severe liver injury in mice recovered from peritonitis after sublethal endotoxin challenge." Surgery **134**(1): 92-100.
- Onodera, S., K. Suzuki, et al. (1997). "Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion." Immunology **92**(1): 131-7.
- Osuchowski, M. F., K. Welch, et al. (2006). "Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality." J Immunol **177**(3): 1967-74.
- Pasare, C. und R. Medzhitov (2003). "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells." Science **299**(5609): 1033-6.
- Pene, F., B. Zuber, et al. (2008). "Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction." J Immunol **181**(12): 8513-20.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Plitas, G., B. M. Burt, et al. (2008). "Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis." J Exp Med **205**(6): 1277-83.
- Pollak, N. (2006). "Die Rolle von MIF (macrophage migration inhibitory factor) in der Sepsis-induzierten Immunparalyse." Dissertation.
- Pollak, N., T. Sterns, et al. (2005). "Improved resistance to bacterial superinfection in mice by treatment with macrophage migration inhibitory factor." Infect Immun **73**(10): 6488-92.
- Rittirsch, D., M. A. Flierl, et al. (2008). "Harmful molecular mechanisms in sepsis." Nat Rev Immunol **8**(10): 776-87.
- Roger, T., A. L. Chanson, et al. (2005). "Macrophage migration inhibitory factor promotes innate immune responses by suppressing glucocorticoid-induced expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1." Eur J Immunol **35**(12): 3405-13.
- Roger, T., J. David, et al. (2001). "MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4." Nature **414**(6866): 920-4.
- Rosselet, A., F. Feihl, et al. (1998). "Selective iNOS inhibition is superior to norepinephrine in the treatment of rat endotoxic shock." Am J Respir Crit Care Med **157**(1): 162-70.
- Rossi, A. G., C. Haslett, et al. (1998). "Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma." J Clin Invest **101**(12): 2869-74.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-64.

- Sanchez-Nino, M. D., A. B. Sanz, et al. (2009). "The MIF receptor CD74 in diabetic podocyte injury." J Am Soc Nephrol **20**(2): 353-62.
- Schober, A., J. Bernhagen, et al. (2004). "Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice." Circulation **109**(3): 380-5.
- Seitz, C., D. N. Männel, et al. (1998). "Isolation and functional characterization of the mouse p75 TNF receptor promoter." Genomics **48**(1): 111-6.
- Shi, X., L. Leng, et al. (2006). "CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex." Immunity **25**(4): 595-606.
- Shimizu, T., R. Abe, et al. (1999). "High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis." Biochem Biophys Res Commun **264**(3): 751-8.
- Siegler, G., B. Meyer, et al. (2004). "Expression of tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 in nasopharyngeal carcinoma: possible upregulation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1." Int J Cancer **112**(2): 265-72.
- Silva, N. M., C. V. Rodrigues, et al. (2002). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1." Infect Immun **70**(2): 859-68.
- Sterns, T. (2005). "Serum-Zytokinspiegel und Empfindlichkeit für Super-Infektionen im Maus-Sepsismodell." Dissertation.
- Stojanovic, I., T. Cvjeticanin, et al. (2009). "Macrophage migration inhibitory factor stimulates interleukin-17 expression and production in lymph node cells." Immunology **126**(1): 74-83.
- Stumptner-Cuvelette, P. und P. Benaroch (2002). "Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function." Biochim Biophys Acta **1542**(1-3): 1-13.
- Suzuki, S., S. Tone, et al. (2001). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase in early concepti." Biochem J **355**(Pt 2): 425-9.
- Swope, M. D., H. W. Sun, et al. (1998). "Macrophage migration inhibitory factor interactions with glutathione and S-hexylglutathione." J Biol Chem **273**(24): 14877-84.
- Tanino, Y., H. Makita, et al. (2002). "Role of macrophage migration inhibitory factor in bleomycin-induced lung injury and fibrosis in mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(1): L156-62.
- Thuere, C., M. L. Zenclussen, et al. (2007). "Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy." Am J Reprod Immunol **58**(6): 514-23.
- Uyttenhove, C., L. Pilotte, et al. (2003). "Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase." Nat Med **9**(10): 1269-74.
- Valencia, X., G. Stephens, et al. (2006). "TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells." Blood **108**(1): 253-61.

- van der Poll, T., A. E. Barber, et al. (1996). "Hypercortisolemia increases plasma interleukin-10 concentrations during human endotoxemia--a clinical research center study." J Clin Endocrinol Metab **81**(10): 3604-6.
- Wijbrandts, C. A., S. I. van Leuven, et al. (2008). "Sustained changes in lipid profile and macrophage migration inhibitory factor (MIF) levels after anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis.
- Xia, H. H., S. K. Lam, et al. (2004). "Helicobacter pylori infection is associated with increased expression of macrophage migratory inhibitory factor--by epithelial cells, T cells, and macrophages--in gastric mucosa." J Infect Dis **190**(2): 293-302.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Daniela N. Männel für die Überlassung eines hochinteressanten Themas und der großzügigen Bereitstellung der Mittel bei der Durchführung der Arbeit, sowie für das entgegengebrachte Vertrauen. Die stete Diskussionsbereitschaft und die konstruktiven Lösungsvorschläge haben zu einer angenehmen produktiven Arbeitsatmosphäre verholfen.

Herrn Professor Dr. Ralph Witzgall möchte ich für die Bereitschaft zur fakultätsinternen Vertretung dieser Dissertation danken, die diese Promotion erst ermöglichte.

Meinen Kollegen danke ich herzlich für die gute Arbeitsatmosphäre. Eure Hilfsbereitschaft und fachliche Kompetenz haben in vielen konstruktiven aber auch unterhaltsamen Gesprächen wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Lisa danke ich für die tolle Teamarbeit

Arno Mohr danke ich für die tolle Zusammenarbeit zur Untersuchung der primären B-Zellantwort während der Immunparalyse.

Dr. Cornelia Kiank und Prof. Dr. Schütt danke ich für große Hilfe bei der Untersuchung der IDO-Aktivität.

Dr. Katja Dettmer und Herrn Professor Dr. Oeffner danke ich für die Tryptophanbestimmung in den Seren unserer Mäuse.

Professor Dr. Bernhagen und der Firma Novartis danke ich für die Bereitstellung von rekombinanten MIF.

Beatrice danke ich besonders herzlich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Thomas danke ich ganz besonders herzlich für die seelische und moralische Unterstützung.

Zu guter Letzt möchte ich mich in besonderem Maße herzlich bei meiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung Vieles nicht möglich gewesen wäre.

## Anhang

Manuskript das im Rahmen der Promotion entstanden ist:

05/2009 Arno Mohr\*, Sybille Grießl\*, Anja Kammler, Cornelia Kiank, Christine Schütt und Daniela N. Männel: **Enhanced non-specific and memory but reduced specific primary B cell response in sepsis.** Blood.  
(\*Erstautoren)

Poster:

09/2008 Posterpräsentation beim *Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI; DGfI)*, Wien:  
**„IDO contributes to suppressed primary B cell response in sepsis“**

04/2009 Posterpräsentation bei der *12th International TNF Conference*, Madrid:  
**„The dual role of TNF on T cell activation“**

sonstiges:

03/09 Teilnahme an der *5th Spring School on Immunology* der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Ettal

---

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

.....