

Serum-Zytokinspiegel und Empfindlichkeit für Super- Infektionen im Maus- Sepsismodell

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät IV
Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Theobald Sterns
aus Kronstadt
2005**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2002 bis September 2005 unter Anleitung von Frau Prof. Dr. D.N. Männel am Institut für Immunologie des Klinikums der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am:

29.08.2005

Die Arbeit wurde geleitet von

Prof. Dr. S. Elz

Prof. Dr. D.N. Männel

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. R. Seifert (Vorsitz)

Prof. Dr. S. Elz

Prof. Dr. D.N. Männel

Prof. Dr. J. Heilmann

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bakterielle Infektionen	1
1.2	Innate Immunity – Das angeborene Immunsystem	1
1.2.1	Humorale Komponenten	2
1.2.2	Zelluläre Komponenten	2
1.3	Immunmodulatoren, LPS, LTA und CpG	4
1.3.1	LPS Struktur, Vorkommen und Effekte	4
1.3.2	LPS-bindendes Protein LBP	5
1.3.3	Lipoteichonsäuren (LTA) Struktur, Vorkommen und Effekte	6
1.3.4	Bakterielle Deoxycytidylat-Phosphat-Deoxiguanylat (CpG)-DNA und synthetische immunstimulierende Oligodeoxynukleotide (isODN)	6
1.4	Zytokine	7
1.4.1	Zytokinrezeptoren	8
1.4.2	Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)	9
1.4.3	Die TNF-Rezeptoren	12
1.4.4	Interleukin-6	15
1.4.5	Interleukin-10	17
1.5	Sepsis, Sepsis-Modelle und LPS-Toleranz	18
1.5.1	Sepsis-Modelle	19
1.5.2	LPS-Toleranz	20
1.5.3	Septische Peritonitis	21
1.6	"Immunparalyse"	21
	Ziel der Arbeit	24
	Material und Methoden	
2	Material	25
2.1	Chemikalien und Reagenzien	25
2.2	Verbrauchsmaterial , Geräte und Software	26
2.3	ELISA-Kits	27
2.4	Antikörper	27

2.5	Oligodinukleotide	27
2.6	Puffer und Lösungen	27
2.7	Nährmedien und Nährböden	28
2.7.1	Zellkultur	28
2.7.2	Mikrobiologie	28
2.8	Zelllinien	28
2.9	Zytokine	28
2.10	Maus-Stämme	28
2.11	Bakterien	29
3	Methoden	30
3.1	Tierexperimentelle Methoden	30
3.1.1	Induktion einer experimentellen septischen Peritonitis mittels zökaler Ligatur und Punktion (CLP)	30
3.1.2	Induktion einer Primär- und Sekundärinfektion	31
3.1.3	Stimulierung zur Bestimmung der Induzierbarkeit der Zytokinproduktion	31
3.1.4	Serumgewinnung aus Mausblut	31
3.2	Zellbiologische Methoden	32
3.2.1	Zellkultur	32
3.2.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	32
3.2.3	Mycoplasmen-Test	33
3.2.4	Gewinnung und Kultur primärer Peritoneal- und Peritonealexsudatzellen (PEC)	33
3.2.5	Zellpräparationen und Färbungen	33
3.3	Immunologische Methoden	34
3.3.1	Allgemeine ELISA Methode	34
3.3.2	ELISA zur Quantifizierung von TNF, IL-6 und IL-10	35
3.3.3	TNF-Zytotoxizitäts-Assay	35
3.3.4	Phagozytose Assay	35
3.4	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	36

3.5	Mikrobiologische Methoden	37
3.5.1	<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i> ATCC 14028s (<i>S.tm.</i>)	37
3.5.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P.a. 103</i>) and ATCC 27853	37
3.5.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	38
3.5.4	Inaktivierung von Keimen	38
3.6	Fluoreszenzmikroskopie	39
3.6.1	Verwendete Filtersätze	39
3.6.2	Herstellung der Fixierlösung (Paraformaldehyd 4%)	39
3.7	Statistik	40
Ergebnisse		
4	Serum-Zytokinspiegel und Zytokin-Produktionsfähigkeit	41
4.1	Charakterisierung der CLP-Induzierten Immunsuppression anhand der Zytokinprofile	41
4.1.1	Kinetik der Serum-Zytokinspiegel nach CLP	41
4.1.2	Kinetik der LPS-induzierten Serum-Zytokinspiegel nach CLP	42
4.1.3	Generalisierte Zytokin-Produktionsfähigkeit	43
5	Etablieren des "Immunparalyse" Modells in C57BL/6 Mäusen	46
5.1	Etablieren des CLP Modells in C57BL/6 Mäusen	46
5.1.1	Letale und subletale CLP in C57BL/6 Mäusen	46
5.1.2	Vergleich der Zytokin-Produktionsfähigkeit in NMRI und C57BL/6 Mäusen	47
5.2	Bestimmung der LD50 für <i>Salmonella typhimurium</i> in C57BL/6 Mäusen	48
5.3	"Immunparalyse" in C57BL/6-Mäusen	49
6	CLP in gentechnisch modifizierten Tieren	51
6.1	Überleben von TNF-, TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen nach CLP	51
6.2	Zytokin-Produktionsfähigkeit nach CLP in TNF-, TNFR1- und TNFR2 defizienten Mäusen	51

6.3	Serum-Konzentrationen von LPS-bindendem Protein (LBP)	52
6.4	Primärinfektion mit <i>S.typhimurium</i>	53
6.5	Bakterielle Superinfektion nach CLP in TNF- und TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen	54
6.5.1	Sensitivität von TNF-defizienten Mäusen und dem entsprechenden Wildtyp für Superinfektion mit <i>S.typhimurium</i>	54
6.5.2	Sensitivität von Mäusen, die mit anti-TNF-Antikörper behandelt worden sind	55
6.5.3	Sensitivität von TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen für Superinfektion mit <i>S.typhimurium</i>	56
6.5.4	Sensitivität von TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen für Superinfektion mit <i>L.monozytogenes</i>	57
7	Peritonealzellen	59
7.1	Anzahl von Peritonealzellen zwei Tage nach CLP	59
7.2	Zusammensetzung der Peritonealzellen nach CLP	60
7.3	Phagozytoseaktivität von Peritonealzellen nach CLP	61
8	Induktion einer Immunsuppression durch Entzündungs-Stimuli	63
8.1	Bestimmung der Zytokin-Produktionsfähigkeit	63
8.1.1	Induktion reduzierter Zytokin-Produktionsfähigkeit durch Vorbehandlung mit Phenol-inaktivierten <i>S.typhimurium</i>	63
8.1.2	Induktion reduzierte Zytokin-Produktionsfähigkeit durch Vorbehandlung mit rhTNF	64
8.2	Zusammenhang von reduzierter Zytokin-Produktionsfähigkeit und Empfindlichkeit für Superinfektionen	65
9	CLP und Schutz vor schockähnlichen Zuständen	67
9.1	LPS-induzierter Schock nach CLP	67
9.2	Schutz vor durch hoch dosiertes LPS oder D-GalN/LPS induziertem Schock	68
9.3	Schutz vor Schock der durch tote Bakterien induziert wurde	69

9.4	Schutz vor Schock der durch lebende Bakterien induziert wurde	70
10	Diskussion	72
10.1	Zytokinprofile und Zytokin-Produktionsfähigkeit	72
10.2	Die "Immunparalyse" in C57BL/6 Mäusen	75
10.3	Die "Immunparalyse" in gentechnisch modifizierten Tieren	78
10.3.1	Zytokine und Serumproteine	78
10.3.2	Infektion und Superinfektion mit <i>S.typhimurium</i>	79
10.4	Mögliche Faktoren und Ursachen der "Immunparalyse" und ihr Ausbleiben in TNF- und TNFR1-defizienten Tieren	82
10.4.1	Die Rolle der Peritonealexudatzellen (PEC)	82
10.4.2	Die bakterielle Komponente	83
10.4.3	TNF im Kontext der "Immunparalyse"	84
10.5	Protektive Effekte nach CLP	85
	Zusammenfassung	88
11	Literaturverzeichnis	90
12	Danksagung	108
13	Anhang	109

1 Einleitung

1.1 Bakterielle Infektionen

Die Auseinandersetzung von höher entwickelten Lebewesen wie Pflanzen, Tieren und Menschen, mit einfacheren Lebensformen wie Viren, Bakterien, Protozoen und Pilzen, die versuchen auf oder in diesen eine Grundlage für das Fortkommen der eigenen Art zu schaffen, hat auf beiden Seiten zur Entwicklung von komplexen Strategien und Gegenstrategien geführt. Bei den Säugetieren ist dabei im Laufe der Evolution ein Immunsystem entstanden, das in der Lage ist, ein immenses Repertoire an Verteidigungsmechanismen gegen Erreger verschiedenster Art anzubieten. Die Mikroorganismen wiederum haben Mechanismen entwickelt die Verteidigungslinien zu umgehen oder zu durchbrechen.

Infektionen mit bakteriellen Erregern gehören zu den häufigen Ereignissen, bei denen ein gut funktionierendes Verteidigungssystem gefordert ist. Hierbei kann man eine grobe Einteilung der Erreger in zwei Klassen vornehmen. Diese Einteilung beruht auf der Anfärbbarkeit bestimmter Zellwandbestandteile der jeweiligen Erreger und führt so zu einer Differenzierung in Gram-positive und Gram-negative Bakterien. Einige dieser Zellwandbestandteile sind sehr potente Aktivatoren des Immunsystems und können den Wirtsorganismus in die Lage versetzen, auf den Erreger zu reagieren und diesen an der weiteren Ausbreitung und Vermehrung zu hindern und ihn, möglichst, zu eliminieren.

Die primäre Reaktion eines Wirtes auf eine Infektion wird von den diversen Komponenten des angeborenen Immunsystems kontrolliert und in der Folge von den wesentlich spezifischeren Komponenten der adaptiven Immunantwort weitergeführt.

1.2 Innate Immunity – Das angeborene Immunsystem

Unter dem Begriff angeborenes Immunsystem versteht man die genetisch determinierte Gesamtheit aller Maßnahmen, die einem Organismus zur primären Abwehr eindringender Pathogene von Geburt an zur Verfügung steht. Die angeborene Immunität beruht im Wesentlichen auf drei Säulen. Die intakten epidermalen, dermalen und mucosalen Barrieren im Sinne einer geschlossenen Abgrenzung zur Umwelt und darauf

befindliche, antimikrobiell wirksame Proteine und kommensale Keime („host flora“) stellen dabei den ersten Teilbereich dar. Gewebeständige Mastzellen und Makrophagen sowie zirkulierende Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten sind das zweite tragende System der Abwehr. Die dritte Komponente besteht aus Plasmaproteinen, die in der Lage sind, bakterienspezifische Proteine oder Kohlenhydrate zu erkennen, zu binden und zu markieren, bzw. diese direkt zu eliminieren.

1.2.1 Humorale Komponenten

Zur humoralen Komponente des Immunsystems zählt die Gesamtheit der Plasmaproteine, die in der Lage sind, Pathogene, die die erste Barriere überwunden haben anhand von Oberflächenstrukturen, bestimmten Glycosylierungsmustern ihrer Proteine sowie bestimmter Proteinantigene zu erkennen, zu binden und somit zu markieren, um sie für eine weitere Prozessierung zugänglich zu machen. Dabei spielt das Komplementsystem, die Lektine (MBL und Ficoline), das C-reaktive Protein, sowie Faktoren des Gerinnungssystems und bestimmte Immunglobuline der IgM-Fraktion eine wichtige Rolle bei der Eindämmung einer beginnenden Infektion.

1.2.2 Zelluläre Komponenten

Die zelluläre Komponente der angeborenen Immunantwort besteht aus ausdifferenzierten Monozyten, den Makrophagen, die in nahezu allen Organen und in meist organspezifischer Morphologie als Fresszellen vorkommen. Diese Zellen setzen nach Antigenkontakt ein Spektrum von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, sowie diversen Chemokinen frei, die den Organismus in die Lage versetzen, auf das eingedrungene Pathogen zu reagieren. Veränderungen, die die Migration der Leukozyten und die Extravasation in das betroffene Areal ermöglichen, sind hierbei einer der primären Effekte dieser Substanzen. Des Weiteren sind die Makrophagen in der Lage, eingedrungene Pathogene zu phagozytieren und in den nächstgelegenen Lymphknoten zu wandern. Dabei wird das aufgenommene Pathogen abgetötet und prozessiert, um anschließend Antigene des Pathogens den Immunzellen im Lymphknoten zu präsentieren und damit die weitere Immunantwort zu spezifizieren.

Die Granulozyten, neutrophile, eosinophile und basophile, sind die zahlenmäßig größte, im Blut zirkulierende kernhaltige Zellpopulation, die im Rahmen des angeborenen

Immunsystems aktiviert werden kann. Dabei stellen die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten im physiologischen Zustand den stark überwiegenden Anteil dar. Die neutrophilen Granulozyten, die durch verschiedene Chemokine, Zytokine und Komplementfragmente an den Ort des Geschehens dirigiert werden, sind wie Makrophagen befähigt Partikel zu phagozytieren und bestimmte Mediatoren freizusetzen, die wiederum Makrophagen befähigen können, aufgenommene Keime effektiv zu inaktivieren. Durch Degranulation vor Ort sind die neutrophilen Granulozyten in der Lage, extrazellulär im Gewebe befindliche Pathogene direkt zu inaktivieren (Abbas et al. 2000).

Mastzellen, Natürliche Killer (NK) Zellen und bestimmte Fraktionen der T-Zellpopulation sind weitere Bestandteile des zellulären „innate immunity“ Komplexes, die jedoch in der nachstehenden Arbeit nicht näher untersucht wurden.

Die Detektion und Reaktion der Zellen auf einen Eindringling ist durch eine relativ begrenzte Vielfalt an Rezeptoren (PRR Pattern Recognition Receptors)(Heine et al. 2003) auf der Oberfläche von Wirtszellen gekennzeichnet, die eine vergleichsweise geringe Spezifität aufweisen und somit ein breites Spektrum an Pathogenen erfassen können. Diese Rezeptoren dienen der Erkennung bestimmter, in Mikroorganismen wie Bakterien, Protozoen, Pilzen und Viren, wiederkehrender Muster, sogenannter PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) (Janeway, Jr. 1989). Dazu zählen Lipopolysaccharid (LPS) (Rietschel et al. 1992), Lipoteichonsäure (LTA) (Bhakdi et al. 1991), Peptidoglykan (PG) (Dziarski 2003; Dziarski 2004; Rietschel et al. 1998), Lipopeptide (LP) (Hoffmann et al. 1988) oder unmethylierte Oligodeoxynukleotide (ODN) CpG-DNA (Lipford et al. 1998), die potente Aktivatoren des angeborenen Immunsystems darstellen. In Studien mit *Drosophila* wurde erstmalig das Transmembranprotein Toll beschrieben dem eine Funktion im Rahmen der angeborenen Immunität zugeschrieben werden konnte. In der Folge wurde eine Reihe von orthologen Genen in Säugetieren entdeckt, die in Analogie zu Toll Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) genannt wurden. Die TLRs der Säugetiere gehören zu einer Rezeptorfamilie, deren Charakteristika extrazelluläre leuzinreiche repetitive Sequenzen (LRRs) und eine zytoplasmatische Toll/IL-1Rezeptor (TIR) Homologiedomäne sind. Bisher sind 11 dieser TLRs gefunden und beschrieben worden, von denen neun eine eindeutige Funktion zugeordnet werden konnte (Heine et al. 2003; Means et al. 2000). Die

Erkenntnisse, die durch die Aufklärung dieser Gruppe von Rezeptoren gewonnen wurden haben viel zum Verständnis der Abläufe im Rahmen der angeborenen Immunität beigetragen.

1.3 Immunmodulatoren, LPS, LTA und CpG

Die oben genannten PAMPs sind, wie bereits dort erwähnt, potente Aktivatoren und Modulatoren des Angeborenen Immunsystems, die ihre Wirkung über die Interaktion mit der jeweiligen TLRs entfalten.

1.3.1 LPS Struktur, Vorkommen und Effekte

Lipopolysaccharid (LPS) ist diejenige Komponente der äußeren Hülle Gram-negativer Bakterien, die für die meisten messbaren Effekte, die nach einer Infektion mit Gram-negativen Erregern auftreten, als ausreichend angesehen wird. Zu diesen Effekten zählt die Freisetzung von Zytokinen und in der Folge die Induktion von Fieber ebenso wie, wenn in hohen Dosen appliziert, die Induktion von Schock und schockähnlichen Zuständen, die mit Vasodilatation, Hypotonie, Hypovolämie, Hypothermie, Koagulopathie und vielen weiteren damit assoziierten Phänomenen wie auch in Absch. 1.5 beschrieben, einhergehen können. In Abb. 1-1 ist schematisch die Struktur von LPS dargestellt und in Abb. 1-2 die Struktur von Lipid A, wie sie in diversen *Enterobacteriaceae* vorkommt. Die in Gram-negativen Bakterien hoch konservierte Lipid A-Untereinheit ist dabei als das „endotoxische Prinzip“ (Rietschel et al. 1992) von LPS erkannt worden, was in vielen *in vivo* und *in vitro* Experimenten (Galanos et al. 1985) bestätigt werden konnte. Als PRR der für die beschriebenen Effekte der am häufigsten vorkommenden Varianten von LPS verantwortlich ist, wurde TLR4 identifiziert, der die Signaltransduktion im Zusammenspiel mit LBP, CD14 und MD-2 bewerkstelligt.

In der vorliegenden Arbeit wurde für sämtliche Experimente bei denen LPS verwendet worden ist, hochreines LPS von *S.abortus equi* als Suspension in PBS eingesetzt.

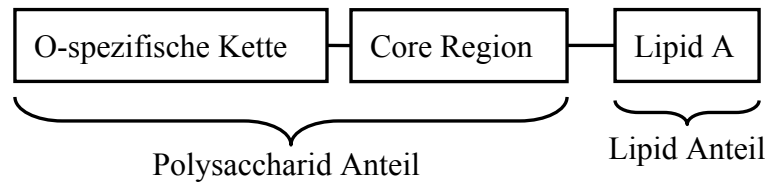
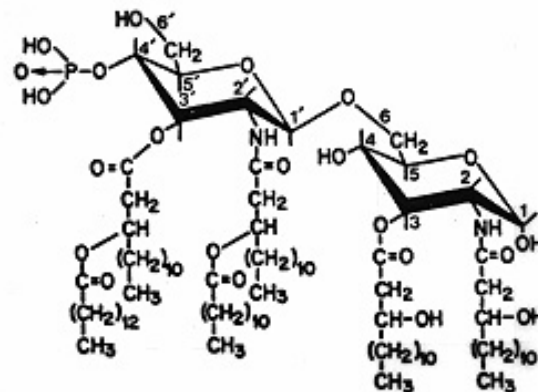


Abb. 1-1 Allgemeiner Aufbau von LPS

Abb. 1-2 Vollständige Darstellung der Struktur der Lipid A-Untereinheit aus LPS von *Enterobacteriaceae* wie z.B. *S.tm.* oder *E.coli.*

1.3.2 LPS-bindendes Protein LBP

LPS-bindendes Protein LBP ist ein lösliches, 55kDa großes Serumprotein aus der Gruppe der Akut-Phase Proteine, das von Hepatozyten produziert und sezerniert wird (Ramadori et al. 1990). LBP spielt eine wichtige Rolle beim Transport von LPS zur Zelle und führt dort zu einer beschleunigten Bindung an Oberflächenproteine auf der Zellmembran, was zu einer deutlichen Steigerung der Aktivierbarkeit der Zelle durch geringste Mengen von LPS führt (Schumann et al. 1990; Schumann et al. 1994; Wright et al. 1989). Die Bedeutung von LBP für den Organismus hinsichtlich Zellaktivierung (Wurfel et al. 1997) und Kontrolle von Infektionen mit Gram negativen Keimen konnte am Beispiel gentechnisch erzeugter LBP-defizienter Mäuse gezeigt werden (Jack et al. 1997).

1.3.3 Lipoteichonsäuren (LTA) Struktur, Vorkommen und Effekte

Lipoteichonsäuren (LTA) sind, neben Peptidoglycanen, die Hauptbestandteile der äußeren Zellwandbestandteile Gram-positiver Bakterien. Sie sind das makroamphiphile Äquivalent zum LPS Gram-negativer Keime und bestehen aus einem Kohlenhydratgrundgerüst mit repetitiven Polyglycerolphosphat- bzw. Ribitolphosphat-einheiten, das mit verschiedenen Aminosäureresten (v.a. D-Alanin) und Kohlenhydraten (v.a. Glucosamin) substituiert, und mit unterschiedlichen Glycolipiden verestert ist (Weber et al. 2003b). LTA ist wie LPS auch eine Struktur, die nicht in Vertebraten vorkommt und somit für Erkennung durch PRRs prädestiniert ist. Als Rezeptor aus der Gruppe der TLRs, der mit großer Wahrscheinlichkeit für die Signalübertragung der überwiegenden LTA Varianten verantwortlich ist, ist TLR2 beschrieben worden. Die Aktivierung verläuft, ebenfalls ähnlich der von LPS, unter Beteiligung von LBP (Weber et al. 2003a) und CD14, jedoch nicht über MD-2 (Schröder et al. 2003).

1.3.4 Bakterielle Deoxycytidylat-Phosphat-Deoxiguanylat (CpG)-DNA und synthetische Immunstimulierende Oligodeoxynukleotide (isODN)

Bakterielle DNA wurde bis in die 60er Jahre des letzten Jahrhunderts für immunologisch inert gehalten und erregte erst durch Befunde, in denen die Induktion von Interferonen nachgewiesen werden konnte, das Interesse der Forschung (JENSEN et al. 1963; ROTEM et al. 1963). Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass eine durch DNase inaktivierbarer BCG-Extrakt (MY-1) NK-Zellen aktiviert und in murinen Milzzellen sowie humanen PMNs aus Blut die Freisetzung von Interferonen bewirkt (Tokunaga et al. 1984; Yamamoto et al. 1988). Die immunmodulierenden Effekte bakterieller DNA auf Makrophagen und dendritische Zellen, die vergleichbar einer Stimulierung mit LPS durch die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen gekennzeichnet ist, konnte in vitro und in vivo nachgewiesen werden (Lipford et al. 1997; Sparwasser et al. 1997b; Stacey et al. 1996). Die in vergleichenden Experimenten mit CpG und LPS gemessenen Zytokinmuster sind jedoch teilweise sehr unterschiedlich (Hartmann et al. 1999). Des Weiteren konnte die Induktion toxischer TNF-Serumkonzentrationen in vivo, die mit Schocksymptomen einhergehen wie sie aus LPS Modellen bekannt sind, durch bakterielle DNA hervorgerufen werden (Sparwasser et al. 1997a; Sparwasser et al. 1997b).

Die beschriebenen Effekte können auf diverse Strukturmerkmale der bakteriellen DNA zurückgeführt werden, die sie für die Erkennung durch die PRRs des Immunsystems prädestinieren. Im Gegensatz zur DNA von Vertebraten kommt Cytosin in bakterieller DNA in wesentlich geringerem Umfang 5' methyliert als Methylcytosin vor (Bird 1992) und die absolute Häufigkeit von CG Sequenzen ist in eukaryotischer DNA wesentlich seltener nachweisbar (CG Suppression in Säuger-DNA) (Hergersberg 1991). Die immunologisch aktiven Sequenzen sind typischerweise als Pallindrome angeordnete Oligomere, wobei Hexamere, bei denen ein CG Dinukleotid 5' von zwei Purinbasen und 3' von zwei Pyrimidinbasen flankiert ist (5'Pu-Pu-CG-Pyr-Pyr-3'), für die Detektion durch das Immunsystem die ausschlaggebende Struktur darstellen. Als Rezeptor für Erkennung und Signaltransduktion bakterieller DNA konnte TLR9 identifiziert werden, der wie TLR4 im Fall von LPS und TLR2 bei LTA zur Familie der Toll-Like-Rezeptoren gehört (Bauer et al. 2001; Hemmi et al. 2000).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete synthetische DNA Sequenz ODN 1668 ist ein Phosphorothioat Eicosamer (TCC ATG ACG TTC CTG ATG GAC GTT CT) das im Maus-Modell eine ausgeprägte Wirkung aufweist (Cowdery et al. 1996; Tan et al. 1999). Im CASP-Modell einer akuten septischen Peritonitis beispielsweise hat die Applikation von CpG-ODN 6 Tage vor der Operation zu einer signifikant erniedrigten Mortalitätsrate der Tiere geführt (Weighardt et al. 2000).

1.4 Zytokine

Zytokine sind Proteine oder Glykoproteine, die nach Sekretion bei der Kommunikation und Regulation immunologischer Prozesse eine wichtige Rolle spielen. Darunter sind vorrangig die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Entzündung, die gegenregulatorischen Maßnahmen zur Wiederherstellung der Homöostase, sowie die Regulation der Hämatopoese zu verstehen. Ihre Wirkungsweise kann somit als aktivierend, die Zelldifferenzierung induzierend und proliferativ bzw. als inhibierend und Apoptose induzierend beschrieben werden. Bei vielen der beschriebenen Effekte wird dabei das Freisetzen anderer Zytokine und damit das Anstoßen einer Kaskadenreaktion beobachtet. Ausgeprägte pleiotrope Effekte, die auf ihre Interaktion mit den unterschiedlichsten Zellen des Organismus zurückzuführen sind, sowie die Redundanz aufgrund von Induktion gleicher funktioneller Effekte durch

unterschiedliche Zytokine, zeigt jedoch, dass es sich dabei um sehr komplexe Zusammenhänge handelt, die zu den bekannten, meist unbefriedigenden Ergebnissen beim Einsatz einzelner Zytokine als Therapeutika führten.

Der Hauptaktionsradius der Zytokine ist autokriner und parakriner Natur, wobei jedoch auch endokrine, systemische Wirkungen durchaus Relevanz besitzen. Ihre meist kurzfristigen und häufig in niedrigsten Konzentrationen wirksamen Effekte entfalten die Zytokine durch die Interaktion mit sehr spezifischen (K_d 10^{10} - 10^{12} M) und i.d.R. membranständigen Rezeptoren, die von den jeweiligen Zielzellen exprimiert werden. Zytokine können zum Teil präformiert vorliegen (Gordon et al. 1990) oder werden nach Stimulus de novo synthetisiert und sezerniert.

In vielen Fällen existieren sowohl lösliche als auch membrangebundene Formen der Zytokine. Aus allen oben aufgeführten Eigenschaften ergibt sich eine vielfältige Zytokin-Zytokin-Wechselwirkung, die zu dem Begriff des Zytokin-Netzwerkes geführt hat (Abbas et al. 2000; Ibelgaufts 2004).

1.4.1 Zytokinrezeptoren

Zytokine vermitteln ihre Wirkung auf Zielzellen durch spezifische Rezeptoren, die sich anhand der Struktur ihrer Extrazellulär- bzw. Ligand-Bindungsdomänen in fünf Familien unterteilen lassen (Abbas et al. 2000).

Die Typ-1-Zytokinrezeptoren, auch als Hämatoopoetinrezeptoren bezeichnet, bestehen aus funktionellen Komplexen, den spezifischen Ligand-Bindungs- und Signal-Transduktionsketten, die von verschiedenen Zytokinen gebunden werden können was die oft pleiotropen und redundanten Effekte erklärt.

Als Vertreter dieser Gruppe sind die Rezeptoren der Interleukine 2, 6, 13 und 15 ebenso wie die Rezeptoren von GM-CSF, G-CSF, „growth hormon“ und Prolactin zu nennen.

Typ-2-Zytokinrezeptoren unterscheiden sich von den Typ-1-Rezeptoren durch das Fehlen des WSXSW Motivs, einer Aminosäurenabfolge von Trp-Ser-X-Ser-Trp, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellen kann, das für Typ-1-Rezeptoren charakteristisch ist. Die Liganden dieser Rezeptoren werden in Analogie dazu Klasse-2-Zytokine genannt. Hierzu zählt man z.B. die Interferone, „interferon-like molecules“ und die

Interleukine 10, 19, und 29. Der funktionelle Komplex besteht auch hier aus einer ligandbindenden und einer signaltransduzierenden Polypeptidkette.

Einige Zytokinrezeptoren weisen im extrazellulären Bereich Immunglobulinomänen (Ig) auf. Zu dieser Gruppe der Ig-Superfamilie zählt man sowohl die beiden Rezeptoren von Interleukin 1, als auch die Rezeptoren von M-CSF und SCF.

Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen spielen auch in der Immunologie eine große Rolle als Rezeptoren für Chemokine. Nach Aktivierung durch einen Liganden erfolgt die Signaltransduktion über G-Proteine.

Die fünfte Familie wird als TNF- oder NGF-Superfamilie bezeichnet. Als Strukturmerkmal gelten hier die konservierten cysteinreichen Extrazellulärdomänen. Nach Aktivierung durch ihre trimeren Liganden trimerisieren auch die Rezeptoren und induzieren Apoptose oder Genexpression.

1.4.2 Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)

1.4.2.1 TNF – Historisches und Allgemeines

Die Fallbeschreibungen Ende des 19. Jahrhunderts von Patienten, bei denen ein inoperables Sarkom gleichzeitig mit dem Auftreten von schwerwiegenden bakteriellen Infektionen diagnostiziert wurde, wobei in einigen Fällen eine Nekrotisierung der Tumoren beobachtet werden konnte, führte erstmals zu der Erkenntnis, dass ein Zusammenhang von Infektionen und Entzündung mit antitumoralen Effekten besteht (Coley 1991). Die Entdeckung, dass in LPS behandelten Mäusen eine Substanz freigesetzt wird, die Tumornekrose induzieren kann (Carswell et al. 1975), hat in der Nomenklatur Eingang gefunden und ist aus historischen Gründen bis heute beibehalten worden. Zehn Jahre später gelang es, TNF zu klonieren und in *Escherichia coli* zu exprimieren (Aggarwal et al. 1985). Weitere Untersuchungen zeigten, dass TNF dem bereits beschriebenen Kachektin entspricht, einem Protein, das von Makrophagen sezerniert und für die Auszehrungserscheinungen bei Patienten, die an malignen Neoplasien oder chronischen Entzündungen erkrankt sind, verantwortlich ist (Beutler et al. 1985).

Im Serum von gesunden Individuen lässt sich selbst mit hoch sensiblen Assays (Detektionslimit 200 attomolar) kein zirkulierendes TNF nachweisen. Im Gegensatz

dazu werden im septischen Schock nanomolare Konzentrationen gemessen. In akuten und vor allem in chronischen Entzündungen spielen die erhöhten TNF-Spiegel eine wichtige Rolle, da TNF die Expression weiterer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-1 induziert. Dies ist einer der Gründe, warum die TNF-Blockade bei einigen chronischen Entzündungen gute Erfolge zeigt.

Die immense Anzahl an Publikationen zum Thema TNF die in den diversen medizinischen Datenbanken vorhanden sind, spiegeln die pleiotropen und je nach gewähltem Ansatz oder Modell oft auch widersprüchlichen Effekte dieser Substanz wieder. Neben den vielfältigen Effekten bei akuten Erkrankungen ist die Beteiligung an diversen chronisch pathologischen Zuständen wie z.B. Diabetes, neurodegenerativen Erkrankungen und Fettsucht (Aggarwal et al. 2002) sowie rheumatoider Arthritis (Vassalli et al. 1992) und Morbus Crohn belegt.

Durch molekulare Untersuchungen und Homologiestudien in Datenbanken konnte eine hoch konservierte Molekülgruppe identifiziert werden, die mit TNF bzw. den TNF-Rezeptoren strukturelle Ähnlichkeiten aufweist, und deren Mitglieder unter dem Begriff TNF-Superfamilie, bzw. TNF-Rezeptor-Superfamilie zusammengefasst werden (Locksley et al. 2001).

1.4.2.2 Die Biochemie und das Prozessieren von TNF

TNF wird als Typ-II-Membranprotein exprimiert und bildet spontan homotrimeren Strukturen aus. Das humane Protein wird als 233-Aminosäuren lange (26 kDa) (Kriegler et al. 1988) Vorläuferform translatiert und daraufhin post-translational modifiziert. Neben Myristinsäure, die über eine Amidbindung an Lysine (K19, K20) gekoppelt wird (Stevenson et al. 1992), werden Palmitinsäure-Thioester an Cystein (C47) beschrieben (Utsumi et al. 2001). Potentielle N-Glycosylierungsstellen sind im Gegensatz zu O-Glycosylierungsstellen nicht vorhanden (Müller et al. 1986). Die Signalsequenz des Pro-Peptids ist mit 76 Aminosäuren ungewöhnlich lang und dient in erster Linie dazu, das Molekül in der Zytoplasmamembran zu verankern. Neuere Daten sehen in dieser Präsequenz die Grundlage für retrograde TNF-Signal-Übertragung (Domonkos et al. 2001; Eissner et al. 2000), die mittels Anti-TNF-Antikörper aktiviert werden kann (Mitoma et al. 2005).

Die lösliche Form entsteht durch proteolytische Prozessierung (Shedding) der membranständigen pro-TNF-Extrazellulärsequenz vorwiegend durch die Metalloproteinase TACE/ADAM17 (TNF-Alpha-Cleavage-Enzyme) (Black et al. 1997; Gearing et al. 1994). Das so modifizierte, reife murine TNF-Molekül besteht aus 156 Aminosäuren (human 157 AS), ist an Position 7 glykosyliert und besitzt ein Molekulargewicht von 17 kDa (Pennica et al. 1985). Das aktive lösliche TNF-Molekül ist ein Homotrimer mit 52 kDa das aus drei identischen 17 kDa Untereinheiten besteht. Seine dreidimensionale Struktur wurde durch Röntgenstrukturanalysen aufgeklärt (Jones et al. 1989). Zwischen den beiden Aminosäuresequenzen von humanem und Maus-Pre-TNF besteht 79%-ige Homologie (Pennica et al. 1985).

1.4.2.3 Expression, Regulation und Funktion von TNF

Die Hauptproduzenten von TNF sind vornehmlich Zellen hämatopoetischen Ursprungs wie beispielsweise aktivierte Makrophagen (Männel et al. 1980), Lymphozyten, NK-Zellen, neutrophile Granulozyten und Mastzellen (Steffen et al. 1989). Die Aktivierung dieser Zellen erfolgt dabei meist durch die Interaktion bakterieller Produkte wie LPS, LTA oder CpG mit den oben beschriebenen PRRs d.h. durch Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Viren, Protozoen und Pilze (Männel et al. 2000b). Des Weiteren sind Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$, IL-1, IL-2 und TNF selbst als potente Induktoren der TNF-Produktion zu nennen. Darüber hinaus wurden auch Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs, z.B. Endothelzellen, Fibroblasten und einige Tumorzellen als TNF-Produzenten identifiziert (Oloff et al. 1987). Die Synthese erfolgt i.d.R. nicht konstitutiv sondern ist stark reguliert (Aggarwal et al. 1996).

Als zentraler Mediator im Entzündungsgeschehen interagiert TNF mit einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems ebenso wie mit somatischen Zellen, wie beispielsweise mit Endothelzellen, welche bei Entzündungsprozessen und der Regeneration und Wundheilung eine Schlüsselrolle einnehmen.

Mäuse, die transgen für den TNF-Genlocus sind, zeigen eindeutige Anzeichen von chronischen Entzündungen (Butler et al. 1997). Andererseits kommt TNF als Schlüsselmolekül in der Immunantwort im Kontext bakterieller Infektionen eine zentrale Rolle zu (Echtenacher et al. 1990; Echtenacher et al. 2001; Marino et al. 1997b). TNF ist außerdem das zentrale Effektormolekül im septischen Schock (Tracey

et al. 1989). In Tiermodellen wurde gezeigt, dass die Hemmung der TNF-Wirkung das Auftreten der Schocksymptome (Blutdruckabfall, hämorrhagische Nekrose in der Niere und Leber, multiples Organversagen) verhindert (Vassalli 1992). Die Gabe von hoch - dosiertem TNF (oder LPS) hingegen induziert Schock mit Symptomen, die weitgehend mit denen des septischen Schocks nach Infektion mit Gram-negativen Bakterien übereinstimmen (Fiers et al. 1990).

TNF wirkt also einerseits hemmend durch Induktion von Caspasen, die die Apoptose einleiten, und andererseits aktivierend und proliferationsfördernd durch die Induktion von diversen Transskriptionsfaktoren (NF κ B, AP1 etc.) (Smith et al. 1994; Tartaglia et al. 1993b; Vassalli 1992). Neuere Publikationen bescheinigen TNF darüber hinaus ein angiogenes Potential (Feldmann et al. 2004; Frater-Schroder et al. 1987). TNF spielt auch eine wichtige Rolle bei Autoimmun-Erkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis oder Morbus Crohn. Organabstoßung, „graft versus host-disease“ (GVHD) (Piguet et al. 1987) und Schäden durch Ischämie/Reperfusion können durch anti-TNF-Therapien gemildert oder vermieden werden (Fiers 1991).

Weitere wichtige Eigenschaften von TNF im Kontext von Infektion und Sepsis sind

- Induzierung von Apoptose (Smith et al. 1994)
- Aktivierung des Endothels (Gamble et al. 1985)
- Induktion der Prostaglandin E₂-, TNF- und Interleukin-1 (Il-1)-Produktion durch Monozyten ((Bachwich et al. 1986; Dinarello et al. 1986; Philip et al. 1986)
- Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Sato et al. 1986)
- Verstärkung der Phagozytose von Granulozyten (Klebanoff et al. 1986)
- Differenzierung von Monozyten (Gessani et al. 1993; Takeda et al. 1986)
- Induzierung von Akut-Phase Proteinen (Ramadori et al. 1988)

1.4.3 Die TNF-Rezeptoren

1.4.3.1 Nomenklatur

TNF vermittelt seine Effekte über zwei Rezeptoren. Für beide TNF-Rezeptoren gib es je nach verwendeter Nomenklatur verschiedene Bezeichnungen:

TNF-Rezeptor 1: TNFR1, p55TNFR, p55/p60 (mouse/human), CD120a, TNFRSF1A

TNF-Rezeptor 2: TNFR2, p75TNFR, p75/p80 (mouse/human), CD120b, TNFRSF1B

1.4.3.2 Struktur

Die beiden humanen membranständigen TNF-Rezeptoren wurden erst 1990, einige Zeit nach der Entdeckung ihres Liganden, kloniert (Loetscher et al. 1990; Smith et al. 1990). Die Maus-Rezeptoren folgten ein Jahr später (Lewis et al. 1991a). Aufgrund ihrer molekularen Masse wurden sie als p55TNFR bzw. p75TNFR bezeichnet. Es handelt sich um Typ-I-Membranproteine, die aufgrund der charakteristischen cysteinreichen Domänen im extrazellulären Bereich namensgebend für die TNF-Rezeptor-Superfamilie waren. Betrachtet man die Aminosäuresequenzen, ist der p75TNFR (439 AS) nur unwesentlich größer als der p55TNFR (426 AS). Die Ligand-Bindungsdomänen sind sehr ähnlich und die übrigen extrazellulären Abschnitte weisen je nach Spezies eine Sequenzhomologie von ca. 30% auf. An die hydrophoben Transmembrandomänen schließen sich unterschiedlich gestaltete intrazelluläre Domänen an. Der p55TNFR weist in diesem Bereich eine sog. Todesdomäne („Death Domain“, DD) auf (Tartaglia et al. 1993a), die nach Rezeptoraktivierung das spezifische bivalente Adapterprotein TRADD rekrutiert und sowohl Apoptose als auch den klassischen, anti-apoptotischen und pro-inflammatorischen NF κ B-Weg einleitet. Der p75TNFR hingegen hat diese Domäne nicht, sondern besitzt am C-terminalen Ende der Intrazellulärdomäne eine Bindungsstelle für TRAF-Moleküle. Die Bindung des Liganden führt zur Aktivierung des klassischen und auch des alternativen NF κ B-pathways. Details zur TNF-Rezeptor-Signal-Übertragung können dem Review von Wajant entnommen werden (Wajant et al. 2003).

1.4.3.3 Interaktion von TNF mit seinen Rezeptoren

Die beiden TNF-Rezeptoren werden als Homo-Multimere auf der Zellmembran exprimiert. Die Interaktion mit homotrimeren Liganden führt dann zur Bildung von Clusterstrukturen, die eine Signalkaskade anstoßen (Chan et al. 2000). Lösliches TNF bindet mit hoher Affinität an beide TNF-Rezeptoren, wobei für den p55TNFR ein ca. 15fach höherer Wert gefunden wurde. Für den p75TNFR hingegen konnte eine höhere Affinität für membranständiges TNF gezeigt werden (Grell 1995). Die Beteiligung an

der Thymozytenproliferation (Grell et al. 1998), die Eigenschaft als Kostimulator bei der T-Zell-Aktivierung (Aspalter et al. 2003) und die konstitutive Expression auf regulatorischen T-Zellen (Annunziato et al. 2002) wurden für den p75TNFR gezeigt, was seine Funktion in der interzellulären Regulation des lymphoiden Systems unterstreicht.

1.4.3.4 Expression, Regulation und Funktion der TNF-Rezeptoren

Während der p55TNFR konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert wird, ist die Expression des p75TNFR stark reguliert und im Allgemeinen auf Zellen des Immunsystems beschränkt. Pro-inflammatorische Zytokine, bakterielle Produkte (LPS, LTA, CpG etc.) und auch Stressoren wie Hypoxie sind in der Lage die Expression des p75TNFR zu erhöhen (Seitz et al. 1998). Erhöhte p75TNFR Expression in chronischen Entzündungen, z.B. im Gastrointestinalbereich (Mizoguchi et al. 2002), bei Schlaganfall und Herzinfarkt (Semenza 1998) sind ebenso beschrieben wie nach Durchführung einer CLP (Villa et al. 1995). Die Funktionen der beiden Rezeptoren lassen sich sehr gut an gentechnisch veränderten Mäusen darstellen. Die p55TNFR-defiziente Maus ist resistent gegenüber einem LPS-induzierten Schock und ist in ihrer Abwehr von Pathogenen beeinträchtigt (Pfeffer et al. 1993b; Rothe et al. 1993a). Die Entwicklung der B-Zell-Areale in den sekundären lymphatischen Organen dieser Tiere ist gestört. Die Entwicklung der Peyer'schen Plaques verläuft jedoch normal (Pasparakis et al. 1997).

Die p75TNFR-defizienten Tiere unterscheiden sich jedoch kaum von Wildtyp-Tieren. Die Entwicklung der T-Zellen verläuft normal, sie sind jedoch weniger sensitiv hinsichtlich TNF-Zytotoxizität (Erickson et al. 1994b). Die Proliferation reifer Lymphozyten (Grell et al. 1998) und kostimulatorische Effekte bei der T-Zell-Aktivierung (Kim et al. 2001), die Differenzierung und Aktivierung von NK-Zellen (Mason et al. 1995), sowie die Regulation spezifischer hämatopoetischer Prozesse werden jedoch maßgeblich von diesem Rezeptorsubtyp reguliert (Jacobsen et al. 1994; Jacobsen et al. 1995). Im Modell der subletalen CLP zeigt der p75TNFR keine Relevanz hinsichtlich Überlebenszeit, bei der Ausprägung einer LPS-induzierten Schutzfunktion, vor den Folgen einer CLP, spielt er hingegen eine tragende Rolle (Echtenacher et al. 2002).

1.4.3.5 Lösliche TNF-Rezeptoren

Die Extrazellulärdomänen beider TNF-Rezeptoren lassen sich als lösliche Moleküle in Serum und Urin gesunder Individuen nachweisen. Im Zuge pathologischer Prozesse steigen die Werte signifikant an. Für Patienten mit rheumatoider Arthritis (Cope et al. 1992), Lupus Erythematoses (Aderka et al. 1993), Krebs (Aderka et al. 1991), Sepsis (Schroder et al. 1995) und HIV (Hober et al. 1996) ist dies belegt und gilt als diagnostischer Marker. Nach Induktion einer septischen Peritonitis durch CLP sind die Serumwerte für beide löslichen Rezeptoren ebenfalls deutlich erhöht, wobei die Konzentration von sTNFR2 fast 100fach höher ist als diejenige von sTNFR1 (Villa et al. 1995).

Wie auch bei TNF ist für diesen proteolytischen Prozess vor allem TACE/Adam17 verantwortlich. In vitro Experimente für den löslichen p75TNFR zeigten, dass das Freisetzen dieser Rezeptoren durch Stimuli wie TNF, LPS und anti-CD3-Antikörpern um ein vielfaches gesteigert werden kann. Als Quelle der löslichen TNFR kommen vor allem Makrophagen, T-Zellen und Granulozyten in Frage (Crowe et al. 1993; Lantz et al. 1994; Porteu et al. 1990).

Als biologische Funktion dieser löslichen Rezeptoren kann man das Neutralisieren des zirkulierenden Liganden annehmen (Mohler et al. 1993) was sich auch in der Messung von TNF-Serumwerten in TNFR2-defizienten Tieren nach LPS Stimulus widerspiegelt (eigene Befunde). Dieses Prinzip findet auch im Rahmen der anti-TNF-Therapie Anwendung. Eine dadurch verlängerte Halbwertszeit des komplexierten Liganden wurde zwar diskutiert, scheint jedoch keine biologische Relevanz zu haben (Aderka et al. 1998).

1.4.4 Interleukin-6

IL-6 ist ein 185 Aminosäuren langes, an AS 73 und AS 172 glycosyliertes Protein das aus einem 212 AS Vorläuferprotein hervorgeht. Von Monozyten ist bekannt, dass sie mindestens fünf verschiedene Varianten exprimieren, die eine molekulare Masse zwischen 21,5 und 28 kDa aufweisen, wobei der hauptsächlichliche Unterschied durch posttranslationale Modifikationen wie Glycosylierung und Phosphorylierung zustande kommt. Murines und humanes IL-6 weisen eine 65-prozentige Sequenzhomologie auf DNA-Ebene und nur eine 42-prozentige Homologie auf Proteinebene auf, wobei jedoch

humanes IL-6 in Mäusen und Ratten dennoch in der Lage ist biologische Aktivität zu entfalten.

IL-6 ist Namensstifter für eine Familie von Zytokinen, der auch der Leukozyten Inhibierende Faktor (LIF), der Ziliäre neurotrophische Faktor (CNTF), OncostatinM (OSM), IL-11, und Cardiotrophin-1 (CT-1) angehören und deren Gemeinsamkeit in der Induktion der hepatischen Expression von Akut-Phase-Proteinen liegt (Oldenburg et al. 1993). Es wird gemeinsam mit IL-1 α/β und TNF der Gruppe derjenigen pro-inflammatorischen Zytokine zugeschrieben, die an der Regulation der frühen Phase des Entzündungsgeschehens beteiligt sind (Hirano 1992). Ein weiterer Aspekt, der die Bestimmung von IL-6 im Rahmen dieser Arbeit sinnvoll erscheinen ließ, ergibt sich aus dem Befund, dass IL-6-defiziente Tiere nicht in der Lage sind eine Infektion mit *L.m.* zu kontrollieren, was auf eine gestörte Akut-Phase-Reaktion zurückgeführt werden konnte. (Kopf et al. 1994)

Darüber hinaus ist IL-6 ein ausgesprochen pleiotropes Zytokin, das ebenso wie TNF an einer Vielzahl immunologischer Abläufe beteiligt ist, die weit über seine Funktion im Rahmen des Entzündungsgeschehens hinausgehen was auch aus den historischen Bezeichnungen ersichtlich ist wie beispielsweise B-Zell-stimulierender Faktor (BSF)-2, Interferon-2 oder Hepatozyten-Stimulierender Faktor (HSF).

Die Expression und Sekretion von IL-6 ist, ähnlich wie bei TNF, in einer Vielzahl von Zellen nachweisbar. Zu den Hauptproduzenten in vivo zählen stimulierte Monozyten und Makrophagen, T- und B-Zellen, Granulozyten, Mast- und Gliazellen als Vertreter der lymphatisch-myeloischen Zellreihe ebenso wie Fibroblasten, Chondrozyten, Keratinozyten, Endothel- und glatte Muskelzellen aus der Gruppe der somatischen Zellreihe. Des Weiteren sind eine Reihe von Tumoren bekannt, die IL-6 konstitutiv exprimieren wie z.B. Glioblastome und Zervikalkarzinome, wobei IL-6 im letztgenannten Fall die Funktion eines autokrinen Wachstumsfaktors übernimmt (Eustace et al. 1993).

Für IL-6 sind mindestens zwei verschiedenen Rezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäten (K_d 10^{-9} und 10^{-11}) beschrieben worden, wobei jedoch die Existenz von weiteren Rezeptoren als wahrscheinlich gilt, da bereits in femtomolaren Konzentrationen biologische Effekte nachweisbar sind (Ibelgaufts 2004). Eine Parallele zum TNF/TNF- Rezeptorsystem ist in der Existenz von löslichen Rezeptoren zu sehen.

Im Gegensatz zu TNF haben diese jedoch nicht nur regulatorische Funktionen, indem sie freies IL-6 abfangen, sondern stellen für bestimmte Vorläuferzellen der hämatopoetischen Reihe als IL-6/IL-6-Rezeptorkomplex die alleinig wirksame Struktur dar, die durch ein rekombinant hergestelltes Fusionsprotein (Hyper-IL6) in seiner Wirkung sogar noch übertroffen werden kann (Chebath et al. 1997; Fischer et al. 1997).

1.4.5 Interleukin-10

IL-10 stellt ein 178 AS großes Peptid dar, wobei 21 AS im murinen und 18 AS im humanen Molekül als Signalsequenz dienen. Somit ergibt sich für die reife Form des Proteins bei der Maus eine Länge von 157AS mit einer molekularen Masse von 18,4 kDa und beim Menschen entsprechend 160 AS mit 18,6 kDa. Zwischen humanem und murinem IL-10 besteht eine weitreichende Sequenzhomologie mit einer 73-prozentigen Übereinstimmung der Aminosäuren. Im Gegensatz zu humanem IL-10 (hIL-10) scheint das Maus-IL-10 (mIL-10) einer ausgeprägten und heterogenen N-terminalen Glycosylierung zu unterliegen, die jedoch auf seine biologische Aktivität keinen Einfluss hat. Dabei ist hIL-10 in der Maus biologisch aktiv nicht aber vice versa (Moore et al. 2001). Die biologisch aktive Form von IL-10 ist ein nicht kovalent gebundenes Homodimer, bei dem sich die Polypeptidketten gegenseitig durchdringen, vergleichbar der Struktur von IFN γ (Syto et al. 1998). Daneben existieren eine Reihe von viralen IL-10-Homologen, die ebenfalls mit den IL-10 Rezeptoren interagieren und biologische Aktivität entfalten können, die aber dabei eine deutlich reduzierte Effektivität aufweisen.

Interleukin 10 gehört strukturell zur Familie der Klasse 2 α -helikalen Zytokine die z.B. IL19, IL20, IL-22, und IL-26 umfasst ebenso wie die Interferone (IFN- α , - β und - γ) und die den Interferonen verwandten Moleküle wie Limitin, IL-28A, IL-28B, und IL-29 (Pestka et al. 2004).

Funktionell zählt IL-10 zur Klasse der anti-Inflammatorischen Zytokine (s. auch 1.5.3) mit jedoch nicht ausschließlich supprimierenden Effekten. Die ursprüngliche Bezeichnung Zytokin-Synthese-inhibierender Faktor (CSIF) ist auf die Unterdrückung der Synthese von IL-2, TNF, IFN γ und GM-CSF in Th1-Zellen durch einen Überstand aus ConA-stimulierten Th2-Zellen zurückzuführen (Fiorentino et al. 1989).

Die Funktion als potenter Inhibitor der Freisetzung von IL-1 β , IL-6, IL-12, GM-CSF, TNF und IL-10 selbst aus aktivierten Makrophagen (de Waal et al. 1991) verdeutlicht die zentrale Rolle, die dieses Zytokins bei der Regulation der Immunantwort, vor allem bei deren Begrenzung, spielt. Ebenso sind hemmende Effekte auf die Freisetzung von Zytokinen aus neutrophilen Granulozyten beschrieben worden (Kasama et al. 1994).

Die verminderte Antigen-Präsentation von Makrophagen und dendritischen Zellen (Enk et al. 1993), eine erniedrigte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie von MHC Klasse II Molekülen (Ding et al. 1993; Willems et al. 1994) und eine verminderte Chemokin Freisetzung (Kasama et al. 1994) nach IL-10-Exposition sind gleichfalls beschrieben worden.

1.5 Sepsis, Sepsis-Modelle und LPS-Toleranz

Der Begriff der Sepsis charakterisierte in seiner ursprünglich verwendeten Form eine bakterielle Infektion, die, von einem Focus ausgehend generalisiert, also systemisch wird und somit über den Blutkreislauf in die verschiedenen Organe disseminiert, diese kolonialisert und so zu den klinisch sichtbaren Symptomen führt. In der Folge, nachdem sich die Erkenntnis durchgesetzt hatte, dass die Reaktion des Wirtes auf die sich ausbreitenden Mikroorganismen und nicht nur die Mikroorganismen selbst maßgeblich an einer Sepsis beteiligt sind, wurde versucht, im Rahmen der Konsensus Konferenz des „American College of Chest Physicians“ und der „Society of Critical Care Medicine“ im August 1991 eine einheitliche Sprachregelung zu finden. Das Hauptaugenmerk galt dabei der präziseren Definition der bis dahin oft synonym verwendeten Begriffe Bakteriämie, Septikämie, Sepsis, Sepsis Syndrom und Septischer Schock (Bone et al. 1992; Matot et al. 2001). In diesem Zusammenhang wurde der Terminus Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) geprägt, der ein umfangreiches entzündliches Geschehen charakterisiert, das in Folge verschiedener Auslöser wie beispielsweise Infektionen aber auch Traumata, Pankreatitiden, Verbrennungen, größeren chirurgischen Eingriffen etc. auftritt (Faist et al. 1986; Faist et al. 1988). Dabei wurde das Zusammenspiel endogener Entzündungsmediatoren in Form einer generalisierten Entzündungsreaktion mit Beteiligung bakterieller Komponenten, also einer Infektion, als Sepsis definiert. Als Infektion wird dabei die Invasion und Besiedelung von Organen, Flüssigkeiten oder Körperhöhlen, die physiologischerweise

steril sind, durch pathogene, bzw. potentiell pathogene Keime verstanden. Erweiterungen und Ergänzungen dieser Definitionen wurden im Dezember 2001 auf der „2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions“ Konferenz (Levy et al. 2003) vorgenommen, wobei die grundlegenden, diese Arbeit betreffenden Definitionen im wesentlichen erhalten geblieben sind. In Diagramm 1-1 sind die Begriffe und Abläufe in vereinfachter, schematisierter Form dargestellt.

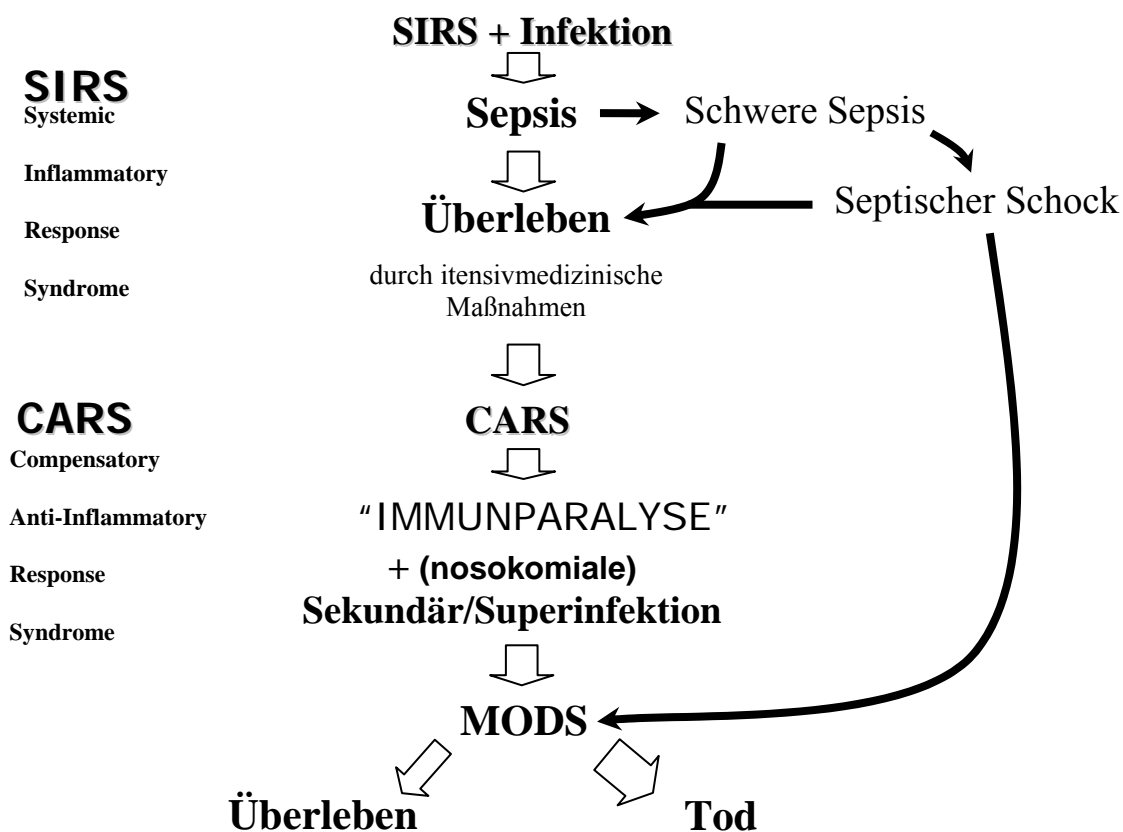


Diagramm 1-1 Vereinfachte Darstellung der Abläufe im septischen Geschehen.

1.5.1 Sepsis-Modelle

Es gibt eine Reihe von Modellen, in denen versucht wird septische Zustände darzustellen. Viele davon beschränken sich auf Bolusapplikationen lebender oder toter Erreger bzw. Einzel-Substanzen, die aus diesen isoliert wurden, wie beispielsweise die oben genannten LPs oder CpGs. Die überwiegende Zahl dieser Modelle kann jedoch nur unzureichend die komplexen Zustände, wie sie während einer Sepsis vorherrschen (Deitch 1998; Wichterman et al. 1980), widerspiegeln. Die Applikation von hoch-

dosiertem LPS kann in LPS-sensitiven Tieren zur Induktion eines letalen Schocks führen, der Gemeinsamkeiten mit einem septischen Schock aufweist (Galanos et al. 1979b; Galanos et al. 1993). Eine Bolusinjektion von LPS führt zu einer wesentlich stärkeren Freisetzung von Zytokinen als dies z.B. nach einer CLP (s. unten) der Fall ist, jedoch nicht zur Induktion einer gesteigerten Anfälligkeit für bakterielle Infektionen, sondern kann im Gegenteil zu einer verbesserten Überlebensfähigkeit führen (Echtenacher et al. 2002). Dieses Phänomen wurde als LPS-Toleranz beschrieben (s.unten). Um Modelle zu finden, die näher am tatsächlichen Geschehen liegen, sind verschiedene Modelle miteinander verglichen und bewertet worden (Deitch 1998; Fink et al. 1990; Wichterman et al. 1980) s. unten.

Der Einsatz von LPS als Modellsubstanz zur Induktion eines Schocks oder von schockähnlichen Zuständen hat eine Reihe von letalen Schock-Modellen hervorgebracht. Eine dieser Modifikationen ist das LPS/DGalN-Modell, bei dem eine Kombination aus D-Galactosamin mit niedrig-dosiertem LPS für die Induktion einer letalen LPS- Wirkung eingesetzt wird (Galanos et al. 1979a; Lehmann et al. 1987). In diesem Modell ist die LPS-induzierte Freisetzung von endogenem TNF als Ursache für die Hepatotoxizität in den Hexosamin-sensibilisierten Leberzellen gefunden worden, wobei die letale Dosis $\sim 10^{-3}$ der letalen LPS-Dosis ohne D-GalN beträgt.

1.5.2 LPS-Toleranz

Im Kontext der LPS-Forschung ist auch das Phänomen der LPS-Toleranz beobachtet worden. Die LPS-Toleranz besagt, dass die Applikation von geringer Mengen LPS einen, je nach Initialdosis, unterschiedlich lang anhaltenden Schutz vor den Folgen der Applikation einer letalen Dosis von LPS oder TNF bewirkt (Lehmann et al. 1987). Diese Toleranz wird im Hoch-Dosis-LPS Modell, LPS/D-GalN Modell und im Hoch-Dosis-TNF Modell sichtbar und ist von der Anwesenheit von einer Reihe von funktionsfähigen Proteinen abhängig. Der exakte Mechanismus der LPS-Toleranz ist jedoch noch nicht geklärt. Die LPS-Toleranz muss auch unterschieden werden von einer Reihe von Defekten in der LPS-Signalwirkung die ebenfalls zu LPS-Unempfindlichkeit führen. So zeigen C3H/HeJ-Mäuse eine angeborene LPS-Toleranz, die auf den Austausch einer AS im TLR4 zurückgeführt werden konnte (Hoshino et al. 1999). Ebenso tolerieren IFN γ -Rezeptor defiziente Mäuse wesentlich höhere LPS-Dosen als

die entsprechenden Wildtyp-Tiere. Bei TNFR1 defizienten Tieren ist ebenfalls eine Toleranz im LPS/D-GalN Modell feststellbar (Nowak et al. 2000; Pfeffer et al. 1993a), was ein Hinweis auf die zentrale Rolle von TNF in diesem Zusammenhang ist.

1.5.3 Septische Peritonitis

Eine Peritonitis ist definitionsgemäß eine infektiös/bakteriell bedingte, meist sekundär durch endogene Kontamination mit aerob-anaeroben Bakterien der Darmflora nach Perforation eines Hohlorgans auftretende Entzündung des Peritoneums. Eine septische Peritonitis liegt vor, wenn im Verlauf eine Dissemination über Lymphe und Blut stattfindet, die Keime sich systemisch ausbreiten und einzelne Organe in Mitleidenschaft gezogen werden können.

Für die Darstellung einer septischen Peritonitis im Tiermodell sind viele verschiedene Modelle untersucht worden, wobei sich die zökale Ligatur und Perforation (CLP) als eine im Nagetiermodell gut handhabbare Prozedur erwiesen hat, die reproduzierbare Ergebnisse liefert (Wichterman et al. 1980). Im Verlauf einer subletalen CLP kommt es dabei zu einem starken Influx von Leukozyten, v.a. neutrophilen Granulozyten und Monozyten die durch den Kontakt mit den freigesetzten Bakterien, und nachfolgend mit nekrotischem Gewebe, einen erheblichen Beitrag zu den systemisch messbaren Zytokinen leisten (Walley et al. 1996). Im weiteren Verlauf kommt es dann zur Bildung eines Abszesses der nach mehreren Wochen vollständig resorbiert wird (eigene Beobachtungen).

Ein weiteres Modell, die Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) (Zantl et al. 1998), wird ebenfalls als Modell zur Induktion einer septischen Peritonitis eingesetzt, wobei jedoch im Krankheits- und Zytokinverlauf deutliche Unterschiede zur CLP auftreten (Maier et al. 2004).

1.6 "Immunparalyse"

Die Erstbeschreibung der Immunparalyse geht auf in vitro Experimente mit humanen Monozyten aus peripherem Blut zurück, die von Patienten stammten, die nach Allotransplantation immunsupprimiert waren oder von Patienten mit einer Peritonitis, deren Ursache ein septischer Focus war (Volk et al. 1991; Volk et al. 1996). An den Monozyten dieser Patienten konnten diverse phänotypische Abweichungen gezeigt

werden, wobei eine drastisch reduzierte HLA-DR (human leucocyte antigen MHC Klasse II) Expression um mehr als 80% als Hauptparameter für die Charakterisierung der Immunparalyse herangezogen wurde. Das derart definierte Phänomen geht mit vielfältigen funktionellen Einschränkungen der Zellen einher, wie beispielsweise einer verminderten Antigenpräsentation, erniedrigter Bildung reaktiver Sauerstoff-Intermediate (ROS) und einer nach Stimulus stark reduzierten Kapazität Zytokine freizusetzen.

Bei dem diesem Phänomen zu Grunde liegenden Mechanismen wird ein biphasisches Geschehen postuliert, welches in einem ersten Schritt durch eine **hyper**-inflammatorische Phase gekennzeichnet ist, auf die eine **hypo**-inflammatorische Phase folgt (Höflich et al. 2002).

Die hyper-inflammatorische Phase wird dabei als Folge einer Infektion angesehen, die vom Organismus nicht ausreichend kontrolliert werden kann, systemisch wird und somit auch eine systemische Entzündungsreaktion hervorrufen kann. Diese generalisierte Entzündungsreaktion muss jedoch nicht immer infektiösen Ursprungs sein, sondern kann ebenso auch steril, als Folge massiver Gewebsschädigung nach Verbrennung, ausgedehnten Operationen oder sonstigen Ereignissen ein SIRS auslösen (s.oben). Dieser Zustand ist durch eine vermehrte Produktion und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-1 β , IFN γ , G-CSF und IL-6 gekennzeichnet, die systemisch wirksame Konzentrationen erreichen und somit weitere systemische Entzündungsreaktionen induzieren können. Die Produktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber, Induktion von Fieber und einer neuroendokrinen Stressreaktion im ZNS, sowie Veränderungen im Appetitzentrum (Anorexie) sind frühe messbare Parameter einer SIRS. Des Weiteren sind eine schnellere Ausreifung und Ausschüttung von unspezifischen Abwehrzellen (Granulozyten und Monozyten) aus dem Knochenmark und die Bereitstellung von Energie durch Umschalten der Stoffwechselprozesse von einer anabolen zu einer katabolen Bilanz im Fett-, Leber- und Muskelgewebe bedeutsame, detektierbare Parameter einer SIRS. Weitere Effekte, die durch die in überschießenden Mengen produzierten pro-inflammatorischen Zytokine auftreten, sind die systemische Vasodilatation, Steigerung der Gefäßpermeabilität (Moser et al. 1989) und Aktivierung des Gerinnungssystems, woraus Volumenmangel, Verbrauchs-koagulopathie und Multiorganversagen resultieren können (s. Diagramm 1-1).

Die hypo-inflammatorische Phase, die als Folge der gegenregulatorischen Maßnahmen des Organismus zur Wiederherstellung der Homöostase verstanden wird, wird ihrerseits durch die Freisetzung anti-inflammatorisch wirksamer Zytokine und Substanzen hervorgerufen. Zu den wichtigsten anti-inflammatorischen Zytokinen zählen IL-4, IL-10, IL-13 (Di Santo et al. 1997) oder TGF- β , die zu einer Konversion des Phagozytoseaktivitäts- (Laichalk et al. 1996; Oswald et al. 1992a; Oswald et al. 1992b) und des Sekretionszustandes (Cassatella et al. 1993; Kasama et al. 1994; Ralph et al. 1992) der Makrophagen und anderer Immunzellen führen, und diese somit in ihrer Funktion bei der Aufrechterhaltung einer Entzündung einschränken. Ebenso sind Proteine, die freigesetzte pro-inflammatorische Zytokine binden und somit deren Aktivität hemmen, an dieser Gegenregulation beteiligt. Beispiele hierfür sind der IL1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA) oder der lösliche p75TNF-Rezeptor, der freies und membranständiges TNF bindet und damit, im erstgenannten Fall, zu einer deutlichen Reduktion der Serumkonzentration beiträgt (Männel et al. 2000a; Nawroth et al. 1991; Villa et al. 1995). Wenn die Gegenregulation länger anhaltend ist als dies zum Erreichen der Homöostase notwendig ist, kommt der Organismus in der Folge in einen Zustand der Immunsuppression der in seiner extremsten Ausprägung als Immunparalyse bezeichnet wird. Während der Immunparalyse ist der betroffene Organismus nicht mehr in der Lage, auf eine Infektion mit einer adäquaten Entzündungsreaktion zu reagieren, um die Infektion entsprechend einzudämmen und unter Kontrolle bringen zu können.

Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die komplexen Zusammenhänge während einer Sepsis in ihrer Abhängigkeit von TNF und beiden für die Signaltransduktion dieses Zytokines zuständigen Rezeptoren, p55TNFR1 und p75TNFR2, genauer zu untersuchen. Als Tiermodell für die Induktion einer septischen Peritonitis wurde dafür die zökale Ligatur und Punktion (CLP) verwendet, um anhand der systemisch nachweisbaren Zytokine sowie anhand der Immunzellen des Peritoneums den Immunstatus näher zu charakterisieren. Der Zeitpunkt zwei Tage nach Induktion einer Peritonitis, der durch eine verminderte Produktionsfähigkeit für Zytokine sowie durch eine gesteigerte Empfindlichkeit für bakterielle Infektionen gekennzeichnet ist, stand dabei im Zentrum dieser Untersuchungen, da sich zu diesem Zeitpunkt eine Sepsis-induzierte Immunsuppression nachweisen lies.

Die Charakterisierung potentiell protektiver Mechanismen, die trotz der Immunsuppression wirksam sind, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

Material und Methoden

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

2'2-Azino-di(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure(6)) (ABTS)	Boehringer Mannheim
ABTS Substrat Puffer	Boehringer Mannheim
Actinomycin D	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Fluka, Buchs, Schweiz
Dapi	Sigma Aldrich, Deisenhofen
D-Galactosamin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamycin	ICN, Meckenheim
Giemsa-Staining Modified	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
IMDM Medium	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Ketaminhydrochlorid 5%	WDTeG Garbsen
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>S.a. equi</i>	Chris Galanos (Galanos et al. 1979b)
Lipoteichonsäure (LTA) von <i>S.aureus</i>	Thomas Hartung, Universität Konstanz, Deutschland
May-Grünwald-Staining Modified	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
MTT (3-(4,5-Diethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyl) -Tetrazoliumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, Steinheim

SIGMA 104	Sigma Aldrich, Steinheim
Saccharose	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Skinman® soft Händedesinfektionsmittel	Ecolab Deutschland GmbH, Düsseldorf
Trypanblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA-Lösung	Tecnomara, Fernwald
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz
Tyrode´s Puffer	Sigma Aldrich, Steinheim
Xylazinhydrochlorid 2%	WDTeG Garbsen

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.a..

2.2 Verbrauchsmaterial , Geräte und Software

ATB nephelometer	Biomerix, New York, USA
Begasungsbrutschrank – Cell Safe	Integra Biosciences, Baar, Schweiz
Dry Slide Oxidasetest	Becton Dickinson
Eppendorfcups (1,5 ml / 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Plastik-Pistille	Eppendorf, Hamburg
ELISA Reader	MWG Biotech, Ebersberg
Gewebekulturschalen	Becton-Dickinson, Heidelberg
Hyperfilm ECL	Amersham, Braunschweig
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Kryo-Röhrchen	Nunc, Naperville
Laminair Flow HB 2448– Sterilbank	Heraeus, Hanau
Mikroskop	Olympus, Hamburg
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Brand, Giessen
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Ultra Turrax	IKA Labortechnik, Staufen
Waagen:	Sartorius R16OP
	Sartorius L2200S
	Sartorius, Göttingen
	Sartorius, Göttingen

Zeiss Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Mikroskop: Zeiss Axiovert S100	Zeiss, Oberkochen
Systembetreuung	Visitron Systems GmbH, München
Metamorph-Software	Universal Imaging Corp., West Chester, (USA).
Zellkulturflaschen (70, 250, 750 ml)	Falcon Heidelberg
Zentrifugen: Beckmann J2-21 M/E Zentrifuge	Beckmann, München
Beckmann L-70 Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Zytospin Zentrifuge	Shandon, Pittsburgh, USA
Zentrifugenröhrchen (15, 50ml)	Falcon, Heidelberg

2.3 ELISA-Kits

IL-6	R&D Systems, Wiesbaden
IL-10	R&D Systems, Wiesbaden
TNF	R&D Systems, Wiesbaden

2.4 Antikörper

Ratte- α -maus-TNF mAB V1q	(Echtenacher et al. 1990)
-----------------------------------	---------------------------

2.5 Oligodinukleotide

CpG-ODN 1668	Invitrogen GmbH Technologiepark Karlsruhe
--------------	----------------------------------------------

2.6 Puffer und Lösungen

Beschichtungspuffer für ELISA pH 9.2	50mM NaHCO ₃
Blockierlösung für ELISA	0,1% BSA
Blockierlösung für ELISA	10% Magermilchpulver in PBS
PBS pH 7,3	137 mM NaCl
	6,5 mM Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM K ₂ HPO ₄
	2,7 mM KCl

Waschlösung ELISA	0,05 % (v/v) Tween20 in PBS
Trypanblau-Lösung	0,15% Trypanblau 150mM NaCl
Lyselösung für Zytotoxizitäts-Assey	20% Natriumdodecylsulfat in PBS

2.7 Nährmedien und Nährböden

2.7.1 Zellkultur

RPMI 1640-Pulvermedium	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM	Sigma Aldrich, Steinheim

2.7.2 Mikrobiologie

Cetrimid-Agar	Schleicher & Schüll, Dassel
Frischblut-Agar	Schleicher & Schüll, Dassel
LB Medium	GIBCO-BRL, Karlsruhe
XLD-Agar	Schleicher & Schüll, Dassel
Müller Hinton-Agar	Schleicher & Schüll, Dassel
CRYOBANK™	VWR International GmbH, Darmstadt

2.8 Zelllinien

L929	Maus-Fibrosarkomlinie
------	-----------------------

2.9 Zytokine

rhTNF	BASF Bioreserach, Ludwigshafen, Deutschland
-------	------------------------------------------------

2.10 Maus-Stämme

NMRI	Charles River, Sulzfeld
C57BL/6 Wild Typ	Charles River, Sulzfeld und Eigenzucht
C57BL/6 TNFR1 ^{-/-}	(Pfeffer et al. 1993a)

C57BL/6 TNFR2 ^{-/-}	(Erickson et al. 1994a)
C57BL/6 TNF ^{-/-}	(Marino et al. 1997a)
	Heiner Körner, Universität Erlangen
C57BL/6 x SvJ129 Wild Typ	Lothar Hültner GsF, München
C57BL/6 x SvJ129 TNF ^{-/-}	Lothar Hültner GsF, München

2.11 Bakterien

<i>Escherichia coli</i> DH5 α +pucgfp	H.J. Linde, Mikrobiologie Universität Regensburg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 103a	H.J. Linde, Mikrobiologie Universität Regensburg
<i>Listeria monocytogenes</i>	H.J. Linde, Mikrobiologie Universität Regensburg
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i> (ATCC 14028s)	Pettenkofer Institut, München
<i>Staphylococcus aureus</i>	Thomas Hartung Universität Konstanz, Deutschland

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

3.1.1 Induktion einer experimentellen septischen Peritonitis mittels zökaler Ligatur und Punktion (CLP)

Alle chirurgisch/operativen Arbeiten sind unter semisterilen Bedingungen durchgeführt worden. Um Infektionen mit exogenen Erregern zu vermeiden, wurden sämtliche Geräte sorgfältig gereinigt und mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Arbeitsflächen sind mit Isopropanol 70% desinfiziert worden.

3.1.1.1 Anästhesie

Für die Induktion einer experimentellen septische Peritonitis mittels CLP wurden die Tiere mit einer intraperitoneal applizierten Injektion von 10µl/g Maus einer sterilen Lösung aus 15% Ketamin 5% (Ketaminhydrochlorid) und 8% Xylazin 2% (Xylazinhydrochlorid) in PBS anästhesiert .

3.1.1.2 Laparotomie

Nach Feststellung der vollständigen Anästhesie, mittels Drucktest an der Hinterpfote, wurden die Tiere auf den Rücken gelegt und der untere ventrale Bereich des Tieres mit Skinman® soft Händedesinfektionsmittel benetzt und das Fell mittels eines ca. 1cm langen Schnittes entlang der Medianebene aufgeschnitten.

Die Laparotomie erfolgte mittels eines Medianschnittes entlang der Linea alba. Anschließend wurde das Zökum vorsichtig aus der Öffnung gezogen und auf ein zurechtgeschnittenes und desinfiziertes Stück Parafilm® gelegt.

3.1.1.3 Ligatur und Perforation

Die Ligatur des distalen Teiles des Blinddarmes wurde mittels eines Baumwollfadens der Stärke 0,12 mm durchgeführt. Dabei wurde der Verschluss, je nach Intensität der gewünschten Letalität (30%-70%), mit einem doppelten Knoten vorgenommen und die überstehenden Enden des Fadens entfernt.

Die nachfolgende Perforation erfolgte durch einen oder mehrere Einstiche in den abgebundenen Teil des Zökums mit sterilen Kanülen. Je nach gewünschtem Letalitätsgrad sind der benötigte Durchmesser, bzw. die Anzahl der Löcher gewählt worden.

3.1.1.4 Verschluss

Nach dem Rückplazieren des Zökums in das Peritoneum sind Bauchdecke und Fell gemeinsam durch 3-5 Wundklammern 0,5cm verschlossen und die Tiere in frisch eingestreuten Käfigen zurück in den Tierstall verbracht worden.

3.1.2 Induktion einer Primär- und Sekundärinfektion

Primär- und Sekundärinfektionen wurden durch intraperitoneale Applikation von 0,5, bzw. 1,0 ml der jeweiligen Keime in Medium, bzw. PBS induziert. Für die Applikation wurden handelsübliche 2ml-5ml Spritzen mit einer 0,4mm Kanüle verwendet.

3.1.3 Stimulierung zur Bestimmung der Induzierbarkeit der Zytokinproduktion

Die Stimulierung erfolgte durch intravenöse, retro-orbitale Applikation der jeweiligen Lösung. Dabei wurden die Tiere mit Ether anästhesiert und mit handelsüblichen 1ml Spritzen und 0,4mm Kanülen mit jeweils 200µl behandelt.

3.1.4 Serumgewinnung aus Mausblut

Blut aus Mäusen wurde durch retro-orbitales Bluten unter Anästhesie (Diethylether) gewonnen. Wenn der Blutentnahme eine Stimulierung vorausgegangen ist, wurden die Tiere zwischenzeitlich für 90 Minuten wieder in ihre Käfige verbracht. Das Blut wurde 1h bei RT, und anschließend über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert, um vollständige Gerinnung zu gewährleisten. Am darauf folgenden Tag wurde der Blutkuchen für 5 min bei 10 000 U abzentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde abgenommen und in 2 ml Eppendorf Violett bei -20°C gelagert.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Zellkulturbedingungen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden in einer Sterilbank (Laminair Flow) durchgeführt. Alle verwendeten Zelllinien bzw. Primärkulturen wurden in Kulturflaschen oder 6-96-well Zellkulturplatten mit dem angegebenen Medium bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank (Cell Safe) kultiviert. Falls nicht anders angegeben, wurden die Zellen dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:5 geteilt. Medienwechsel oder Waschschrte wurden ausgeführt, indem die Zellen in sterilen Falconröhrchen 5 min bei 1000 bis 1200 rpm zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in der entsprechenden Lösung resuspendiert wurde.

3.2.1.2 Zellkulturmedien

Die verwendete Zelllinie L929 wurde in RPMI 1640 mit 10% FCS und Gentamycin (50 µg/ml) kultiviert.

Die gewonnenen Primärzellen (Peritonealzellen) wurden in DMEM-Medium mit 1% Glucose, 10% FCS und Gentamycin (50 µg/ml) kultiviert.

3.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert werden sollten, wurden zunächst bei 1200 rpm pelletiert und in einer Konzentration von ca. 1×10^6 Zellen/ml in kaltem Einfriermedium (50% RPMI 1640; 40% FCS; 10% Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots zu 1,8ml in Kryo-Röhrchen gefüllt, bei -80°C tiefgefroren und nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

Sollten tiefgefrorene Zellen erneut in Kultur genommen werden, wurde die Zellsuspension aufgetaut, in wenig Medium gewaschen und in frisches Kulturmedium überführt.

3.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um Zellen in einer definierten Zellzahl in die entsprechenden Kulturgefäße einzusäen, bzw. um Gesamtzellzahlen aus Peritoneallavage zu bestimmen, wurde mittels Trypanblau-Ausschlußtest die Anzahl der lebenden Zellen mit Hilfe einer Neubauer-

Zählkammer ermittelt. Dazu wurde eine Zellsuspension in einer sinnvollen (zählbaren) Konzentration mit Trypanblaulösung versetzt. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zahl an lebenden Zellen, die sich nicht durch Trypanblaulösung anfärben ließen, mikroskopisch ermittelt.

Die Zellkonzentration wurde folgendermaßen berechnet:

Anzahl der Zellen in 16 Kleinquadraten x Verdünnungsfaktor = Zellzahl x 10^4 / ml

3.2.3 Mycoplasmen-Test

In regelmäßigen Abständen wurden sämtliche Zelllinien mit Hilfe des Mycoplasma Detection Kits auf einen Mycoplasmenbefall untersucht.

3.2.4 Gewinnung und Kultur primärer Peritoneal- und Peritonealexsudatzellen (PEC)

Für die Gewinnung der Peritoneal- (PC) und Peritonealexsudatzellen (PEC) wurden NMRI, C57BL/6 WT, C57BL/6-TNFR1^{-/-} bzw. C57BL/6-TNFR2^{-/-} Mäuse im Alter von 4-8 Monaten verwendet. Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet, das Fell mit Ethanol (96%) benetzt und nach einem Einschnitt im unteren Bauchbereich durch gegenläufiges Ziehen vom gesamten Rumpfbereich abpräpariert. Zum Auswaschen der Peritonealzellen wurde eine 10ml Spritze mit auf Eis gelagertem Medium und eine 0,9mm Kanüle verwendet. Das Medium wurde zügig mit hohem Druck in das Peritoneum injiziert, anschließend mit den darin befindlichen Zellen möglichst vollständig wieder aufgenommen und ohne Kanüle in 50 ml Falcon®Röhrchen überführt. Im Anschluss sind die Zellen bei 800 rpm 5 Minuten zentrifugiert worden. Der Überstand wurde abgesaugt und die als Pellet abgelagerten Zellen in 1ml frischem Medium resuspendiert und zur Zählung vorbereitet.

3.2.5 Zellpräparationen und Färbungen

3.2.5.1 Zytozentrifugenpräparate

Pro Präparat wurden 100 µl Zellsuspension ($\sim 10^6$ Zellen/ml in Medium mit 10% FCS) 10 min lang bei 700 rpm (Cytospin®-Zentrifuge) auf Objektträger zentrifugiert, über Nacht luftgetrocknet, mit verschiedenen Methoden gefärbt und mit Entellan® eingedeckelt.

3.2.5.2 May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Die Präparate wurden zuerst mit konzentrierter May-Grünwald-Lösung 4 min lang gefärbt, kurz abgetropft und dann für 6 min in Giemsa-Lösung (7% Giemsa in Puffer nach Weise, pH 7,2) gegengefärbt, anschließend 5 min in Weise Puffer gewaschen, an der Luft getrocknet und mit Entellan eingedeckelt.

3.2.5.3 QuickDiff® Färbung

Schnellfärbung für Differentialblutbilder. Die Cytospin® Präparate wurden nach Herstellerangaben fixiert (10x 5s) und in die jeweiligen Farbstofflösungen für den angegebenen Zeitraum getaucht und gefärbt (5s), anschließend mit demineralisiertem Wasser gewaschen, luftgetrocknet und mit Entellan® eingedeckelt.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Allgemeine ELISA Methode

In einem ELISA wird das Antigen entweder direkt an eine Mikrotiterplatte gebunden und über einen Antikörper nachgewiesen, oder man verfährt nach dem so genannten Sandwich-Prinzip.

Eine 96 Loch Mikrotiterplatte wird dazu mit dem jeweiligen „capture“-Antikörper beschichtet und anschließend werden die noch bindungsaktiven Areale durch eine proteinhaltige Pufferlösung (0,1%BSA in PBS) für unspezifische Bindungen blockiert. Nach Inkubation mit der antigenhaltigen Probelösung (Serum), bzw. den jeweiligen Standards und anschließendem, sorgfältigem Waschen der Platte wird das an den „capture“-Antikörper gebundene Antigen mit einem zweiten Antikörper, dem „detection“-Antikörper, nachgewiesen, wobei dieser mit einem Enzym gekoppelt sein kann. Bei unmarkierten „detection“-Antikörpern verwendet man einen dritten Antikörper, der den „detection“-Antikörper erkennt und eine Enzymmarkierung trägt. Am häufigsten werden Antikörper mit den Enzymen Peroxidase (POX), stammt sie aus dem Meerrettich wird sie mit „HRP“ abgekürzt, bzw. alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Biotinylierte Antikörper werden mit einem Streptavidin-POX- oder Streptavidin-AP-Komplex nachgewiesen. Die Menge an gebundenem, enzymmarkiertem Antikörper ist der Menge an gebundenem Antigen proportional und wird über den Umsatz eines geeigneten chromogenen Substrates photometrisch bestimmt.

3.3.2 ELISA zur Quantifizierung von TNF, IL-6 und IL-10

Die Quantifizierung wurde mit den entsprechenden ELISA-Kits nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Bei diesen ELISAs liegt das Sandwich-Prinzip zugrunde. Zur Probenvorbereitung wurde das zuvor gewonnene und bei -20°C gelagerte Serum aufgetaut und pur, bzw. in der erforderlichen Verdünnung verwendet. Zur Entwicklung der ELISAs wurde ABTS gelöst in ABTS Puffer verwendet und die Absorption bei 405 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der zum ELISA-reader zugehörigen SoftMax® Software.

3.3.3 TNF-Zytotoxizitäts-Assay

Um einen konfluenten Zellrasen zu erhalten, wurden $2,5 \times 10^4$ L929-Zellen pro Loch auf eine 96-Loch-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert (Volumen $100\mu\text{l}$). Das Medium wurde abgesaugt und die Proben in einer log₂-Verdünnungsreihe titriert. Als Standard ist ein Zellkulturüberstand von RAW-Zellen bzw. rekombinantes Maus-TNF verwendet worden, wobei das erste Loch eine absolut toxische Menge und das letzte Loch kein TNF enthielt (100% und 0% Wert). Die Randlöcher der Platte enthielten keine Zellen wurden jedoch ebenso wie die anderen behandelt (Mediumkontrolle). Zu den $100\mu\text{l}$ Medium im Loch wurden anschließend $100\mu\text{l}$ Actinomycin-D-haltiges Medium ($4\mu\text{g/ml}$) zugegeben, um die Proteinbiosynthese zu blockieren. Die Platte wurde 24 Stunden inkubiert. Zur Bestimmung der Lebend-Zellzahl wurde dem Kulturmedium $10\mu\text{l}$ der MTT-Stammlösung zugesetzt und für weitere 4 Stunden inkubiert. MTT wird von stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien oxidativ umgesetzt, was zur Bildung eines blauen Farbstoffs führt, dessen Bildung sich somit proportional zur Viabilität verhält. Der Farbstoff bildet Kristalle, die durch Zugabe von $70\mu\text{l}$ einer 20%-igen SDS-Lösung in Lösung gebracht wurden. Die Zugabe von SDS stoppte gleichzeitig die Reaktion, da auch die Zellen lysiert wurden. Die optische Dichte des Reaktionsprodukts wurde bei 540 nm vermessen.

3.3.4 Phagozytose Assay

Für die Bestimmung des Aktivitätszustandes der Peritonealzellen wurden GFP-transfizierte *E. coli* DH5 α , die mit Phenol inaktiviert wurden, verwendet.

1. Opsonisierung der Bakterien

Die Phenol-inaktivierten Bakterien wurden mit einem dreifachen Überschuss von Normalmausserum für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und mit RPMI Medium + 10% FCS auf Gebrauchskonzentration verdünnt (1:6)

2. Inkubation der Zellen mit den opsonierten Bakterien

Die opsonierten Bakterien werden mit der Peritonealzellsuspension 1:10 verdünnt und auf eine Endkonzentration von 10^6 Zellen/well eingestellt. In einer 12 oder 24 well Platte werden die Zellen im Brutschrank bei 37° für die Dauer von 60 Minuten inkubiert.

3. Waschen und Fixieren

Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen, um nicht phagozytierte Bakterien zu entfernen, und mit frisch hergestelltem Paraformaldehyd 4% für 5 Minuten fixiert und anschließend mit PBS überschichtet und bei 4°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

4. Kernfärbung mit DAPI und Analyse im Fluoreszenzmikroskop

3.4 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle verwendeten Tiere waren entsprechend der Haltungsvorschriften untergebracht, hatten einen 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser ad libitum.

Experimente zur Induktion einer septischen Peritonitis wurden den Richtlinien entsprechend an NMRI, C57BL/6, C57BL/6-TNF^{-/-} (Marino et al. 1997a), C57BL/6-TNFR1^{-/-} (Pfeffer et al. 1993b), C57BL/6-TNFR2^{-/-} (Erickson et al. 1994b), Wildtyp C57BL/6xSvJ129 und C57BL/6xSvJ129-TNF^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Die C57BL/6 x SvJ129-TNF^{-/-}-Mäuse mit den zugehörigen Wildtypkontrollen wurden von Dr. Lothar Hültner, Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik der GSF-München, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die C57BL/6-TNF^{-/-} Mäuse mit den zugehörigen Wildtypkontrollen wurden von Dr. Heinrich Körner vom Interdisziplinären Klinischen Forschungszentrum, Nikolaus-Fiebiger Zentrum, der Universität Erlangen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die TNFR1-, bzw. TNFR2-defizienten Mäuse wurden im Tierstall des José-Carreras

Forschungsbaues am Klinikum der Universität Regensburg mit den zugehörigen Kontrollen unter konventionellen Tierstallbedingungen gehalten und gezüchtet. Die Zucht erfolgte, entsprechend den Haltungsvorschriften, unter denselben Bedingungen wie die Haltung.

3.5 Mikrobiologische Methoden

3.5.1 *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* ATCC 14028s (*S.tm.*)

3.5.1.1 Kultur von *Salmonella typhimurium* (*S.tm.*)

Für sämtliche Experimente mit *S.tm.* wurden Aliquots à 1ml verwendet die in LB Medium unter Zusatz von 25% Glycerol bei -80° C gelagert werden.

Nach dem Auftauen wurden die Keime in flüssigem LB Medium unter Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml) in 15 ml Falcon® Röhrchen 24h bei 37° C auf einer Rüttelplatte bei ~200rpm kultiviert, dann in reines LB Medium überimpft und für weitere 24h bei denselben Bedingungen inkubiert. Die Kultur erfolgte in fest verschlossenen Falcon® Röhrchen und somit unter weitgehend anaeroben Bedingungen.

3.5.1.2 Bestimmung der CFU von *Salmonella typhimurium*

Nach photometrischer Bestimmung der ungefähren Zellzahl bei 560nm, sind in log10 Verdünnungsreihen (in großen Volumina; 10ml) die für die Experimente erforderlichen Konzentration hergestellt worden. Von den Dilutionen, die ~10³ bzw. 10² CFU/ml enthalten haben sind jeweils 3 XLD-Nährbodenplatten (Xylose-Lysin-Desoxycholat) mit 100µl Suspension beimpft, und im Brutschrank 24h bei 37°C inkubiert worden. Die exakte Anzahl koloniebildender Einheiten konnte, auf Grund der Schwarzfärbung (Identifikation) der Kolonien, direkt abgelesen werden.

3.5.2 *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a. 103*) and ATCC 27853

3.5.2.1 Kultur von *Pseudomonas aeruginosa*

Für sämtliche Experimente mit *P.a.* wurden Aliquots à 1ml verwendet die in LB Medium unter Zusatz von 25% Glycerol bei -80° C gelagert werden. Nach dem Auftauen wurden die Keime in flüssigem LB Medium in 200 ml Schikanekolben 24h bei 37° C auf einer Rüttelplatte bei ~200rpm kultiviert.

3.5.2.2 Bestimmung der CFU von *Pseudomonas aeruginosa*

Nach photometrischer Bestimmung der ungefähren Zellzahl bei 560nm, sind in log₁₀ Verdünnungsreihen (in großen Volumina; 10ml) die für die Experimente erforderlichen Konzentration hergestellt worden. Von den Dilutionen, die $\sim 10^3$, bzw. 10^2 CFU/ml enthalten haben, sind jeweils 3 Cetrimid-Nährbodenplatten mit 100µl Suspension beimpft, und im Brutschrank 24h bei 37°C inkubiert worden. Die exakte Anzahl Koloniebildender Einheiten wurde direkt abgelesen. Die Identifikation erfolgte mittels DrySlide® Oxidase Test.

3.5.3 *Listeria monocytogenes*

3.5.3.1 Kultur von *Listeria monocytogenes* (*L.m.*)

Für sämtliche Experimente mit *L.m.* wurden Aliquots verwendet die auf CRYOBANK™ Stammhaltungs Kulturmedien für Mikroorganismen bei -80° C gelagert werden. Die Keramikugeln wurden auf Columbia-Nährbodenplatten mit 5% Frischblut vom Schaf verbracht, über den Nährboden gerollt und 24h bebrütet.

3.5.3.2 Bestimmung der CFU von *Listeria monocytogenes*

Durch Abtupfen einzelner Kolonien und Suspension in 0,9% NaCl-Lösung wurden Verdünnungen hergestellt, die in einem ABT Nephelometer auf eine Trübung von 0,5 nach dem MacFarland Index eingestellt worden sind. Dieser Wert entspricht einer Konzentration von 10^8 CFU/ml. Daraus sind in Verdünnungsreihen (1:10), in 2 ml Volumina, die für die Experimente erforderlichen Konzentration hergestellt worden. Von den Dilutionen, die $\sim 10^3$ bzw. 10^2 CFU/ml enthalten haben, sind jeweils 3 Frischblut-Nährbodenplatten mit 100µl Suspension beimpft worden und im Brutschrank 24h bei 37°C inkubiert worden. Die exakte Anzahl Koloniebildender Einheiten wurde direkt abgelesen. Die Identifikation erfolgte mittels β-Hämolyse auf Frischblut-Agar.

3.5.4 Inaktivierung von Keimen

Die Inaktivierung der jeweiligen Keime wurde durch Herstellen einer 1%-igen (V/V) Lösung mit gesättigter, wässriger Phenollösung durchgeführt. Nach Zugabe der Phenollösung und ausreichender Durchmischung der Suspension wurde diese für mindestens 2h unter gelegentlichem, kräftigem Schwenken bei Raumtemperatur

inkubiert. Nach der Inaktivierung sind die „Partikel“ dreimal mit sterilem PBS gewaschen worden und als Aliquots auf definierte Konzentrationen verdünnt und bei -20°C gelagert worden. Die Bestimmung der exakten Keimzahl der ursprünglichen Kultursuspension erfolgte durch Ausplattieren von $100\mu\text{l}$ der adäquaten Verdünnungen der unbehandelten Kultursuspension auf die jeweilig benötigten Nährböden und Auszählen nach 24 h Inkubation bei 37°C . Die Prüfung der Sterilität der inaktivierten Suspension erfolgte durch Ausplattieren von $200\mu\text{l}$ inaktivierter und gewaschener Suspension auf die jeweilig benötigten Nährböden und Überprüfung der Sterilität (kein Wachstum) nach 24 h Inkubation bei 37°C . Für alle Zählungen sind mindestens drei Platten verwendet worden.

3.6 Fluoreszenzmikroskopie

3.6.1 Verwendete Filtersätze

Einstellung	Anregung	Emission	Detektion von
FITC	480 +/- 15 nm BP	535 +/- 20 nm BP	FITC, GFP, YFP
DAPI	360 +/- 20 nm BP	460 +/- 25 nm BP	Dapi, Hoechst 33342

3.6.2 Herstellung der Fixierlösung (Paraformaldehyd 4%)

Da eine Alkoholfixierung für GFP-Analoga nicht geeignet ist, wurde mit einer 4%-igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

30 ml demineralisiertes Wasser wurden auf 65°C erhitzt und nach Zugabe von 2g Paraformaldehyd (Abzug!) tropfenweise mit 10N NaOH versetzt, bis sich die Lösung geklärt hat. Nach Zugabe von 16,6 ml 3xPBS wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Dann wurde die Lösung mit demineralisiertem Wasser auf 50ml eingestellt, aliquotiert und bei -20°C weggefroren.

3.7 Statistik

Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede in Zytokin-Produktionsfähigkeit wurden mit dem Mann-Whitney U Test bestimmt. In Überlebensexperimenten wurden die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier mit dem log-rang Test auf signifikante Unterschiede untersucht.

Ergebnisse

4 Serum-Zytokinspiegel und Zytokin-Produktionsfähigkeit

4.1 Charakterisierung der CLP-Induzierten Immunsuppression anhand der Zytokinprofile

4.1.1 Kinetik der Serum-Zytokinspiegel nach CLP

Um ein Bild über den Verlauf der septischen Peritonitis in dem verwendeten CLP-Modell auf der Ebene der Serum-Zytokinspiegel zu bekommen, wurden Gruppen von Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten operiert. Während der ersten 24 Stunden wurde alle zwei Stunden und während der folgenden 6 Tage alle 24 Stunden Blut abgenommen. Die gewonnenen Seren wurden vereinigt und die TNF, IL-6 und IL-10 Werte bestimmt. Aus dem Verlauf zeigt sich deutlich, dass während der ersten Stunden nach dem Eingriff alle drei Zytokine ein Maximum zwischen vier und acht Stunden aufweisen und danach wieder stark abfallen (Abb. 4-1A). Der weitere Verlauf ist in Abb. 4-1B dargestellt. Dabei ist für TNF ein Maximum an Tag eins mit einem nachfolgenden Absinken bis zu einem Minimum an Tag drei und einem anschließenden Wiederanstieg feststellbar. Die IL-10 Serumspiegel lagen während des gesamten Zeitraumes, mit Ausnahme des 4-Stunden-Wertes, unterhalb der Nachweisgrenze.

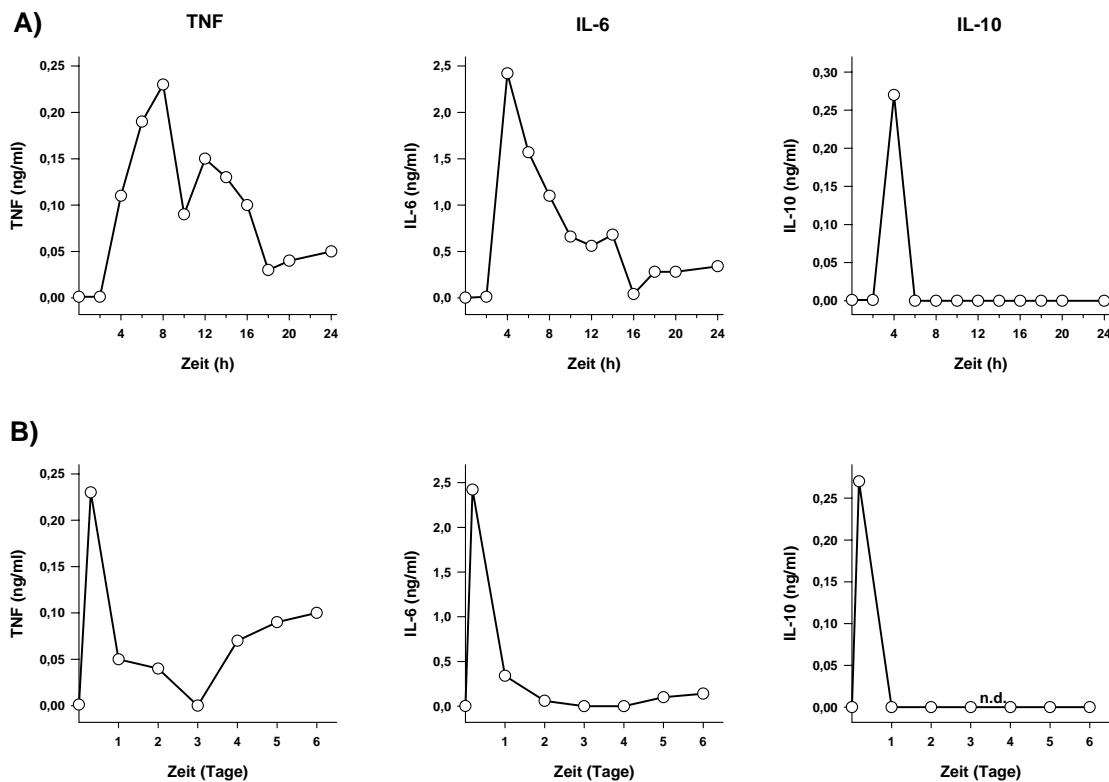


Abb. 4-1 Serum-Zytokinkonzentrationen von Mäusen nach Durchführung einer subletalen CLP. A) während der ersten 24 Stunden n=4 Tiere pro Zeitpunkt. B) während der folgenden 6 Tage n=3 pro Zeitpunkt.

4.1.2 Kinetik der LPS-induzierten Serum-Zytokinspiegel nach CLP

Die Freisetzung von Zytokinen nach LPS-Stimulierung dient in dem vorliegenden Modell als Simulation einer bakteriellen Infektion und soll die Bereitschaft eines Organismus zur Produktion der ausgewählten Zytokine, die am Infektions- und Entzündungsgeschehen beteiligt sind, widerspiegeln (Chensue et al. 1991). Um den zeitlichen Verlauf dieser Zytokin-Produktionsfähigkeit darzustellen, wurde der gleiche Versuchsansatz, wie in 4.1.1 beschrieben, gewählt.

Die Produktionsfähigkeit nach LPS-Stimulierung während der ersten 24 Stunden (Abb. 4-2A) gestaltet sich im Vergleich zu den Serumspiegeln uneinheitlich. Während die TNF-Produktionsfähigkeit kurz nach dem Eingriff deutlich reduziert ist und sich erst nach 14 Stunden wieder erholt, um dann wiederum drastisch abzufallen, ist diejenige von IL-6 und IL-10 in diesem Zeitraum zuerst leicht erhöht und fällt dann ebenfalls ab. Der für diese Arbeit wichtigere Zeitrahmen ist in Abb. 4-2B dargestellt. Die deutlich verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit, vor allem an Tag zwei nach CLP, ist für alle

gemessenen Zytokine evident. Der Zeitpunkt $t=0$ stellt die Werte für die Kontrollen dar, wobei Tiere ohne vorherige CLP die gleiche Menge LPS ($1\mu\text{g}/\text{Tier}$) erhielten und nach 90 Minuten Blut abgenommen wurde.

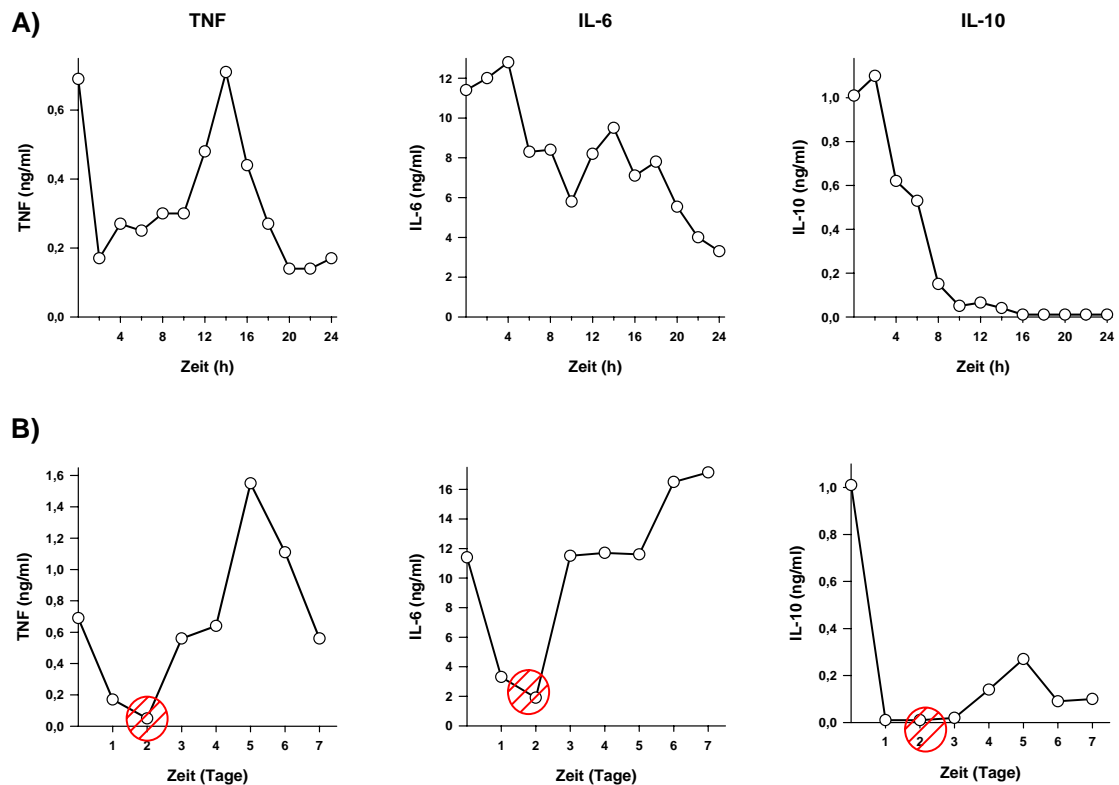


Abb. 4-2 **LPS induzierte Zytokin-Produktionsfähigkeit nach subletaler CLP.**

A) Zytokin-Produktionsfähigkeit zwischen $t=0$ (Kontrolle) und $t=24\text{h}$ $n=3$ pro Zeitpunkt. **B)** Zytokin-Produktionsfähigkeit an Tag eins bis Tag sieben $t=0$ (Kontrolle) $n=3$ pro Gruppe. Kreise markieren Tag 2, der als Zeitpunkt der max. "Immunparalyse" betrachtet wird.

4.1.3 Generalisierte Zytokin-Produktionsfähigkeit

Um allgemeingültigere Aussagen über das Unvermögen eines Organismus mit der Produktion von Entzündungsmediatoren auf einen sekundären Stimulus nach einem primären septischen Ereignis treffen zu können, wurde die Zytokinproduktionsfähigkeit 48 Stunden nach subletaler CLP auf verschiedene Stimuli hin untersucht. In dem Versuchsansatz sind drei bakterielle Substanzen verwendet worden, die von entsprechenden Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) erkannt werden und die stimulierten Zellen veranlassen, Entzündungsmediatoren und Zytokine freizusetzen. Lipopolysaccharid (LPS von *Salmonella abortus equi*, $10\mu\text{g}/\text{Tier}$) wurde als

Modellsubstanz für Gram-negative Keime eingesetzt. Lipoteichonsäure (LTA von *Staphylokokkus aureus*, 60µg/Tier) als Modellsubstanz für Gram-positive Bakterien und CpG-ODN 1668 (40µg/Tier), eine synthetisch hergestellte bakterientypische, unmethylierte Oligodeoxiribonukleotid-Sequenz, von der bekannt ist, dass sie Immunzellen stärker stimuliert als das natürliche Analogon (Lipford et al. 1998; Sparwasser et al. 1998) diene als Modellsubstanz für bakterielle Infektionen allgemein. In Abb. 4-3A sind alle Substanzen vergleichend dargestellt. LPS ist die potenteste der drei untersuchten Substanzen. Der Effekt ist jedoch auch bei den beiden anderen Substanzen, wenn auch z.T. nur als Tendenz, feststellbar. Um dies zu verdeutlichen, sind in Abb. 4-3B nochmals LTA und CpG im Vergleich dargestellt. Im Ergebnis wird deutlich, dass das als "Immunparalyse" bezeichnete Phänomen nicht nur bei der Auseinandersetzung mit Gram-negativen Keimen auftritt, sondern, wenn auch bei weitem nicht so deutlich ausgeprägt, durch andere Pattern Recognition Molecules (PRMs) vermittelt werden kann.

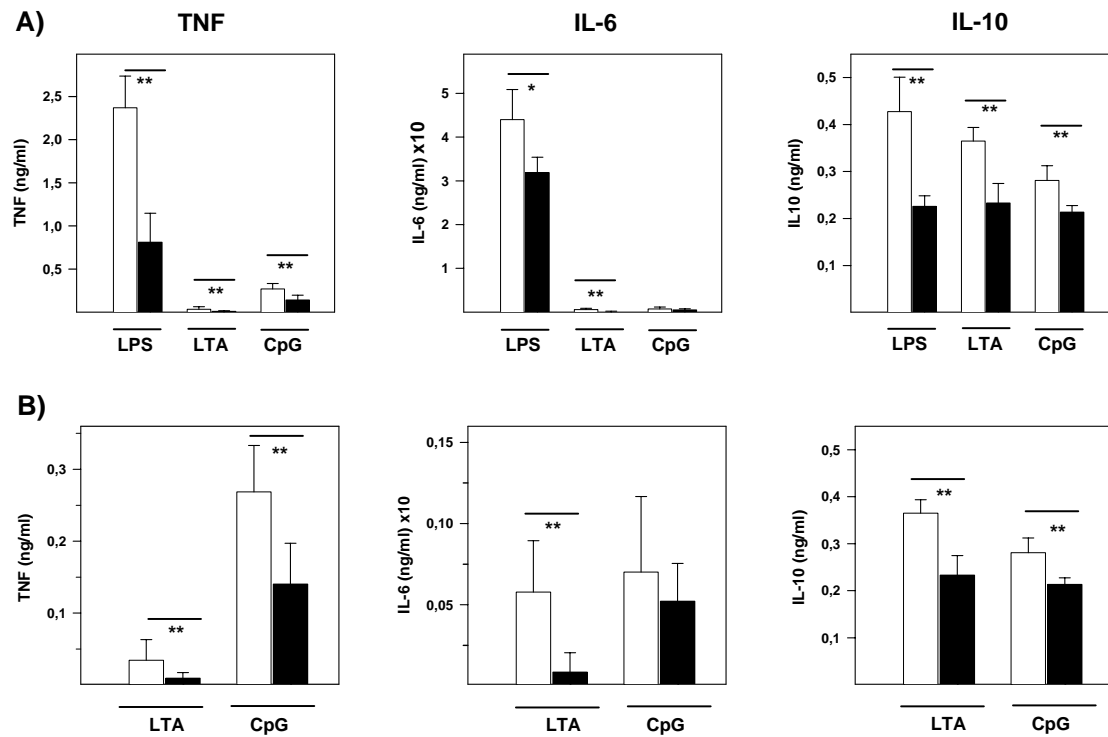


Abb. 4-3 **Zytokin-Produktionsfähigkeit nach Stimulierung mit verschiedenen Bakterien-spezifischen Substanzen.** **A)** Vergleich von LPS (10 μ g/Tier), LTA (60 μ g/Tier) und CpG 1668 (40 μ g/Tier) (□) Kontrolle n=4-5 pro Gruppe; (■) Tiere nach CLP n=4-5 pro Gruppe. **B)** Gleiche Darstellung im direkten Vergleich der beiden schwächer wirksamen Substanzen LTA und CpG 1668 aus den oben abgebildeten Graphen. * p< 0,03; ** p< =0,01

5 Etablieren des "Immunparalyse" Modells in C57BL/6 Mäusen

5.1 Etablieren des CLP Modells in C57BL/6 Mäusen

Das Nagetiermodell zur Induktion einer septischen Peritonitis, die zökale Ligatur und Punction (CLP), das am Institut für Immunologie zur Untersuchung septischer Zustände eingesetzt wurde, war zu Beginn meiner Arbeit für den Maus-Auszuchtstamm NMRI bereits etabliert und wurde auf den C57BL/6-Mausstamm übertragen. Die Etablierung des Modells in diesem Inzuchtstamm war notwendig, da die später zu untersuchenden TNF- und TNF-Rezeptor-defizienten Tiere auf diesen genetischen Hintergrund zurückgezüchtet worden sind.

5.1.1 Letale und subletale CLP in C57BL/6 Mäusen

Zu der letalen sowie der subletalen CLP in C57BL/6 kann gesagt werden, dass eine subletale (Abb. 5-1A) ebenso wie eine letale (Abb. 5-1B) CLP in C57BL/6 Tieren durchgeführt werden kann und dass zwischen männlichen und weiblichen Tieren kein signifikanter Unterschied bezüglich der Sensibilität besteht. Die Prozedur kann nach demselben Modus wie bei NMRI Tieren durchgeführt werden. Eine Modifikation betrifft dabei ausschließlich die Dosierung des Anästhetikums, das bei C57BL/6 um ca. 10% reduziert werden kann.

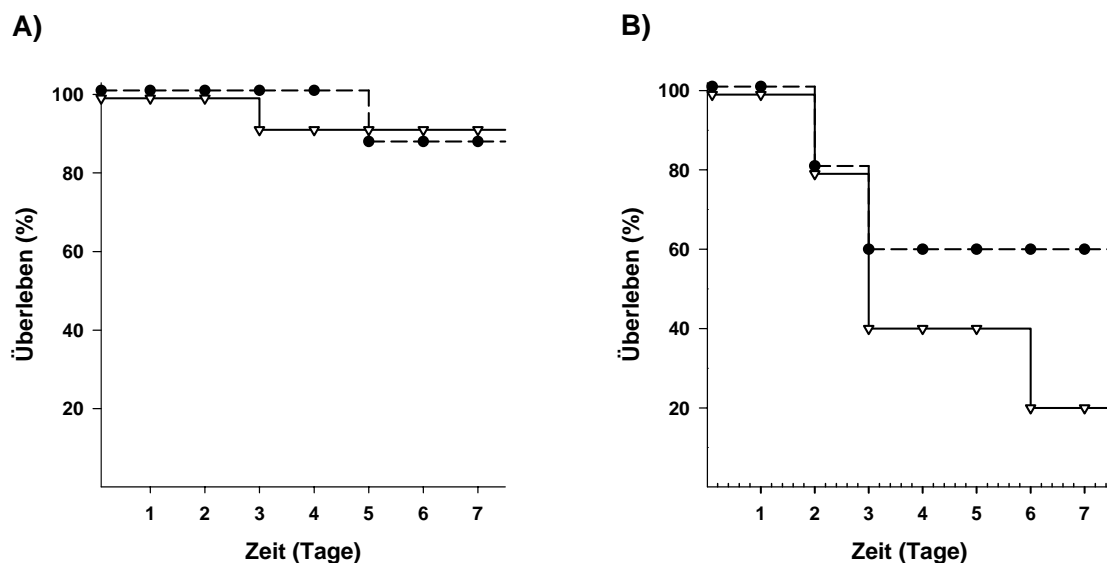


Abb. 5-1 **Letale und subletale CLP in C57BL/6 Mäusen.** **A)** subletal (Ligatur 30%; Ø Punktion 1x0,4mm) (●) weibliche Tiere n=8 (▽) männliche Tiere n=11. **B)** letal (Ligatur 40%; Ø Punktion 1x0,7mm) (▽) männliche Tiere n=5; (●) weibliche Tiere n=5.

5.1.2 Vergleich der Zytokin-Produktionsfähigkeit in NMRI und C57BL/6 Mäusen

Um die Übertragbarkeit der Daten, hinsichtlich der Zytokin-Produktionsfähigkeit, die in NMRI-Mäusen generiert worden waren, im C57BL/6-Stamm zu überprüfen, wurde in C57BL/6- und in NMRI-Mäusen subletale CLP durchgeführt und 48 Stunden nach der CLP LPS-induzierte Zytokinspiegel im Serum gemessen. Abb. 5-2A für NMRI- und Abb. 5-2B für C57BL/6-Mäuse zeigt, dass beide Mausstämme hinsichtlich ihrer Reaktivität auf LPS-induzierte Zytokin-Produktionsfähigkeit ein nahezu identisches Muster aufweisen. Die IL-6-Werte sind in Serum-Pools gemessen worden und weisen daher keine Standardabweichungen auf. Die Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit der Daten ermöglicht a) die Verwertung von Daten, die in Vorversuchen zustande gekommen sind, und b) den Einsatz von NMRI-Mäusen für Versuche bei denen viele Tiere erforderlich sind.

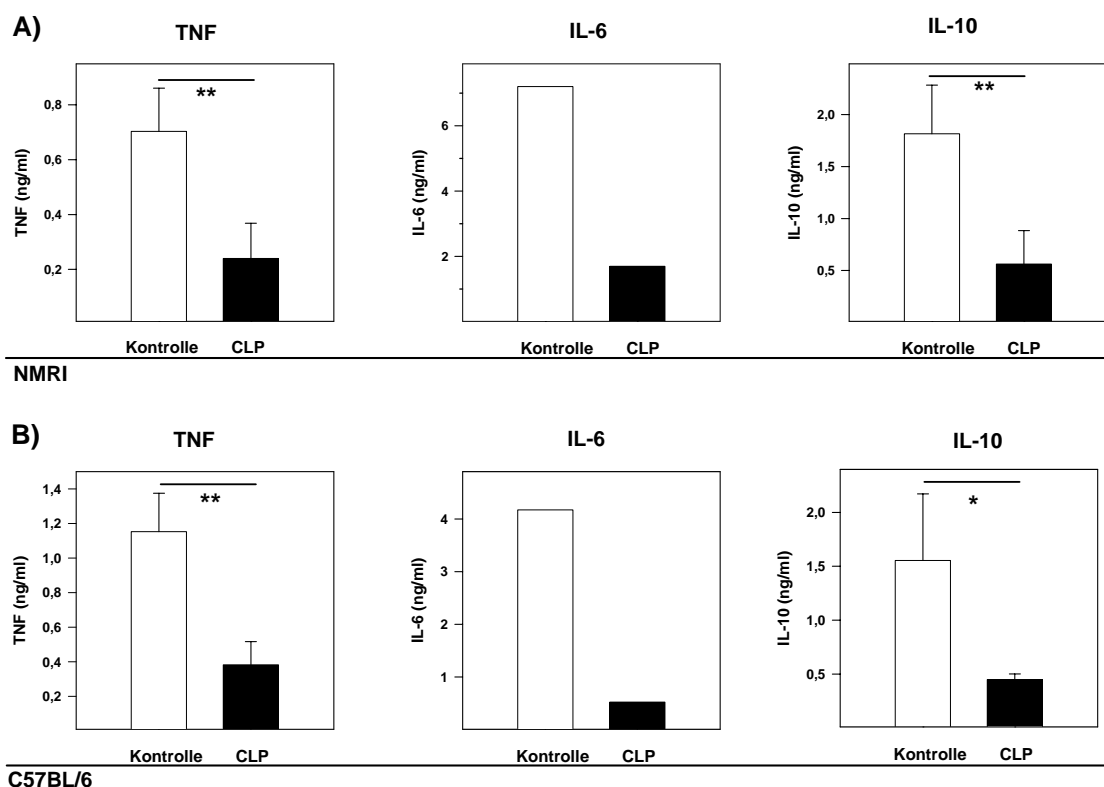


Abb. 5-2 Vergleich der Zytokin-Produktionsfähigkeit in NMRI- und C57BL/6-Mäusen. **A)** NMRI $n \geq 5$ pro Gruppe. **B)** C57BL/6 $n \geq 5$ pro Gruppe. ** $p < 0,008$; * $p < 0,016$

5.2 Bestimmung der LD₅₀ für *Salmonella typhimurium* in C57BL/6 Mäusen

Für eine Superinfektionen zwei Tage nach CLP wurde in den meisten Experimenten *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* (*S.tm.*, ATCC 14028s) verwendet. Bei *S.tm.* handelt es sich um einen Gram-negativen, fakultativ intrazellulär und fakultativ anaerob wachsenden Erreger mit hoher Pathogenität für Mäuse. Auf Grund einer Mutation im *nrampl* Allel, die zum Verlust der Funktionalität eines Transporters für bivalente Kationen auf Makrophagen und neutrophilen Granulozyten geführt hat (Vidal et al. 1996), sind C57BL/6-Mäuse besonders empfindlich für *S.tm.* Infektionen. Daher musste die exakte LD₅₀ in einer Primärinfektion festgestellt werden bevor *S.tm.* in einer Superinfektion eingesetzt werden konnte. Als LD₅₀ für NMRI-Mäuse ist (abhängig von Alter und Gewicht) eine Anzahl zwischen 10⁴ und 10⁵ CFU pro Tier bestimmt worden. In den Experimenten zur Dosisfindung in C57BL/6-Mäusen wurden daher CFU-Werte $\ll 10^4$ zur Induktion einer Primärinfektion eingesetzt. Die Werte, die zur Induktion

einer subletalen Primärinfektion mit *S.tm.* in C57BL/6-Mäusen bestimmt wurden, lagen (ebenfalls abhängig von Alter und Gewicht) bei 5-25 CFU/Tier (Abb. 5-3).

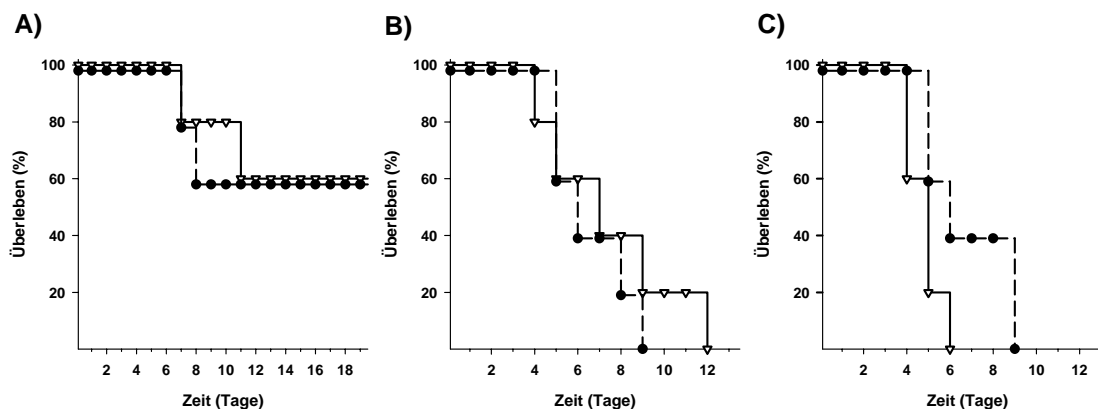


Abb. 5-3 **Primärinfektion mit *S.tm.*** A) 5 CFU/ 500μl (●) weibliche Tiere n=5; (▽) männliche Tiere n=5. B) 50 CFU/ 500μl (●) weibliche Tiere n=5; (▽) männliche Tiere n=5. C) 500 CFU/ 500μl (●) weibliche Tiere n=5; (▽) männliche Tiere n=5.

5.3 "Immunparalyse" in C57BL/6-Mäusen

Die gesteigerte Anfälligkeit für Superinfektionen zwei Tage nach einer subletalen CLP konnte basierend auf den in 5.1 und 5.2 dargestellten Ergebnissen auch für C57BL/6-Mäuse gezeigt werden (Abb. 5-4). Die Tests an beiden Geschlechtern waren notwendig, um festzustellen, ob geschlechtsspezifische Unterschiede bestehen. Die gefundenen Ergebnisse lassen keine relevanten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Tieren erkennen, womit beide Geschlechter für die Versuche eingesetzt werden können. Die Experimente wurden jeweils mit Tieren gleichen Geschlechtes durchgeführt.

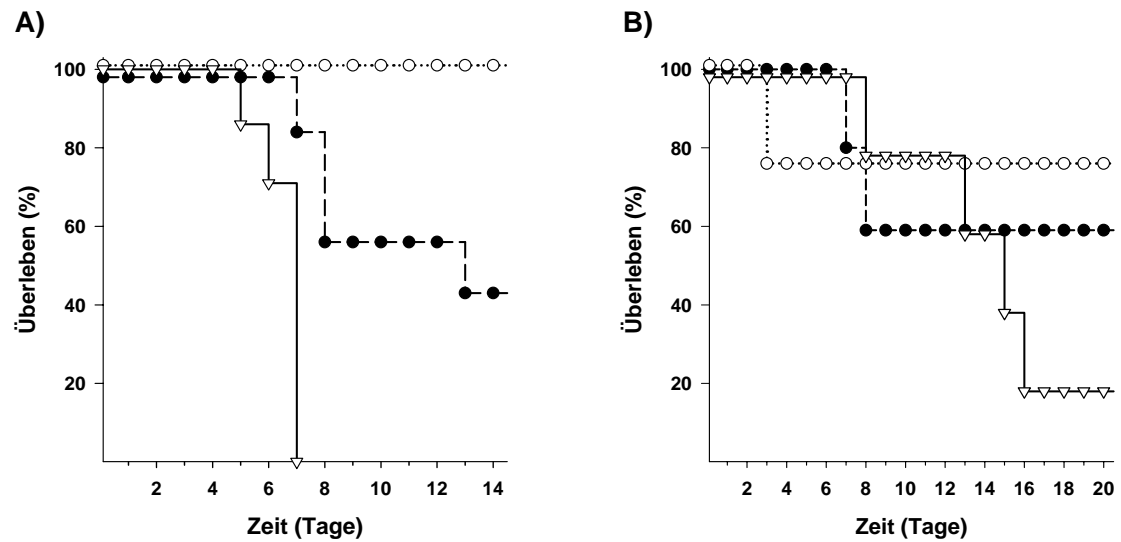


Abb. 5-4 "**Immunparalyse**" in C57BL/6-Mäusen. **A)** männlich; (○) subletale CLP n=7; (●) Infektion mit *S.tm.* 10 CFU/500µl n=7; (▽) subletale CLP + Infektion mit *S.tm.* 10 CFU/500µl nach zwei Tagen n=7. **B)** weiblich; (○) subletale CLP n=4; (●) Infektion mit *S.tm.* 5 CFU/500µl n=5; (▽) subletale CLP + Infektion mit *S.tm.* 5 CFU/500µl nach zwei Tagen n=5

6 CLP in gentechnisch modifizierten Tieren

6.1 Überleben von TNF-, TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen nach CLP

Da TNF eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen spielt und TNF- und TNF-Rezeptor-defiziente Tiere eine generell erhöhte Anfälligkeit für Infektionen aufweisen (Kaufmann 1994; Marino et al. 1997a; Peschon et al. 1998; Pfeffer et al. 1993b), musste die Überlebensfähigkeit der einzelnen Mauslinien in der CLP geklärt werden.

Wie in Abb. 6-1 gezeigt, ist das Überleben einer subletalen CLP dem Wildtyp C57BL/6 in TNFR1-, TNFR2- und TNF-defizienten Mäusen mit dem gleichen genetischen Hintergrund vergleichbar.

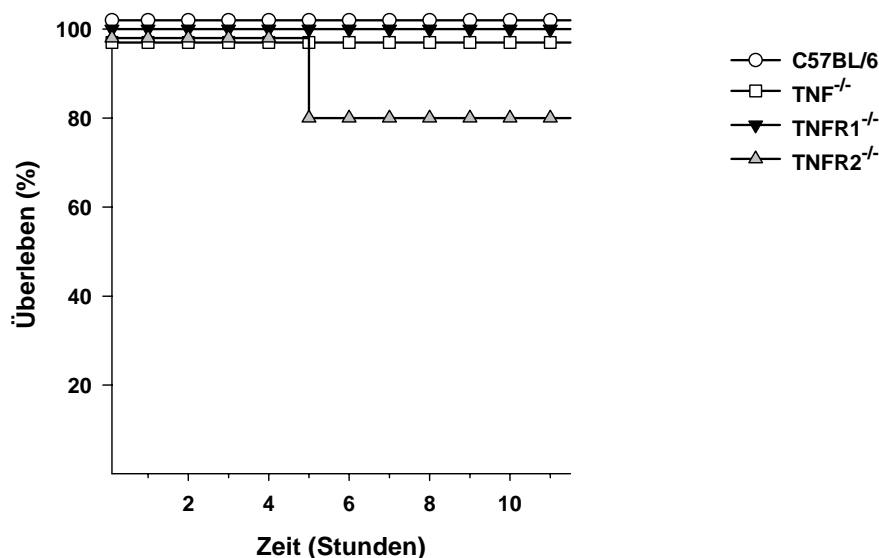


Abb. 6-1 Subletale CLP in TNF-, TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen.

(○) C57BL/6 n=7; (▼) TNFR1^{-/-} n=6; (▲) TNFR2^{-/-} n=5; (□) TNF^{-/-} n=4.

6.2 Zytokin-Produktionsfähigkeit nach CLP in TNF-, TNFR1- und TNFR2 defizienten Mäusen

Nachdem hinsichtlich Überlebensfähigkeit nach einer subletalen CLP die verschiedenen Mauslinien keinen Unterschied aufweisen, wurde in allen drei gentechnisch modifizierten Mauslinien, sowie in den zugehörigen Wildtyp-Stämmen, nach zwei

Tagen die LPS-induzierten Serum-Zytokinspiegel bestimmt. Der Gehalt an TNF, IL-6 und IL-10 wurde in TNFR1- und -2 defizienten Mäusen (Abb. 6-2A), sowie IL-6 und IL-10 in TNF-defizienten Mäusen (Abb. 6-2B) bestimmt. Am zweiten Tag nach CLP waren die Zytokine in allen drei Mauslinien signifikant reduziert. In Abb. 6-2B sind die Einzel-Seren vor der Messung vereinigt worden, daher sind die Werte ohne Standardabweichungen dargestellt.

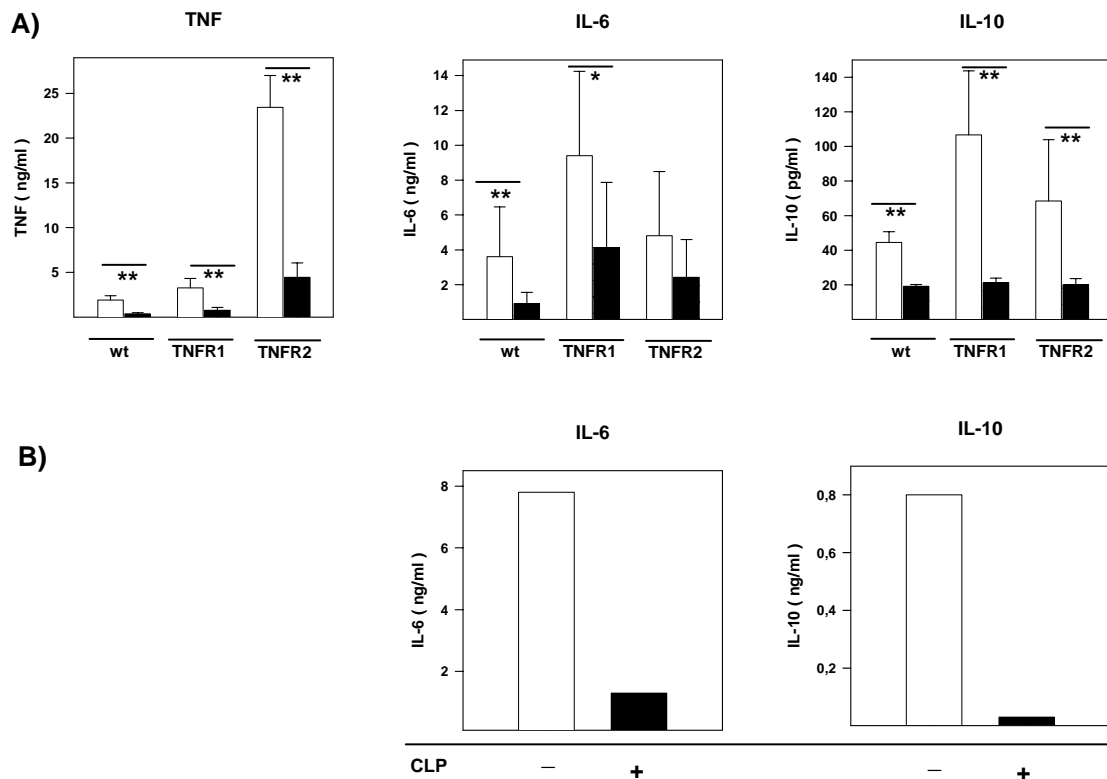


Abb. 6-2 **LPS-induzierte Zytokin-Produktionsfähigkeit 48 Stunden nach CLP.**

A) TNF, IL-6 und IL-10 Serum Konzentrationen in TNFR1- und TNFR2-defizienten Tieren und wt C57BL/6 (□) ohne CLP (n=6-8 pro Gruppe; (■) CLP (n=6-8 pro Gruppe. **B)** IL-6 und IL-10 Serum Konzentrationen in TNF-defizienten und wt C57BL/6 Tieren (□) ohne CLP n=3 pro Gruppe; (■) CLP n=3 pro Gruppe. * p<0,04 ; ** p<0,004.

6.3 Serum-Konzentrationen von LPS-bindendem Protein (LBP)

Um auszuschließen, dass es sich bei dem beobachteten Phänomen der reduzierten Zytokin-Produktionsfähigkeit zwei Tage nach subletaler CLP um einen Verbrauch des Serumproteins LPS-bindendes-Protein (LBP) handelt, was infolge unzureichender Detektions- und Signal-Transduktionsfähigkeit den oben genannten Effekt zur Folge

haben könnte, wurde von wt C57BL/6, TNFR1- und TNFR2-defizienten Tieren zwei Tage nach CLP Serum gewonnen und mittels Sandwich-ELISA auf LBP getestet. Aus den gemessenen Werten wird deutlich, dass der Verbrauch von LPB als Ursache der reduzierten Zytokin-Produktionsfähigkeit nicht in Frage kommt, da, wie in Abb. 6-3 dargestellt die Serumspiegel in allen untersuchten Mauslinien nach CLP deutlich erhöht waren.

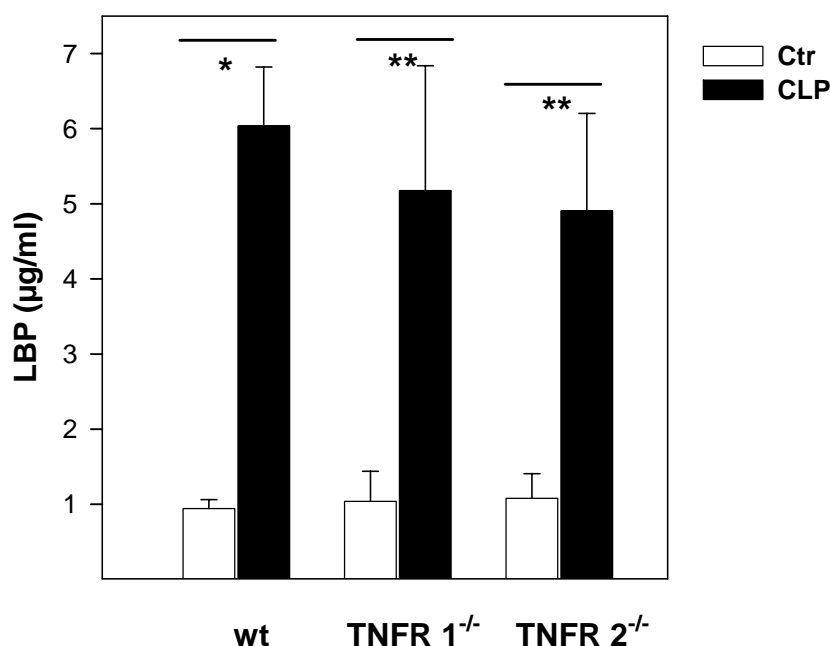


Abb. 6-3 **LBP-Serum-Konzentration.** wt C57BL/6 (□) ohne CLP n=4 pro Gruppe; (■) nach CLP n=5. TNFR1- und TNFR2-defiziente Tiere (□) ohne CLP n=5 pro Gruppe; (■) nach CLP n=6 pro Gruppe. * p < 0,016; ** p < 0,005.

6.4 Primärinfektion mit *S.tm.*

Die Tatsache, dass TNFR1- und TNF-defiziente Mäuse eine erhöhte Mortalitätsrate für bakterielle Infektionen mit diversen Keimen aufweisen, wurde mehrfach beschrieben (Rothe et al. 1993b; Vazquez-Torres et al. 2001) und konnte hier für *S.tm.* bestätigt werden. Für die TNF-defizienten Mäuse auf gemischtem genetischen Hintergrund (Abb. 6-4A) wurden im Experiment $1,25 \times 10^3$ CFU *S.tm.* eingesetzt, da sie durch den SvJ129 Anteil heterozygot für *nramp1* sind und somit die LD₅₀ deutlich höher liegt als bei den Tieren auf reinem C57BL/6 Hintergrund. Die Anzahl CFU in Abb. 6-4B wurde entsprechend den zuvor bestimmten LD₅₀-Werten für den C57BL/6 Stamm eingesetzt

und beträgt in diesem Experiment 10 CFU. In beiden Fällen ist ein besseres Überleben der wt-Mäuse verglichen mit den Gen-defizienten Tieren feststellbar, wenngleich im Fall der TNFR1^{-/-}-Linie kein statistisch signifikanter Unterschied (p>0,09) bestimmt werden konnte. Für die TNFR2-defiziente Zuchtlinie (Abb. 6-4C) fällt dieser Unterschied mit p=0,214 noch geringer aus.

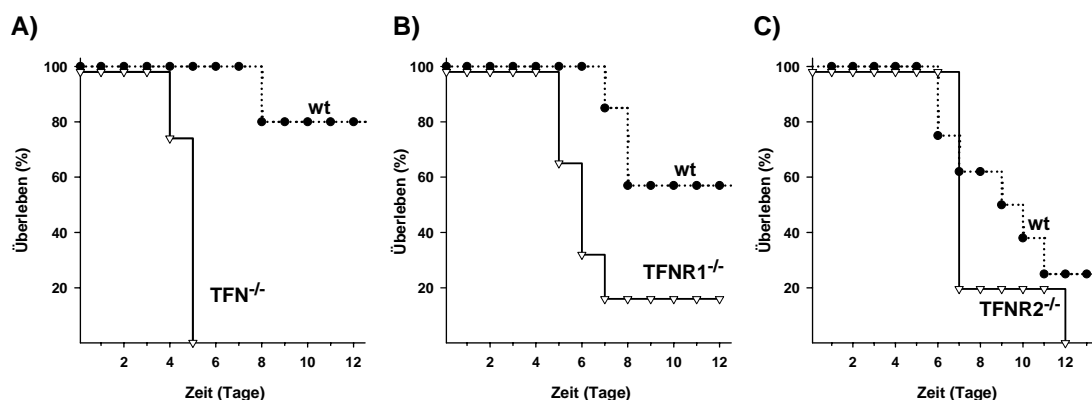


Abb. 6-4 **Primärinfektion mit *S.typhimurium*.** A) TNF-defiziente (▽)(n = 7) und wt SvJ129 x C57BL/6 (●)(n = 5) wurden mit $1,25 \times 10^3$ CFU i.p. infiziert p=0,0018 B) TNFR1^{-/-} (▽)(n = 6) und zugehörige wt C57BL/6 (●)(n = 7) wurden mit 10 CFU i.p. infiziert p= 0,092. C) TNFR2^{-/-} (▽)(n = 5) und zugehörige wt C57BL/6 (●)(n = 8) wurden mit 10 CFU i.p. belastet und die Überlebenszeit bestimmt. p=0,214.

6.5 Bakterielle Superinfektion nach CLP in TNF- und TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen

6.5.1 Sensitivität von TNF-defizienten Mäusen und dem entsprechenden Wildtyp für Superinfektion mit *S.typhimurium*.

Dass eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Superinfektionen mit *S.typhimurium* oder *Listeria monocytogenes* intraperitoneal bzw. *Pseudomonas aeruginosa* intranasal appliziert zwei Tage nach einer subletalen CLP besteht, konnte schon mehrfach für verschiedene Mausstämme gezeigt werden (Echtenacher et al. 2003) und lässt sich auch in C57BL/6-Mäusen für *S.typhimurium* und *Listeria monocytogenes* zeigen. *Pseudomonas aeruginosa* als intranasal applizierter Keim für die Superinfektion konnte in C57BL/6 Mäusen nicht verwendet werden, da schon das zur Applikation erforderliche Flüssigkeitsvolumen den Tod von über 60% der Versuchstiere zur Folge hatte.

Um die Rolle von TNF für Superinfektionen zu untersuchen, wurden Superinfektionsexperimente in TNF-defizienten Mäusen durchgeführt und die

Überlebenszeit bestimmt. Das in Abb. 6-5A dargestellte Ergebnis mit Wildtyp-SvJ129xC57BL/6 entspricht dem in Vorversuchen ermittelten Ergebnis, d.h. einer signifikant verkürzten Überlebens-Wahrscheinlichkeit einer Superinfektion nach vorausgegangener CLP ($p=0,0184$). Im Gegensatz dazu stehen die in Abb. 6-5B dargestellten Daten, bei denen eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit in TNF-defizienten Mäusen nach einer Superinfektion nach CLP gefunden wurde ($p=0,0009$).

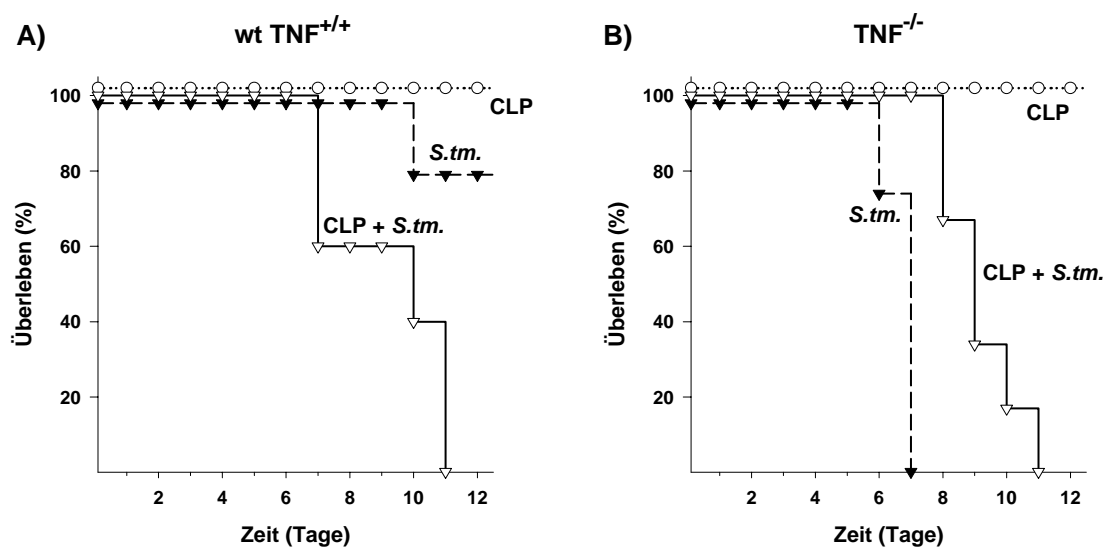


Abb. 6-5 **Sensitivität für Superinfektion mit *S.tm.* in TNF^{+/+} und TNF^{-/-} zwei Tage nach subletaler CLP.** $1,25 \times 10^3$ CFU. (○) CLP; (▽) CLP + *S.tm.*; (▼) nur *S.tm.*. **A)** wt SvJ129 x C57BL/6 n=5 pro Gruppe ; $p=0,0184$. **B)** TNF-defiziente Mäuse n=5 für CLP (○), n=7 für *S.tm.* (▼) und n=6 für CLP + *S.tm.* (▽); $p=0,0009$.

6.5.2 Sensitivität von Mäusen, die mit anti-TNF-Antikörper behandelt worden sind

Da in 6.5.1 in Abwesenheit von TNF Schutz vor einer Superinfektion nach CLP gefunden wurde, kommt diesem Zytokin eine wichtige Rolle in diesem Kontext zu. Im nachfolgenden Experiment ist der Versuch unternommen worden, TNF-Defizienz durch Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen Maus-TNF zu erzeugen. Dazu wurde ein anti-Maus-Antikörper verwendet, der Maus-TNF in vivo sehr effektiv neutralisiert (Echtenacher et al. 1990). Trotz mehrfacher Applikation hoher Dosen dieses Antikörpers konnte keine Wirkung erzielt werden, die die Verhältnisse in Tieren widerspiegelt, bei denen TNF genetisch eliminiert worden ist. Wie in Abb. 6-6

dargestellt, tritt eine "Immunparalyse" in vergleichbarer Weise auf wie dies in wt Tieren der Fall ist. Als Ergebnis muss somit festgestellt werden, dass TNF-Defizienz in diesem Modell nicht durch Applikation von monoklonalen α TNF-Antikörpern generierbar ist.

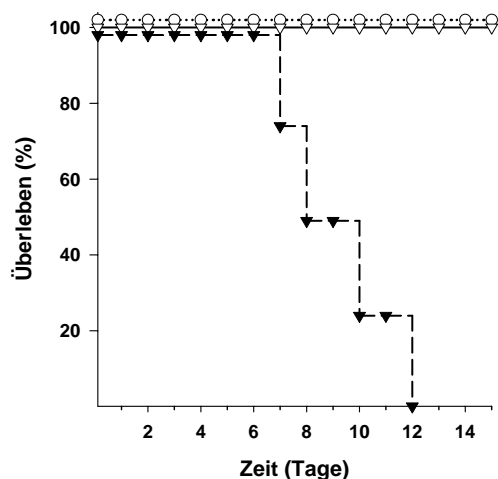


Abb. 6-6 **Sensitivität für Superinfektion mit *S.tm.* nach Behandlung mit anti-Maus-TNF.** Alle Mäuse wurden an Tag 0 mit 25 μ g und an Tag 1 und Tag 2 mit jeweils 20 μ g anti-TNF pro Maus behandelt, sowie mit 10⁴ CFU *S.tm.* i.p. an Tag 2 belastet. (O) CLP Kontrolle n=3 (keine *S.tm.*) . (∇) CLP + *S.tm.* n=4 und (▼) nur *S.tm.* n=4.

6.5.3 Sensitivität von TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen für Superinfektion mit *S.tm.*

Um den in 6.5.1 dargestellten, unerwarteten Befund zu bestätigen und den hauptsächlich dafür verantwortlichen Signalweg zu charakterisieren, wurde das Versuchsprotokoll aus 6.5.1 (Modifikation 10 CFU statt 10³) in den beiden TNFR-defizienten Mauslinien durchgeführt. Im Ergebnis zeigt sich erneut die erhöhte Empfindlichkeit für eine Superinfektion im C57BL/6-Wildtyp (p=0,0019) (Abb. 6-7A). Im Gegensatz dazu ist in den TNFR1-defizienten Mäusen (p=0,047) (Abb. 6-7B) ein besseres Überleben nach CLP, ähnlich wie in TNF-defizienten Mäusen, festzustellen. In Abb. 6-7C ist der Verlauf in TNFR2-defizienten Mäusen dargestellt. Dabei ist weder erhöhte Sensibilität, noch Schutz in der Superinfektion in TNFR2^{-/-} feststellbar. Die erhöhte Mortalitätsrate der TNFR2-defizienten CLP-Gruppe ist in vergleichbaren Experimenten nicht aufgetreten.

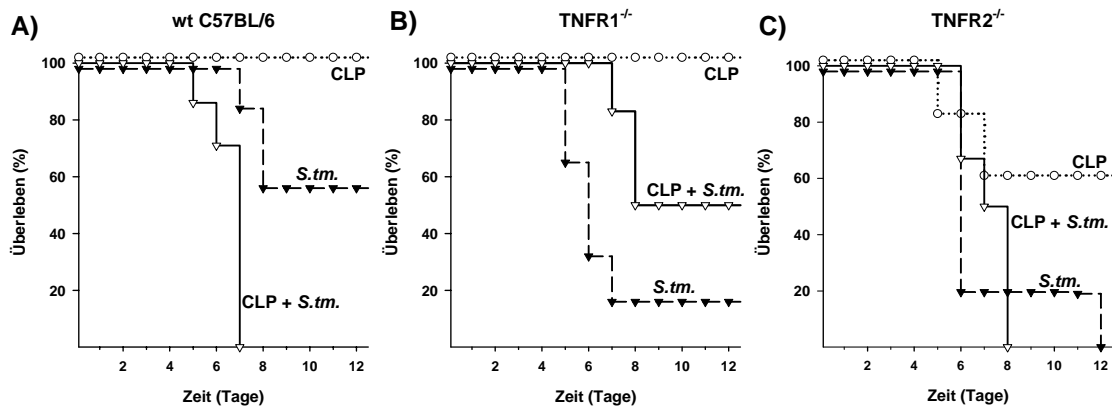


Abb. 6-7 **Empfindlichkeit für Superinfektion mit *S.tm.*** (○)CLP; (▽) CLP + *S.tm.*(10 CFU);(▼) *S.tm.*(10CFU) **A)** wt C57BL/6 CLP und *S.tm.* n=5; CLP + *S.tm.* n=6. p=0,0019. **B)** TNFR1^{-/-} n=6 für alle Gruppen. p=0,047. **C)** TNFR2^{-/-} n=7 für alle Gruppen p=0,945. 10 CFU pro Tier für alle Gruppen.

6.5.4 Sensitivität von TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen für Superinfektion mit *L.monozytogenes*

Die Verwendung von *S.typhimurium* als Belastungskeim für die "Immunparalyse" hat sich wegen der Pathogenität für Mäuse als Infektionsmodell für eine Superinfektion mit Gram-negativen Keimen gut bewährt. Da auch Substanzen wie LTA die Zytokin-Produktionsfähigkeit nach CLP herabsetzen, wie in Abschnitt 4.1.3 gezeigt, liegt die Folgerung nahe, dass der Zustand der erhöhten Sensitivität für Superinfektionen nach CLP ebenso für Gram-positive Keime Gültigkeit hat. Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurde *L.monozytogenes* als Vertreter der Gruppe der Gram-positiven Keime für Superinfektion nach CLP verwendet. Abb. 6-8A zeigt, dass eine gesteigerte Sensitivität für Superinfektionen zwei Tage nach CLP auch bei dem gewählten Gram-positiven Keim, *L.monozytogenes*, auftritt. Die beiden TNF-Rezeptor-defizienten Mauslinien (Abb. 6-8B und C) zeigen im Gegensatz zum *Salmonella*-Modell einen vergleichbaren Verlauf mit erhöhter Empfindlichkeit für *L.monozytogenes* Superinfektionen.

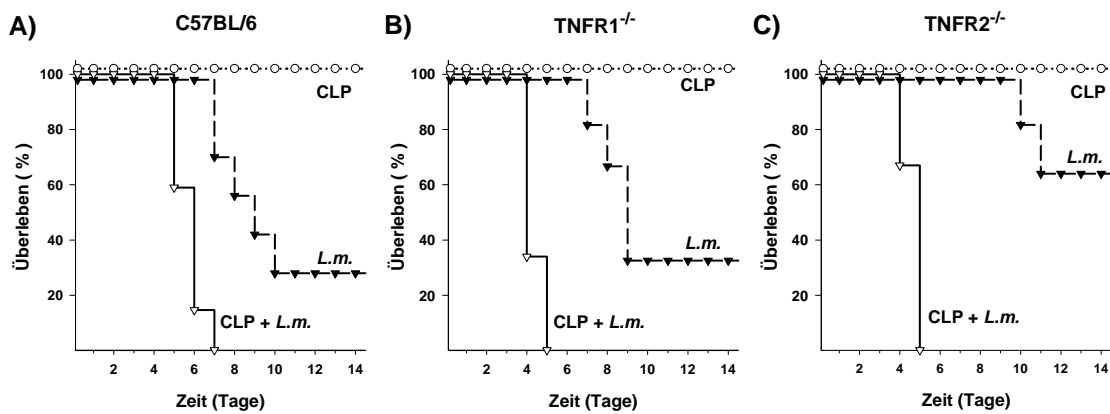


Abb. 6-8 **Empfindlichkeit für Superinfektionen mit *L.m.*** Die Tiere wurden mit einer subletalen CLP vorbehandelt und nach 48 Stunden i.p. mit 2×10^6 CFU *L.monozytogenes* belastet. **A)** wt C57BL/6: (○) CLP-Kontrolle n=6; (▼) *L.monozytogenes* n=7 und (▽) CLP + *L.monozytogenes*. n=7. **B)** TNFR1^{-/-}: (○) CLP-Kontrolle n=5; (▼) *L.monozytogenes* n=6 und (▽) CLP + *L.monozytogenes* n=6. **C)** TNFR2^{-/-}: (○) CLP-Kontrolle n=5; (▼) *L.monozytogenes* n=6 und (▽) CLP + *L.monozytogenes* n=6.

7 Peritonealzellen

Peritonealzellen, die die unmittelbar betroffene Zellpopulation in diesem Modell darstellen, waren Gegenstand der Untersuchungen in den folgenden Experimenten. Dabei wurden die Gesamtzahl, die Zusammensetzung und die Phagozytoseaktivität der Peritonealzellen bestimmt, um zu klären, ob diese Faktoren für die Unterschiede bezüglich der veränderten Empfindlichkeit für Superinfektionen mit *S.tm.* in den verschiedenen Mauslinien in Frage kommen.

7.1 Anzahl von Peritonealzellen zwei Tage nach CLP

Für die Durchführung der folgenden Experimente wurde an TNFR1- und TNFR2-defizienten Tieren eine subletale CLP vorgenommen. Nach 48 Stunden wurde in der Peritoneallavage die Gesamtzahl der Zellen ermittelt. Abb. 7-1A zeigt die Zellzahlen der Peritonealzellen von unbehandelten gesunden Tieren der drei Mauslinien. Die Streuung sowie die Gesamtzahl sind in den einzelnen Mauslinien vergleichbar. Der Zustand 48 Stunden nach CLP ist in Abb. 7-1 B dargestellt und zeigt, dass nach dem Eingriff die Gesamtzellzahl sich etwa um den Faktor 10 erhöht hat, wobei ebenfalls kein Unterschied zwischen den einzelnen Mauslinien feststellbar war.

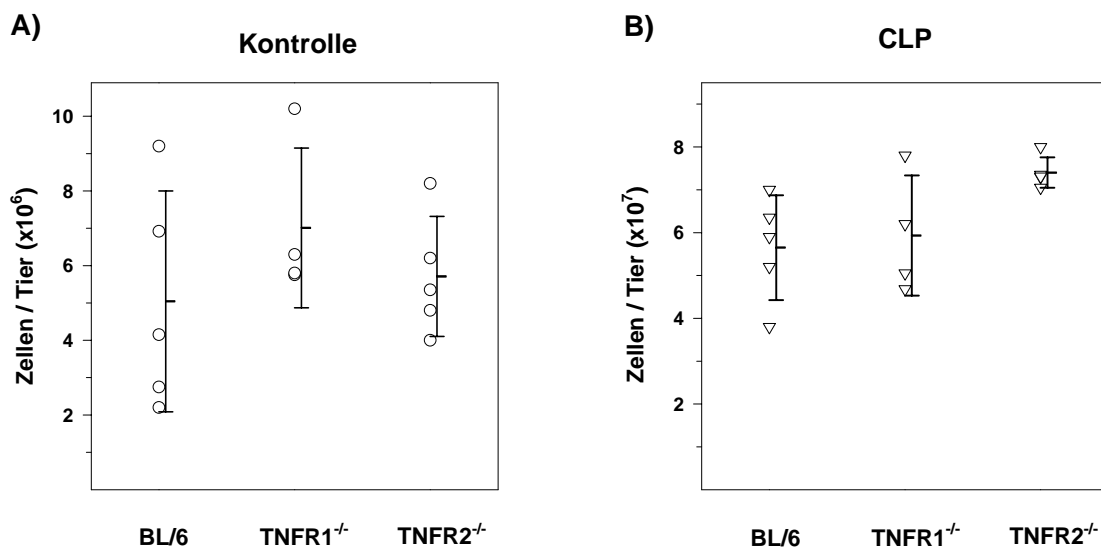


Abb. 7-1 **Gesamtzahl der Peritonealzellen** **A)** unbehandelte Kontrolltiere (○) n=5 für wt C57BL/6 und TNFR2^{-/-} und n=4 für TNFR1^{-/-}. **B)** 48 Stunden nach CLP (▽) n=5 für wt C57BL/6 und TNFR2^{-/-} und n=4 für TNFR1^{-/-}.

7.2 Zusammensetzung der Peritonealzellen nach CLP

Wie in Abb. 7-1 gezeigt, ist der Unterschied nicht in der Gesamtzahl der Peritonealzellen begründet. Daher wurde die Zusammensetzung der Peritonealzellen in den verschiedenen Mauslinien untersucht. In Abb. 7-2 sind die Mittelwerte der einzelnen Zellpopulationen von jeweils 4-5 Tieren pro Gruppe dargestellt. In Tabelle 7-1 sind die Werte und die zugehörigen Standardabweichungen in tabellarischer Form dargestellt. Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass auch die Zusammensetzung der Peritonealzellen in den einzelnen Mauslinien nicht unterschiedlich ist und somit auch nicht für das bessere Überleben nach CLP ursächlich sein kann.

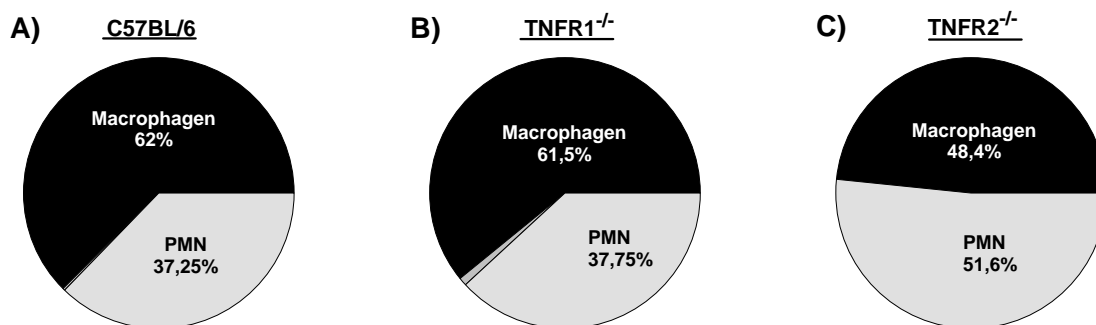


Abb. 7-2 **Zusammensetzung der Zellpopulation im Peritoneum nach CLP.** A), B) und C) Auszählung der Peritoneallavage zwei Tage nach CLP aus Tieren der jeweiligen Mauslinie n= 4-5 pro Gruppe.

Mauslinie	C57BL/6			TNFR1 ^{-/-}			TNFR2 ^{-/-}		
	MΦ	Mast.	PMN	MΦ	Mast.	PMN	MΦ	Mast.	PMN
CLP (%)	62,5	0,25	37,25	61,5	0,75	37,75	48,4	n.d.	51,6
	± 4,34	± 0,5	± 4,34	± 3,1	± 1,5	± 4,34	± 7,83	-	± 7,83

Tabelle 7-1 Darstellung der Mittelwerte der Zellpopulation in den jeweiligen Mauslinien nach CLP n=4-5 pro Gruppe mit zugehörigen Standardabweichungen.

7.3 Phagozytoseaktivität von Peritonealzellen nach CLP

Nachdem die Zellzahl (Abb. 7-1) sowie die Zusammensetzung (Abb. 7-2) keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, wurde die Bestimmung der Phagozytoserate der Peritonealzellen als weitere mögliche Ursache für den oben beschriebenen Effekt untersucht. In Abb. 7-3 ist der prozentuale Anteil Phagozytose-positiver sowie Phagozytose-negativer Peritonealzellen von unbehandelten sowie CLP-behandelten Mäusen dargestellt. In den beiden untersuchten Mauslinien ist nach CLP eine reduzierte Phagozytoserate erkennbar, wohingegen in den Kontrollen die TNFR1-defizienten Tiere eine tendenziell ($p=0,1$) erhöhte Phagozytoserate aufweisen.

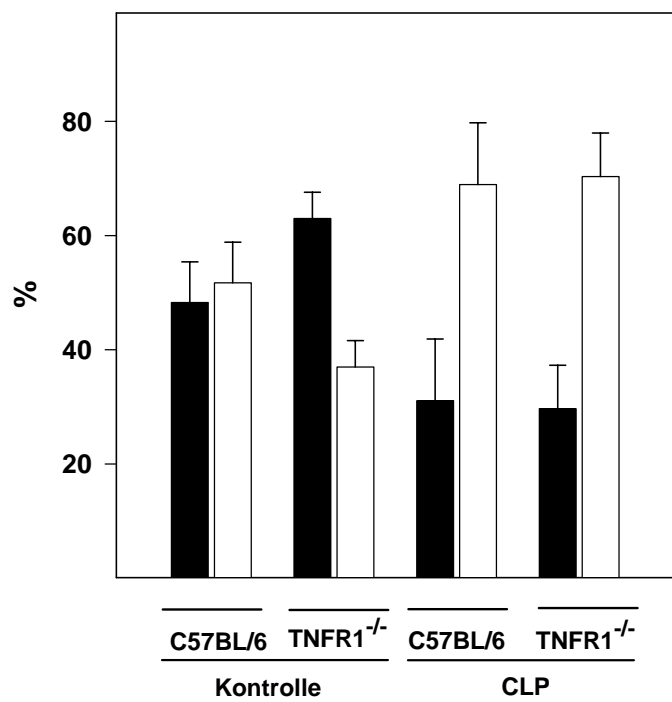


Abb. 7-3 Anzahl der Zellen mit phagozytierten GFP-markierten *E.coli*.

(■) Phagozytose-positive Zellen (n=3) zwei Tage nach CLP

(□) Phagozytose-negative Zellen (n=3) zwei Tage nach CLP.

8 Induktion einer Immunsuppression durch Entzündungs-Stimuli

Zusammenhänge zwischen reduzierter Zytokin-Produktionsfähigkeit und dem beobachteten Phänomen einer erhöhten Empfindlichkeit für bakterielle Superinfektionen sind im Folgenden Abschnitt untersucht worden.

8.1 Bestimmung der Zytokin-Produktionsfähigkeit

8.1.1 Induktion reduzierter Zytokin-Produktionsfähigkeit durch Vorbehandlung mit Phenol-inaktivierten *S.tm.*

Die Zytokin-Produktionsfähigkeit wurde im Serum von Mäusen, 48 Stunden nach i.p. Applikation von Phenol-inaktivierten *S.tm.* gemessen (Abb. 8-1). Eine signifikante Reduktion der LPS induzierten TNF-, IL-6- und IL-10-Zytokin-Produktion als Folge der Behandlung mit abgetöteten *S.tm.* konnte dabei festgestellt werden.

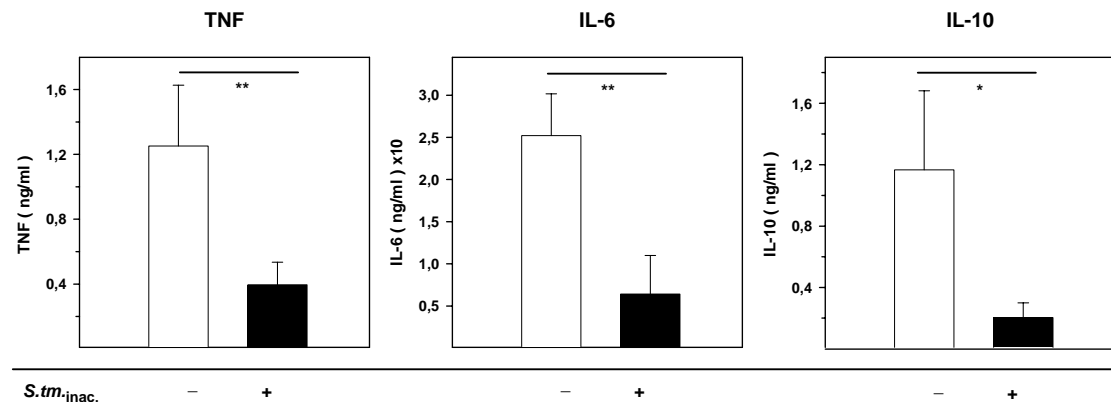


Abb. 8-1 **Reduzierte Zytokin-Produktionsfähigkeit nach Applikation Phenol-inaktiverter *S.tm.*** Mäuse (n=6) wurden mit Phenol-inaktivierten *S.tm.* $2,5 \times 10^9$ CFU_i behandelt und nach 48 Stunden mit LPS stimuliert. Serum-Konzentration TNF, IL-6 und IL-10 in ng/ml. **p<0,004; *p < 0,008.

Die mögliche Freisetzung von TNF nach Applikation von Phenol-inaktivierten *S.tm.* und *Staph.aureus* wurde gemessen, um zu überprüfen, ob dadurch größerer Mengen von TNF systemisch auftreten. Abb. 8-2 zeigt deutlich, dass die Applikation toter Gram-negativer Erreger (*S.tm.*) zu einer Freisetzung von TNF führt, wohingegen der Effekt bei Gram-positiven Erregern (*Staph.aureus*) kaum nachweisbar ist.

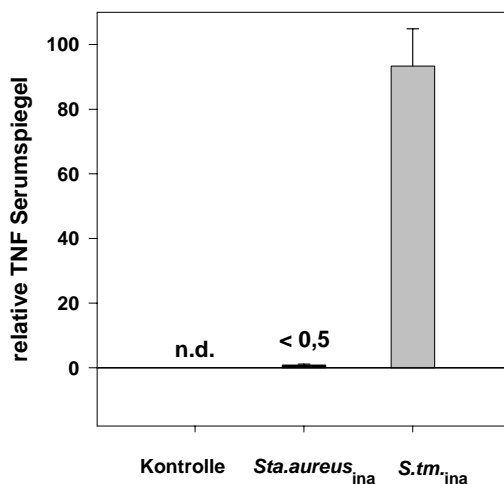


Abb. 8-2 **TNF-Freisetzung nach Applikation von Phenol-inaktivierten Erregern.** Mäuse n=3 wurden mit Phenol-inaktivierten *S.tm.* 5×10^8 CFU_i, Phenol-inaktivierten *Staph.aureus* 5×10^8 CFU_i oder PBS (Kontrolle) behandelt die TNF Serumwerte nach 90 min. gemessen.

8.1.2 Induktion reduzierte Zytokin-Produktionsfähigkeit durch Vorbehandlung mit rhTNF

Die Bestimmung der Zytokin-Produktionsfähigkeit zwei Tage nach Applikation von rekombinatem humanem TNF (rhTNF), das nur über den Maus-TNFR1 wirkt (Lewis et al. 1991b), wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob TNF ursächlich für die Reduktion der Zytokin-Produktionsfähigkeit ist. In Abb. 8-3 ist die Dosis-abhängige Reduktion der LPS-induzierten TNF-, IL-6- und IL-10 Produktion deutlich erkennbar. In der Folge wurde daher die Dosierung von 100µg rhTNF für die weiteren Versuche gewählt. Abb. 8-4 macht in einem weiteren Experiment die signifikanten Unterschiede bezüglich der Produktionskapazität von TNF, IL-6 und IL-10 nach Vorbehandlung mit rhTNF im Vergleich zur PBS-vorbehandelten Kontrolle deutlich.

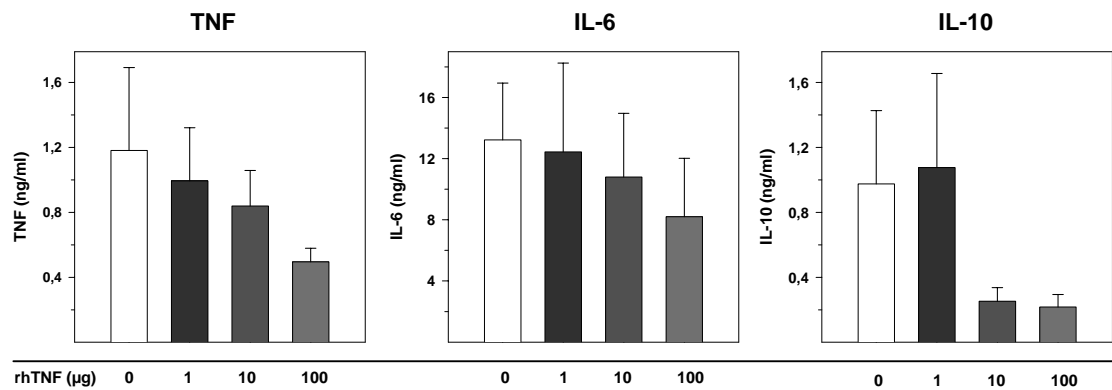


Abb. 8-3 **Reduktion der Zytokin-Produktionsfähigkeit durch rhTNF. Dosis-Wirkungs-Beziehung.** (n=4-5).

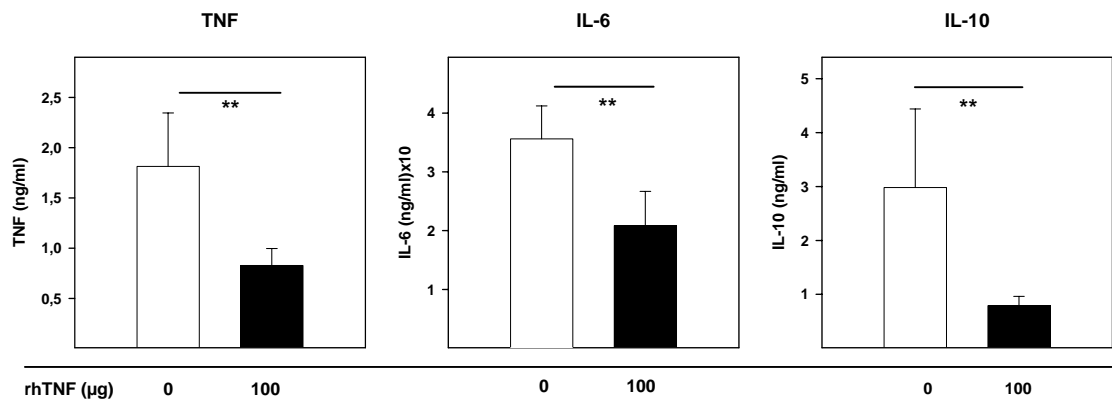


Abb. 8-4 **Zytokin-Produktionsfähigkeit nach Applikation von 100µg rhTNF bzw. PBS.** (n=9-10) . ** p<0,0001.

8.2 Zusammenhang von reduzierter Zytokin-Produktionsfähigkeit und Empfindlichkeit für Superinfektionen

Die Tatsache, dass nach einer Primär-Infektion (z.B. CLP), eine verminderte Bereitschaft zur Zytokinproduktion auf LPS-Stimulierung auftritt, wurde bisher als Ursache für das Unvermögen des betroffenen Organismus, in adäquater Weise auf eine Infektion zu reagieren, betrachtet. Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit ursächlich für die erhöhte Empfindlichkeit für Superinfektionen ist oder ob dieser Befund nur ein Epiphänomen darstellt.

Wie in dem vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, führt eine Behandlung mit Phenol-inaktivierten *S.tm.* (*S.tm*_{ina}) oder rhTNF zu einer verringerten Zytokinproduktionsfähigkeit. Im folgenden Experiment wurde die Empfindlichkeit der Mäuse nach einer derartigen Vorbehandlung und nachfolgender Infektion mit lebenden *S.tm.* untersucht. Überraschenderweise konnte in beiden Fällen eine signifikant längere Überlebenszeit nach der jeweiligen Vor-Behandlung festgestellt werden. Wie in Abb. 8-5A dargestellt überlebten 50% der rhTNF behandelten Tiere die Infektion mit *S.tm.* signifikant länger ($p < 0,001$) als die Tiere der Kontrollgruppe. Die Vorbehandlung mit Phenol-inaktivierten *S.tm.* (Abb. 8-5B) zeigt ebenfalls eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit ($p < 0,001$). Die Ergebnisse verdeutlichen dass eine verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit nicht zwingend mit einer erhöhten Empfindlichkeit für eine Infektion mit *S.tm.* einhergeht. Im Gegenteil wird sogar ein Schutz durch die Vorbehandlung deutlich, was das Postulat der Existenz eines weiteren, von den gemessenen Zytokinen weitgehend unabhängigen Effektes erforderlich macht.

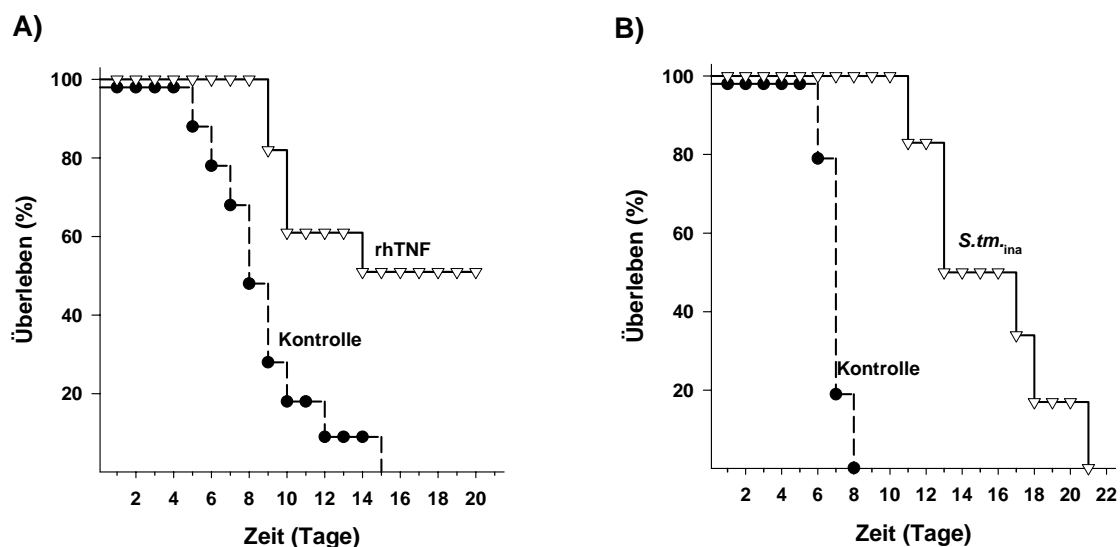


Abb. 8-5 **Verminderte Sensitivität für *S.tm.* Infektion nach Vorbehandlung mit rhTNF oder Phenol-inaktivierten *S.tm.*** . **A)** Vorbehandlung mit rhTNF i.p. 100 μ g pro Tier (∇) (n=10), Kontrolle (\bullet) (n=10) und Infektion mit *S.tm.* (9×10^4 CFU) nach 48 Stunden ; $p < 0,001$. **B)** Vorbehandlung mit Phenol-inaktivierten *S.tm.* i.p. (3×10^9 CFU) (∇) (n=6), Kontrolle (\bullet) (n=5) und Infektion mit (2×10^5 CFU) *S.tm.* nach 48 Stunden $p < 0,001$.

9 CLP und Schutz vor schockähnlichen Zuständen

Da zwei Tage nach einer subletalen CLP in wt Mäusen erniedrigte Zytokin-Produktionsfähigkeit einerseits und erhöhte Empfänglichkeit für Superinfektionen andererseits vorliegt, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob die verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit mit einem Schutz des Organismus einhergeht, wie er in dem Modell der LPS-Toleranz (Freudenberg et al. 1988) auftritt, und inwieweit eine vorausgegangene CLP damit einem LPS-induzierten Schutz vergleichbar ist.

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob trotz einer "Immunparalyse" auch protektive Mechanismen nachweisbar sind.

9.1 LPS-induzierter Schock nach CLP

Die Applikation hoher Dosen von LPS ist in der Lage einen Schock zu induzieren, der innerhalb von 24 Stunden den Tod der Versuchstiere zur Folge hat. Die LD₁₀₀ des in den Versuchen verwendeten LPS von *S. abortus equi* wurde bei einer Dosierung von 400µg-600µg pro Tier je nach Alter und Gewicht gefunden. Den in Abb. 9-1 und Abb. 9-2 A verwendeten C57BL/6-Mäusen mit einem Gewicht von durchschnittlich 22g wurden 500µg LPS pro Tier i.p. verabreicht.

Abb. 9-1 stellt den Temperaturverlauf nach LPS A) ohne und B) mit vorausgegangener CLP dar. Der Temperaturverlauf in der CLP-Gruppe zeigt dabei anfänglich einen steileren Abfall und geht nach 4-5 Stunden in eine Plateauphase über, von der aus ein verlangsamer Temperaturabfall erfolgt, verglichen zum Temperaturverlauf der Kontrollgruppe. In der Kontrolle ist der Verlauf gegensätzlich d.h. nach einem anfänglich langsamem Abfall der Temperatur verläuft die Kurve nach 5-6 Stunden deutlich steiler und die Temperatur nimmt rascher ab.

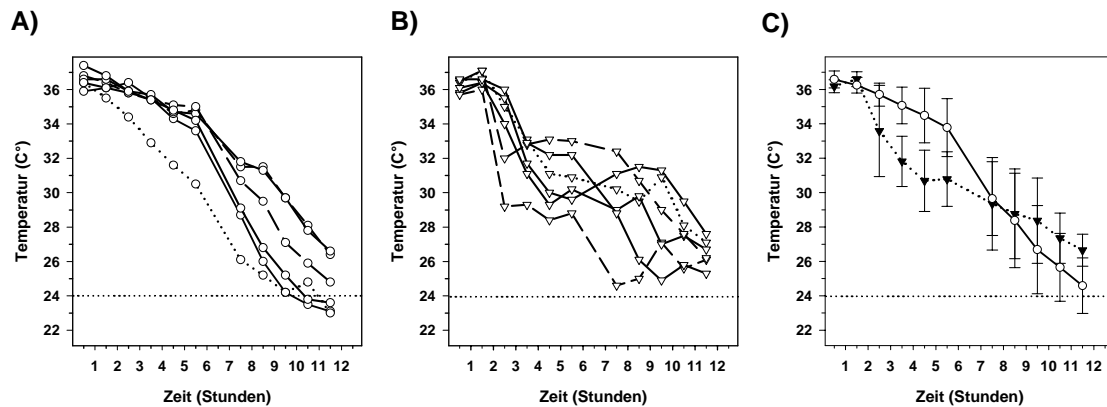


Abb. 9-1 **Temperaturverlauf im LPS-Schock** Temperaturverlauf der mit LPS (*S.a.equi* 500 μ g pro Maus) behandelten Mäuse **A)** ohne CLP (○) (n=6) **B)** 48 Stunden nach subletaler CLP **C)** Mittelwerte der einzelnen Zeitpunkte der beiden (▼) CLP + LPS und (○) nur LPS behandelte Kontrolle.

9.2 Schutz vor durch hoch dosiertes LPS oder D-GalN/LPS induziertem Schock

Trotz Unterschiede hinsichtlich des Temperatur-Kurvenverlaufes besteht kein signifikanter Unterschied in der Überlebensdauer nach Applikation der hohen Dosis LPS zwischen Mäusen mit und ohne vorausgegangene CLP (Abb. 9-2 A).

Das in (Freudenberg et al. 1988) beschriebene Modell, bei dem die Applikation niedriger Dosen LPS zu einem bis zu 48 Stunden dauernden Schutz vor den letalen Auswirkungen einer kombinierten Gabe von D-GalN und LPS führt, wurde als weiteres Schock-Modell untersucht. Um festzustellen, ob nach CLP protektive Mechanismen wirksam sind, wurde Mäusen 48 Stunden nach CLP bzw. einer unbehandelten Kontroll-Gruppe eine Kombination aus 15mg D-GalN und 0,1 μ g LPS (*S.a.equi*) verabreicht und die Überlebenszeit bestimmt (Abb. 9-2 B). Dabei wurde eine Schutzwirkung in der CLP-vorbehandelten Gruppe ermittelt, die statistisch signifikant war (p=0,022).

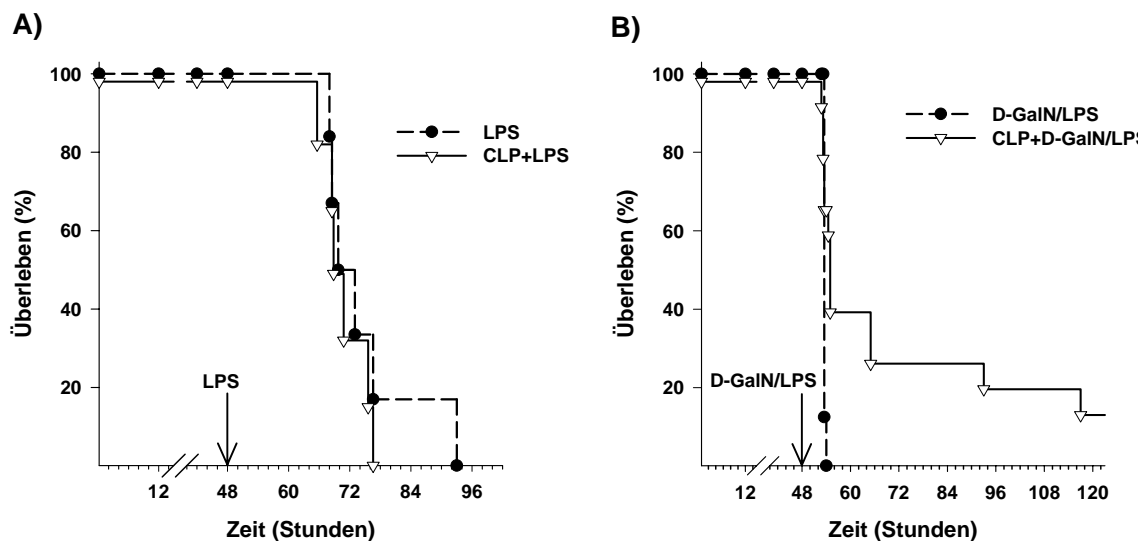


Abb. 9-2 **Überlebenszeit nach Applikation von LPS oder D-GalN/LPS nach CLP**

A) Pro Maus wurde 500 μ g LPS (*S.a. equi*) (i.p.) ohne CLP (●)(n=6) 48 Stunden nach subletaler CLP (▽)(n=6) verabreicht. **B)** Pro Maus wurde 15mg D-GalN + 0,1 μ g LPS (*S.a. equi*) i.p. ohne CLP (●)(n=8) bzw. 48 Stunden nach subletaler CLP (▽)(n=15) verabreicht p=0,022.

9.3 Schutz vor Schock der durch tote Bakterien induziert wurde

Um abzuklären, ob auch protektive Mechanismen gegenüber Phenol-inaktivierten *S.tm.* in hoher Dosierung durch vorangegangene CLP induziert werden, wurden 2,5 x 10¹⁰ tote *S.tm.* an Tag zwei nach CLP bzw. in unbehandelte Tiere injiziert (Abb. 9-3). Auch bei dieser Belastung zeigte sich ein – wenn auch nicht signifikanter – Schutz durch eine vorangegangene CLP.

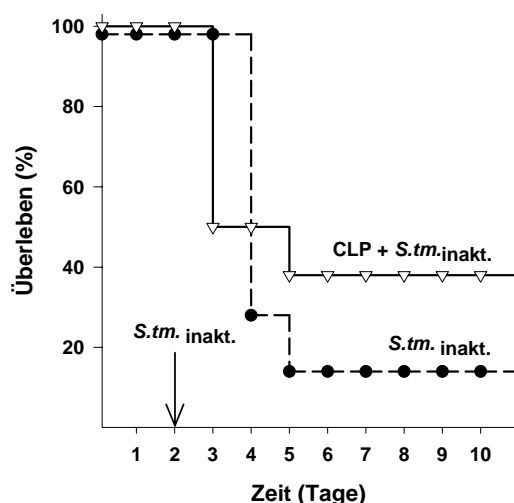


Abb. 9-3 **Überlebenszeit nach Applikation von Phenol-inaktivierten *S.tm.* nach CLP.** Pro Maus wurden $2,5 \times 10^{10}$ tote *S.tm.* (i.p.) ohne CLP (●)(n=8) bzw. 48 Stunden nach subletaler CLP (▽)(n=8) verabreicht p=0,833.

9.4 Schutz vor Schock der durch lebende Bakterien induziert wurde

Da sich aus den vorhergehenden Experimenten Hinweise auf die Aktivierung protektiver Mechanismen ergeben haben, wurden im nachstehenden Versuch lebende Keime in sehr hohen Konzentrationen zur Schockinduktion eingesetzt. Die Tiere wurden einer subletalen CLP unterzogen und zwei Tage danach mit hohen Keimzahlen ($>10^3 \times LD_{100}$) *S.tm.* bzw. ($>10 \times LD_{100}$) *P.aeruginosa* i.p. infiziert, um damit einen schockähnlichen Zustand zu generieren, der über 80% Mortalität in gesunden Tieren im *S.tm.* Modell und 100% Mortalität in gesunden Tieren im *P.aeruginosa* Modell innerhalb der nächsten 24 Stunden zur Folge hatte.

In Abb. 9-4 A wurde gesunden sowie CLP-vorbehandelten Tiere 48 Stunden nach dem Eingriff *S.tm.* (10^8 CFU/Tier) intraperitoneal injiziert. In Abb. 9-4 B wurden die Tiere wie in A vorbehandelt und *P.aeruginosa* (10^7 CFU/Tier) injiziert. In beiden Fällen führte eine vorausgegangene CLP zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit (A p=0,0004 und B p=0,0016), wobei in B alle Tiere mit CLP-Vorbehandlung den gesamten Beobachtungszeitraum überlebten, wohingegen im *S.tm.* Modell die Tiere nur signifikant länger überlebten. Daher kann gesagt werden, dass durch eine vorausgehende Infektion wie CLP ein Status in der Maus erzeugt wird, der vor Schock oder schockähnlichen Zuständen, die durch lebende Bakterien verursacht werden, Schutz bietet.

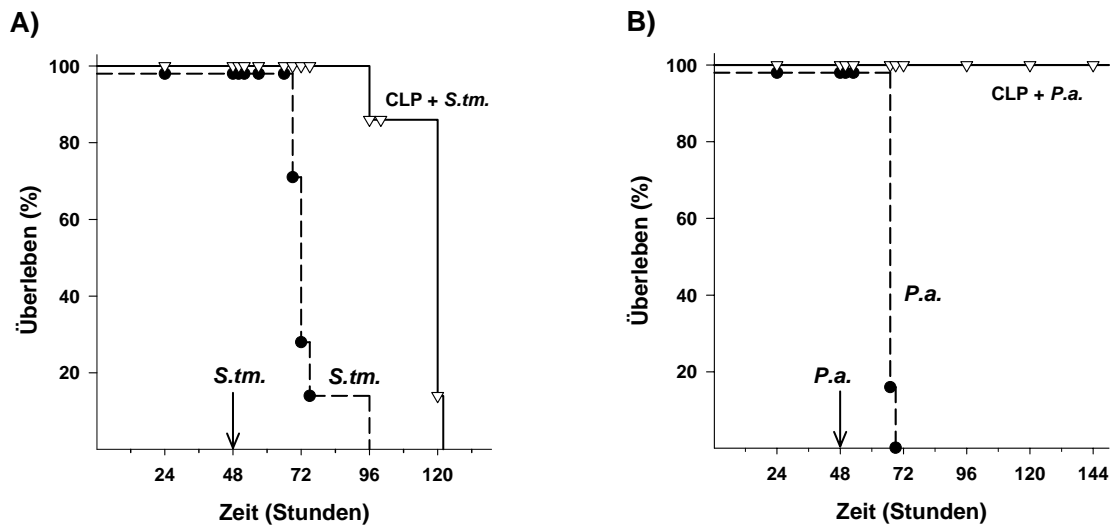


Abb. 9-4 **Überlebenszeit nach Applikation von lebenden *S. tm.* bzw. *P. aeruginosa* nach CLP.** **A)** Pro Maus wurden 10^8 CFU *S. tm.* (i.p.) ohne CLP (●)(n=7) bzw. 48 Stunden nach subletaler CLP (▽) (n=7) injiziert p=0,0004. **B)** Pro Maus wurden 10^7 CFU *P. aeruginosa* (i.p.) ohne CLP (●)(n=6) bzw. 48 Stunden nach subletaler CLP (▽)(n=5) injiziert; p=0,0016.

10 Diskussion

Die Problematik nosokomialer Infektionen in Krankenhäusern im Allgemeinen und auf Intensivstationen im Speziellen stellt eine der großen Herausforderungen in der modernen krankenhausmedizinischen Versorgung dar. Dabei sind Infektionen mit Gram-positiven und Gram-negativen Erregern sowie Mykosen (v.a. Aspergillosen) die am häufigsten vorkommenden Komplikationen im Kontext intensivmedizinischer Betreuung. Die Erforschung der grundlegenden immunologischen Abläufe im Organismus, die im Zusammenhang mit schwerwiegenden Infektionen und septischen Ereignissen stehen, sind somit, neben der Entwicklung neuer antibiotisch wirksamer Substanzen und der Optimierung von Hygieneplänen, der aussichtsreichste Ansatz diese Probleme langfristig in den Griff zu bekommen. Die Aufklärung der Verläufe der Zytokinmuster sowie ihr Ineinandergreifen im Netzwerk und die Rolle der einzelnen Zytokine und deren Rezeptoren stehen dabei an vorderster Stelle. Des Weiteren müssen die genaueren Ursachen untersucht werden, die eine Suppression des Immunsystems bewirken, und deren Korrelation mit den jeweiligen Zytokinprofilen. Ebenso ist es notwendig zu untersuchen, ob es dennoch weiterhin funktionierende, protektive Mechanismen gibt, die gegebenenfalls aktiviert oder verstärkt werden können.

10.1 Zytokinprofile und Zytokin-Produktionsfähigkeit

In der vorliegenden Arbeit sind systemische, im Serum detektierbare Zytokine als Marker herangezogen worden, um anhand ihrer Spiegel und Kinetiken mögliche Ursachen für die Entstehung und den Verlauf des als "Immunparalyse" bezeichneten Phänomens zu untersuchen. Die zwei wichtigsten Vertreter der Gruppe pro-inflammatorischer Zytokine, TNF und IL-6, und das in diesem Kontext suppressorisch agierende IL-10 als Vertreter der Gruppe anti-inflammatorischer Zytokine, sind auf Grund ihrer zentralen Funktionen bei entzündlich/infektiösen Ereignissen ausgewählt worden.

Da bisher wenig Datenmaterial über den Verlauf der Zytokin-Serum-Konzentrationen der o.g. Zytokine nach einer subletalen CLP verfügbar war, wurde zunächst eine Kinetik über die Verläufe der Serum-Konzentrationen in Tieren zu verschiedenen

Zeitpunkten über den Zeitraum von sechs Tagen durchgeführt. Aus den Messungen lässt sich ein weitgehend übereinstimmendes Muster erkennen, bei dem alle gemessenen Zytokine nach einem sehr steilen initialen Anstieg in den ersten 4-8 Stunden in der Folge wieder deutlich absanken und sich am Rande der Nachweisgrenze bewegten. Bei TNF und IL-6 konnte jedoch nach Tag drei wieder ein marginaler Anstieg beobachtet werden, was als Anzeichen für persistierende, immunrelevante Vorgänge gewertet werden kann. Die kontinuierliche Abwesenheit von IL-10 bei diesen Messungen steht in deutlichem Kontrast zu den Kinetiken, wie sie sich in Modellen mit letaler CLP (>90% 2x1mm) (Seki et al. 1998) oder CASP (Maier et al. 2004) darstellen. Das Postulat, dass die persistierend hohen IL-10 Serum-Spiegel Mitverursacher der "Immunparalyse" sind kann somit auch als hinfällig betrachtet werden, da wie im Folgenden noch dargestellt werden wird, der nicht-erhöhte Serum-Spiegel dennoch mit einer gesteigerten Empfindlichkeit einhergeht. Diese Beobachtungen lassen, in Übereinstimmung mit der überwiegenden Mehrzahl der Publikationen, die Schlussfolgerung zu, dass IL-10 zwar durchaus immunsuppressiv in diesem Kontext wirkt, dass dieser Effekt jedoch nicht notwendigerweise auf persistierend hohe IL-10 Serum-Spiegel zurückgeführt werden kann.

Der Verlauf der Serum-Zytokinspiegel lässt somit gewisse Rückschlüsse über den Allgemeinzustand des Organismus und in begrenztem Umfang auch über den Status der Immunabwehr und Abwehrbereitschaft zu. Um konkretere Aussagen über die Abwehrbereitschaft treffen zu können, müssen jedoch nicht nur die vorhandenen Zytokine bestimmt werden, sondern vor allem die Reaktionsbereitschaft des Organismus, mit der er auf eine weitere Belastung mit einem Erreger reagiert.

Die Zytokin-Produktionsfähigkeit nach Stimulierung mit LPS ist ein Modell für die Simulation eines Gram-negativen bakteriellen Infektes und wurde in der vorliegenden Arbeit dazu verwendet, das Ausmaß der Reaktionsbereitschaft des Maus-Organismus mit der Freisetzung von Zytokinen auf eine bakterielle Stimulierung zu reagieren, darzustellen. Dieses Modell muss dabei jedoch als unphysiologisches Phänomen betrachtet werden, da das Erscheinen großer LPS Mengen *in natura* nicht vorkommt, und weil es zu anderen Zytokinprofilen als nach einer CLP (Remick et al. 2000; Villa et al. 1995) oder einer Infektion mit lebenden Bakterien führt. Die eingesetzte Menge von 1µg-10µg LPS von *S. abortus equi* hat sich in diesem Zusammenhang als optimal

erwiesen, um eine deutliche Induktion der Zytokinproduktion zu initiieren, die systemisch messbar ist und mit ~2-20% der letalen Dosis deutlich unterhalb Schock-induzierender Dosen liegt.

Die Profile der LPS-induzierten Zytokinspiegel während der ersten 24 Stunden zeigten im Gegensatz zu den nativen keinen einheitlichen Verlauf, wobei vor allem die Produktionskapazität für TNF deutlich von der für IL-6 und IL-10 abweicht. TNF war unmittelbar nach der CLP nur minimal induzierbar, stieg nach einer Refraktärzeit von 12-14 Stunden kurzfristig wieder an, um dann wieder auf ein sehr niedriges Niveau abzufallen. Der Verlauf der IL-6 Produktionskapazität war demgegenüber durch einen geringen initialen Anstieg nach zwei bzw. vier Stunden gekennzeichnet, der dann abfiel, sich kurzfristig auf mittlerem Niveau stabilisierte und nach 24 Stunden deutlich erniedrigt war. Ähnlich, jedoch durch einen sehr viel steileren Abfall nach geringem Anstieg zum ersten Messzeitpunkt, gestaltete sich der Kurvenverlauf bei IL-10. Längerfristig war nach 48 Stunden für TNF ein Minimalwert erreicht, der dann in den folgenden Tagen wieder auf das Niveau der Kontrollen, und am Tag 5 weiter deutlich anstieg. Ähnlich ist der Verlauf bei IL-6, mit dem Unterschied jedoch, dass die nachfolgende Hyperreaktivität länger anhielt. IL-10 bleibt dagegen über den gesamten Beobachtungszeitraum deutlich unterhalb der Kontrollwerte. Die näheren Umstände, die dieses späte hyper-inflammatorische Phänomen auslösen, bedürfen noch genauere Untersuchung, sind aber nicht Gegenstand dieser Arbeit, und werden somit nur als ein Indiz für die simplifizierte Hypothese gewertet, dass ein Ausschlag in eine Richtung eine Gegenreaktion verursacht, und dass dieser Vorgang nach mehrmaliger Wiederholung vermeintlich zum Einpendeln um den Kontrollwert führt.

Im Ergebnis können somit zwei relevante Befunde aus diesen Experimenten für die vorliegende Arbeit herausgestellt werden: (1) Der Zeitliche Verlauf liefert deutliche Hinweise dafür, dass es auch Mechanismen geben muss, die im Zytokinnetzwerk die Freisetzung von IL-6, IL-10 und anderen Zytokinen unabhängig von TNF induzieren können. Dieses wird auch durch die Bestimmung der Zytokinprofile in TNF-defizienten Tieren (6.2) bestätigt ebenso wie in Beobachtungen von Patienten mit Herz-Kreislauf-Versagen (Cavaillon et al. 2003).

(2) Der Zeitpunkt 48 Stunden nach CLP, zu dem ein nahezu vollständiger Zusammenbruch der Zytokin-Produktionsfähigkeit erkennbar wird, korreliert auch mit

demjenigen einer gesteigerten Empfindlichkeit für bakterielle Superinfektionen mit *S.typhimurium* oder *L.monozytogenes* (Echtenacher et al. 2003).

Da die Anzahl Gram-positiver Sepsisfälle und nosokomialer Infektionen seit den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts, laut einigen Publikationen (Bone 1994; Kengatharan et al. 1998) zugenommen hat, war es folgerichtig, diesen Aspekt im Kontext der "Immunparalyse" einzubeziehen und zu untersuchen, ob das Modell zur Detektion einer verminderten Reaktivität, gemessen an der Zytokin-Produktionsfähigkeit nach Stimulierung mit LPS, auch für Stimulierung mit Zellwandbestandteilen Gram-positiver Erreger und bakterieller DNA (CpG-Motive) Gültigkeit besitzt. Im Hinblick auf eine gesteigerte Prädisposition für Infektionen mit Gram-positiven Keimen war dies bereits gezeigt worden (Echtenacher et al. 2003). Die Ergebnisse aus 4.1.3 lassen klar erkennen, dass die verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit kein Gram-negatives Phänomen ist, sondern, dass Lipoteichonsäure (LTA) als Modellsubstanz für Gram-positive Keime und CpG-ODNs als Modellsubstanz für bakterielle Infektionen im Allgemeinen ebenfalls nicht in der Lage sind, die zum Erliegen gekommene Zytokin-Produktionsfähigkeit 48 Stunden nach einer subletalen CLP wieder zu aktivieren. Anhand dieser Resultate kann man davon ausgehen, dass es sich bei der verminderten Zytokin-Produktionsfähigkeit um ein Ereignis handelt, das nicht auf eine bestimmte Gruppe von Erregern limitiert bleibt, sondern allgemein einen Zustand charakterisiert, in dem ein Organismus eine verminderte Abwehrbereitschaft gegenüber bakteriellen Infektionen aufweist, wofür die reduzierte Zytokin-Produktionsfähigkeit als ein messbarer Indikator herangezogen werden kann.

10.2 Die "Immunparalyse" in C57BL/6 Mäusen

Im Fokus des Interesses dieser Arbeit stand die Interaktion von TNF und den beiden für die Signaltransduktion verantwortlichen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 im Kontext der "Immunparalyse" nach subletaler CLP. Die Rolle von TNF selbst bzw. die des jeweiligen Rezeptors konnte an Hand von Mäusen untersucht werden, bei denen das jeweilige Molekül durch gezielte genetische Rekombination eliminiert worden war. Da diese Mäuse auf den genetischen Hintergrund C57BL/6 zurückgezüchtet worden sind und es sich hierbei um einen Inzuchtstamm handelt, musste zunächst geklärt werden, ob das Modell der CLP auf diesen Stamm übertragbar ist. Von diversen anderen

Inzuchtstämmen ist bekannt, dass sie Mutationen im Genom aufweisen, die Einfluss auf ihre immunologische Kompetenz haben. Bekannte Beispiele hierfür sind BALB/c-Mäuse, die hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber CLP Unterschiede aufweisen (Godshall et al. 2002) aber auch beispielsweise die LPS-Toleranz in C3H/HeJ-Mäusen (Freudenberg et al. 1988) und C57BL/6-Mäusen, die ein nicht funktionsfähiges NRAMP1 Protein (s. unten) exprimieren. Die Überlebensexperimente in 5.1.1 lassen jedoch klar erkennen, dass eine subletale CLP von über 90% der Tiere toleriert wird, was mit der Überlebensrate von NMRI-Mäusen vergleichbar ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Letalität durch Verlängerung des ligierten Abschnittes und einer im Durchmesser vergrößerten Punction auf ca.50% gesteigert werden konnte, wie es in ähnlicher Weise auch für NMRI-Mäuse gezeigt werden konnte.

Die Experimente wurden mit männlichen und weiblichen Tieren durchgeführt, um eventuelle geschlechtsspezifische Unterschiede erkennen zu können (Diodato et al. 2001). Unter den gegebenen Bedingungen kann jedoch für das Modell der subletalen CLP kein Unterschied festgestellt werden. Für die letale CLP ist eine Tendenz in Richtung gesteigerter Sensibilität der männlichen Tiere erkennbar. Der Unterschied, der in der letalen Variante auftritt, ist auch bei NMRI-Mäusen beobachtet worden, kann aber in der vorliegenden Arbeit vernachlässigt werden, da die Gesamtheit der nachfolgenden Experimente auf dem Modell der subletalen CLP basierte. Die Verifizierung der Vergleichbarkeit beider Geschlechter war notwendig, da die im Folgenden verwendeten, genetisch modifizierten Tiere im Tierbereich der Universität Regensburg gezüchtet wurden und daher männliche wie weibliche Tiere zu annähernd gleichen Teilen zur Verfügung standen und somit beide Geschlechter für Experimente genutzt werden konnten. Die einzelnen Experimente sind jedoch jeweils mit Tieren eines Geschlechtes durchgeführt worden, was auch die jeweilig zugehörigen Kontrollen einschließt.

Ein weiterer Aspekt, der die Vergleichbarkeit der beiden Mausstämme in dem Modell bestätigt, ist die Tatsache, dass die relativen Zytokinmuster von NMRI- und C57BL/6-Mäusen 48 Stunden nach subletaler CLP nahezu identisch waren.

Besondere Aufmerksamkeit ist der Bestimmung einer LD₅₀ für die Anzahl koloniebildender Einheiten von *S.typhimurium* zugekommen, da der C57BL/6-Inzuchtstamm eine bekannte Mutation aufweist, die die Bekämpfung und Kontrolle

einer Infektion mit *S.typhimurium* nur sehr eingeschränkt zulässt. Der Grund ist der Austausch einer einzelnen Aminosäure im (Natural Resistance–Associated Macrophage Protein 1) NRAMP1-Protein, einem ~100 kDa integralen Membranprotein (Vidal et al. 1996), das auf Grund seiner Struktur mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer Gruppe von Transporterproteinen mit 12 transmembranären Domänen gehört, die für den protonenabhängigen Transport von bivalenten Kationen, in diesem Fall Magnesium, zuständig sind (Jabado et al. 2000). Das Protein wird vor allem von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildet und es scheint eine Rolle bei der phago-lysosomalen Fusion (de Chastellier et al. 1997) und für die Acidifizierung von Vesikeln (Govoni et al. 1999; Hackam et al. 1998) zu spielen. Die Träger dieser Mutation sind besonders anfällig für Infektionen mit intrazellulär wachsenden Erregern der Gattung *Mycobakterium*, *Salmonella* und *Leishmania* (Vidal et al. 1995). Um ausreichend infektiöse aber dennoch subletale Applikations-Suspensionen herzustellen, war es notwendig bis an die unterste Grenze der Verdünnungsreihe zu gehen und die einzelnen Verdünnungsschritte in vergleichsweise kleinen Schritten und großen Volumina (1:10 in 10ml) durchzuführen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Die Anzahl der Keime, die die oben genannten Bedingungen erfüllt, wurde in Dosis-Effekt-Experimenten (s. 5.2) mit einer alters- und gewichtsabhängigen Varianz zwischen 5 und 25 CFU ermittelt. Dabei waren die Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren vernachlässigbar gering.

Nachdem die Bedingungen für subletale CLP und *S.typhimurium*-Infektion bestimmt waren, ließ sich anschließend auch die gesteigerte Empfindlichkeit für Superinfektionen nach sublethaler CLP in C57BL/6-Mäusen zeigen. Dabei waren, ebenso wie in den vorhergehenden Experimenten, keine geschlechtsspezifischen Unterschiede erkennbar.

Zusammenfassend kann man sagen, dass aufgrund der Ergebnisse eine Übertragung des "Immunparalyse"-Modells auf den C57BL/6-Stamm als zulässig erachtet und mit den oben diskutierten Modifikationen als vergleichbar mit NMRI Tieren angesehen werden kann. Auf dieser Grundlage konnten daher Experimente mit den gentechnisch veränderten Linien mit dem C57BL/6 genetischen Hintergrund durchgeführt werden.

10.3 Die "Immunparalyse" in gentechnisch modifizierten Tieren

10.3.1 Zytokine und Serumproteine

Nachdem die Daten aus den Experimenten in Wildtyp C57BL/6 Mäusen eine Übertragbarkeit des Modells zur Induktion einer polymikrobiellen septischen Peritonitis auf diesen Mausstamm zulassen, musste geklärt werden, ob die genetisch veränderten Maus-Linien ebenfalls in der Lage waren, eine subletale CLP ausreichend lange zu überleben, um nach 48 Stunden die Zytokinspiegel bestimmen und gegebenenfalls Experimente mit *S.typhimurium* Superinfektionen durchführen zu können. Mit allen untersuchten Maus-Linien, in denen genetische Modifikationen vorgenommen worden waren, konnte subletale CLP durchgeführt werden, die mit einer Überlebenszeit von mindestens 8 Tagen als ausreichend für die vorgesehenen Experimente gewertet werden kann. Für TNF-defiziente Tiere, die auf einen gemischten genetischen Hintergrund aus SvJ129 und C57BL/6 zurückgezüchtet worden waren, ist die Datenlage ähnlich. Deutliche Unterschiede im Überleben wurden jedoch für TNF- und TNFR1-defiziente Tiere nach härterer CLP ermittelt, wobei der ligierte Darmabschnitt länger war. TNF- und TNFR1-defiziente Mäuse waren deutlich empfindlicher für die letalen Folgen einer CLP. Dagegen waren bei TNFR2-defizienten Tieren keine Unterschiede zum Wildtyp erkennbar (Echtenacher et al. 2002) (und unpublizierte Daten).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Experimente zur Bestimmung der Zytokinspiegel vorgenommen, um die Rolle von TNF und des jeweiligen Rezeptors auf die Zytokin-Produktionsfähigkeit nach einer subletalen CLP zu untersuchen. Die Ergebnisse aus 6.2 lassen deutlich erkennen, dass die verminderte Fähigkeit Zytokine nach Stimulierung zu produzieren ein Prozess ist, der sowohl bei Funktionalität aller Signalwege und Zytokine erfolgt aber auch in Tieren auftritt, in denen jeweils eine Komponente des TNF-Signalweges eliminiert wurde. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich dabei um einen Vorgang handelt, der auch unabhängig von TNF und den zugehörigen Signalwegen ausgelöst werden kann. Die verminderte Produktionsfähigkeit war zwar in den drei untersuchten Maus-Linien evident, die Linien unterschieden sich aber erheblich in den Mengen an messbarem TNF. Diese Unterschiede sind auf das Fehlen der entsprechenden löslichen TNF-Rezeptoren zurückzuführen, wobei der lösliche TNFR2 (sTNFR2), wie aus zahlreichen Publikationen bekannt und hier durch

die Messung bestätigt, für diesen Effekt die größere Rolle spielt (Männel et al. 2000a; Villa et al. 1995).

Mit den Messungen der LBP-Serumspiegel zwei Tage nach subletaler CLP und ohne vorhergehenden Stimulierung sollte ausgeschlossen werden, 1. dass es sich bei der verminderten Zytokin-Produktionsfähigkeit um ein Phänomen handelt, bei dem ein zentrales Molekül durch Verbrauch eliminiert worden und 2. dass die Empfindlichkeit für Superinfektion mit *S.typhimurium* (s. 6.5.3) nicht durch unterschiedliche Konzentrationen von LBP zustande kommt und dadurch die erneute Anwesenheit eines Erregers vom Organismus nur verzögert wahrgenommen wird. Auf der Basis der in 6.3 dargestellten Ergebnisse, die eine signifikante Erhöhung der LBP-Serumkonzentrationen zwei Tage nach subletaler CLP in den beiden TNFR-defizienten Maus-Linien und im Wildtyp C57BL/6 Stamm gleichermaßen erkennen lassen, kann ein LBP-Mangel als Ursache für die oben aufgeführten Punkte ausgeschlossen werden.

10.3.2 Infektion und Superinfektion mit *S.typhimurium*

Die Beobachtungen über verminderte Überlebensfähigkeit nach Infektionen mit *C. albicans* für TNF-defiziente Tiere (Marino et al. 1997a) und für TNFR1-defiziente Tiere nach Infektionen mit *L.monozytogenes* (Pfeffer et al. 1993b; Rothe et al. 1993b) machte Voruntersuchungen mit Infektionen durch *S.typhimurium* nötig. Zunächst wurde die Belastbarkeit der verschiedenen Maus-Linien im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Infektionen mit *S.typhimurium* zu kontrollieren untersucht. Die Befunde aus 6.4 lassen deutlich erkennen, dass die Abwesenheit von TNF mit einer signifikant gesteigerten Mortalitätsrate einhergeht, was erneut die Bedeutung von TNF in der Infektionsabwehr unterstreicht. Ähnlich, wenn auch nicht so eindeutig, stellte sich die Situation in der TNFR1-defizienten Mauslinie dar. In TNFR2-defizienten Tieren war der Effekt am geringsten ausgeprägt, was einmal mehr den eher supportiven Charakter dieses Rezeptors für den TNFR1 bestätigt. Diese Ergebnisse stehen in einem gewissen Gegensatz zu der These des „Kartenhaus“-Modells (Bernheiden et al. 2001), die besagt, dass bereits die Abwesenheit eines einzigen Resistenz-Faktors des Wirtes zum völligen Zusammenbruch des gesamten Abwehrsystems führen kann. Da in den Maus-Linien auf C57BL/6-Hintergrund sowohl NRAMP1 als auch der jeweilige TNF-Rezeptor nicht vorhanden ist, weisen die Tiere zwar eine deutlich gesteigerte Mortalitätsrate nach

härterer CLP oder Infektion mit *S.typhimurium* auf, während die Wildtyp C57BL/6-Tiere jedoch durchaus in der Lage sind, eine derartige Infektion unter Kontrolle zu bringen. Dies kann als Indiz für „salvage pathways“ gewertet werden, bei denen die ausgefallenen Funktionen durch andere Mechanismen kompensiert werden.

Als Ergebnis der bisherigen Experimente mit den gentechnisch modifizierten Tieren kann somit Folgendes festgehalten werden: 1. TNF- und TNFR1-defiziente Tiere waren in der Lage, eine subletal durchgeführte CLP länger als eine Woche zu überleben. Bei Durchführung einer härteren CLP waren sie jedoch deutlich empfindlicher. 2. Die Fähigkeit Zytokine zwei Tage nach CLP als Reaktion auf eine LPS-Stimulierung zu produzieren, war in den jeweiligen Maus-Linien, dem Wildtyp vergleichbar, reduziert. 3. TNF- und TNFR1-defiziente Tiere waren erwartungsgemäß wesentlich anfälliger für Infektionen mit *S.typhimurium* als dies Wildtyp-C57BL/6-Tiere sind.

Anhand dieser Befunde hätte man für TNF- und TNFR1-defiziente Tiere eine deutlich gesteigerte Mortalitätsrate nach Superinfektion mit *S.typhimurium* zum Zeitpunkt der "Immunparalyse" erwarten können. Die Ergebnisse aus 6.5.1 zeigen jedoch das exakte Gegenteil, nämlich eine Verlängerung der Überlebenszeit von TNF-defizienten Tieren nach subletaler CLP mit nachfolgender Superinfektion mit *S.typhimurium* im Vergleich zu TNF-defizienten Tieren an denen keine CLP durchgeführt wurde. Dieser Befund weist auf eine Rolle von TNF bei der Entstehung der "Immunparalyse" hin.

Versuche, TNF-defiziente Tiere durch Applikation von monoklonalen α mTNF Antikörpern zu erzeugen, um damit den Befund aus 6.5.1 (keine IP in TNF^{-/-}) zu bestätigen, waren nicht erfolgreich, da durch diese Behandlung keine Veränderung erreicht werden konnte (Abb. 6-6). Die Ursachen hierfür könnten eine unvollständige Neutralisierung von endogenem TNF sein.

Um diesen Effekt näher zu charakterisieren, wurden Experimente auch in den beiden TNF-Rezeptor-defizienten Maus-Linien durchgeführt. Die Resultate dieser Experimente, (6.5.3) sind Belege dafür, dass TNF über den TNFR1 wirkt und so für diesen Effekt verantwortlich ist und der TNFR2 hierbei nur eine unterstützende Funktion hat.

Die Übertragbarkeit des "Immunparalyse"-Modells auf Gram-positive Keime, hinsichtlich der Empfindlichkeit für bakterielle Infektionen konnte am Modell von

L.monozytogenes gezeigt werden. Die Ergebnisse zeigen eine verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit nach Stimulierung mit LTA. Das Ausbleiben einer "Immunparalyse" in TNFR2-defizienten Mäusen und eine Verlängerung der Überlebenszeit in TNFR1-defizienten Mäusen, wie im *Salmonella*-Modell gefunden, konnte für das Gram-positive Modell mit *L.monozytogenes* nicht bestätigt werden, da die beiden TNF-Rezeptor-defizienten Maus-Linien keinen Unterschied zum Wildtyp aufwiesen. Die Übertragbarkeit des Modells der "Immunparalyse" auf andere Erreger als *S.typhimurium* ist demnach nicht ohne Einschränkung möglich. Vor allem für den hier verwendeten Erreger *L.monozytogenes* wurden im Zusammenhang mit einem therapeutischen Einsatz von rhTNF bereits das paradoxe Phänomen beschrieben, dass die Applikation von rhTNF, was zu einer Verlängerung der Überlebenszeit bei Superinfektion mit *S.typhimurium* führte, für *L.monozytogenes* das Gegenteil bewirkte (Echtenacher et al. 2003). Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung ist die unterschiedliche Überlebensstrategie der verschiedenen Keime innerhalb der Makrophagen.

Zusammenfassend können zum Thema "Immunparalyse" in gentechnisch modifizierten Tieren folgende Ergebnisse festgehalten werden: 1. Eine subletale CLP (Ligatur: 30%; Punktion: 1x0,4 mm) ist in allen untersuchten Maus-Linien durchführbar und ein ausreichend langes Überleben ist gewährleistet. Für eine härtere CLP (Ligatur: 50%; Punktion 0,4 mm) wiesen TNF- und TNFR1-defiziente Tiere im Vergleich zum Wildtyp jedoch eine deutlich erhöhte Mortalitätsrate auf. 2. Die Anfälligkeit für Infektionen mit *S.typhimurium* war in beiden Maus-Linien signifikant erhöht. 3. Im Hinblick auf Zytokin-Produktionsfähigkeit nach Stimulierung mit LPS reagierten alle untersuchten Maus-Linien weitgehend dem Wildtyp vergleichbar d.h. es kam zu einer signifikanten Reduktion der Zytokin-Produktionsfähigkeit von TNF, IL-6 und IL-10 in den Rezeptor-defizienten Linien und zu einer Reduktion von IL-6 und IL-10 in der TNF-defizienten Linie. 4. Trotz der gesteigerten Empfindlichkeit, sowohl für die polymikrobielle Infektionen durch CLP als auch für Infektionen mit *S.typhimurium* zeigten TNF- und TNFR1-defiziente Tiere keine gesteigerte Empfindlichkeit für eine Superinfektion mit *S.typhimurium* zwei Tage nach subletaler CLP, sondern eine Verlängerung der Überlebenszeit. 5. TNFR2-defiziente Tiere verhielten sich hinsichtlich der Zytokin-Produktionsfähigkeit zwei Tage nach CLP, wie Wildtyp-

Mäuse, ansonsten zeigten sie eine Empfindlichkeit die zwischen Wildtyp-Tieren und TNF- und TNFR1-defizienten Tieren liegt.

10.4 Mögliche Faktoren und Ursachen der "Immunparalyse" und ihr Ausbleiben in TNF- und TNFR1-defizienten Tieren

10.4.1 Die Rolle der Peritonealexudatzellen (PEC)

Auf Grund der Tatsache, dass in den gentechnisch modifizierten Tieren eine verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit an Tag zwei nach CLP und nach LPS-Stimulierung auftrat, während eine Verlängerung der Überlebenszeit nach einer intraperitoneal-induzierten Superinfektion mit *S.typhimurium* nur in TNF- und TNFR1-defizienten Mäusen zu beobachten war, wurde das betroffene Kompartiment, das Peritoneum und die darin befindlichen Zellen, weiter untersucht. Hierfür wurde die Anzahl (7.1) und Zusammensetzung (7.2) sowie der Aktivitätszustand (7.3) untersucht. Die Bestimmungen der Gesamtzellzahlen haben dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen den jeweiligen Maus-Linien erkennen lassen. In allen untersuchten Tieren verursachte eine subletale CLP einen starken Influx von Granulozyten und Monozyten, der auch zwei Tage nach dem Eingriff noch deutlich war. Da in dieser Hinsicht keine Unterschiede zwischen den Maus-Linien bestanden, kann dieser Faktor als Ursache für das unterschiedliche Verhalten ausgeschlossen werden.

Unterschiede in der Zusammensetzung der Peritonealzell-Populationen können, aufgrund der nahezu vollständigen Übereinstimmung in den verschiedenen Maus-Linien, als weiterer möglicher Faktor für die verlängerte Überlebenszeit ebenfalls ausgeschlossen werden.

Als weitere, mögliche Einflussgröße wurde der Aktivitätszustand der adhären Peritonealzellen mithilfe eines Phagozytose-Assays untersucht. Das Ergebnis dieser Experimente konnte jedoch ebenfalls das Ausbleiben einer gesteigerten Empfindlichkeit für Superinfektion mit *S.typhimurium* nicht erklären. Insgesamt kann gesagt werden, dass sowohl die Anzahl als auch die Zusammensetzung und der Aktivitätszustand der Peritonealzellen in den untersuchten Maus-Linien dem Wildtyp vergleichbar war und diese Parameter somit nicht als Ursache für das Phänomen in Frage kommen. Ein Aspekt, der zu dem Effekt beitragen könnte, ist die Tatsache, dass die Abwesenheit von

TNF und damit die fehlende chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten (Yang et al. 2002) einen verzögerten Influx in das Peritoneum bewirken könnte, und somit eventuell die Kinetik der Migration eine Rolle spielt. Dieser Aspekt muss jedoch weiter untersucht werden.

10.4.2 Die bakterielle Komponente

Als Ursachen für die Induktion einer "Immunparalyse" nach subletaler CLP kommen sowohl die austretenden Bakterien in Frage wie auch das durch die Ligatur nekrotisierende Gewebe. In welchem Umfang die bakterielle Komponente zu der Entstehung der "Immunparalyse" beiträgt, wurde durch Experimente mit Phenol-inaktivierten *S.typhimurium* untersucht. Welcher Aspekt davon hauptsächlich betroffen ist, die verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit und die damit einhergehende gesteigerte Empfindlichkeit für Superinfektionen mit *S.typhimurium* oder jeweils nur einer der beiden Aspekte, wurde mittels Zytokinbestimmungen und Überlebens-Experimenten ermittelt. Die Applikation von Phenol-inaktivierten *S.typhimurium* führte nach 48 Stunden zu einer deutlichen Reduktion der Serumspiegel aller gemessenen Zytokine (8.1.1), was bisher als eindeutiger Parameter zur Charakterisierung einer "Immunparalyse" gewertet wurde. Wurden jedoch Belastungen mit einer zweiten Infektion durchgeführt, war eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit nach Vorbehandlung mit Phenol-inaktivierten Salmonellen festzustellen. Dieser Befund deutet somit auf eine Aktivierung des Immunsystems hin, die offensichtlich unabhängig von den gemessenen Zytokinen zustande kommt. Dass eine andere Komponente, nämlich das nekrotische Gewebe, einen Einfluss auf das immunologische Geschehen hat und ebenfalls zu einer Verminderung der Zytokin-Produktionsfähigkeit in verschiedenen Kompartimenten führt, ist in der Literatur beschrieben worden (Ayala et al. 2000). Die Auswirkungen dieser Komponente ist dabei jedoch nicht im Hinblick auf Superinfektionen untersucht worden und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr bearbeitet werden. Diesen Aspekt abzuklären würde eine sinnvolle Ergänzung zu den hier gefundenen Ergebnissen darstellen.

10.4.3 TNF im Kontext der "Immunparalyse"

Aus der Literatur sowie den Experimenten mit TNF- und TNFR1-defizienten Tieren (s. Abschnitt) ist die maßgebliche Beteiligung von TNF am Immunstatus unumstritten, wenngleich die Art und Weise der TNF-Beteiligung nicht eindeutig geklärt ist. Der neue und unerwartete Befund, dass in Abwesenheit von TNF oder der TNFR1-Aktivierbarkeit eine gesteigerte Empfindlichkeit für Superinfektionen mit *S.typhimurium* nicht auftrat, obwohl eine Reduktion der Zytokin-Produktionsfähigkeit und eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen in diesen Tieren einen derartigen Verlauf erwarten ließen, war Anlass dafür, die Effekte einer exogenen Gabe von TNF auf das Zytokinprofil sowie die damit verbundene Überlebenszeit zu untersuchen. Die Verwendung von rhTNF hat dabei den Vorteil, dass humanes TNF exklusiv an den TNFR1 bindet (Lewis et al. 1991b) und somit vornehmlich denjenigen Rezeptor aktiviert, der in diesem Zusammenhang die bedeutendere Rolle spielt.

Experimente, in denen hoch dosiertes rhTNF verwendet worden ist, um seine Auswirkungen auf die Zytokin-Produktionsfähigkeit und die Mortalität zu untersuchen (8.1.2 und 8.2) haben Ergebnisse erbracht, die mit einer Vorbehandlung mit Phenol-inaktivierten Salmonellen vergleichbar sind. Diese Befunde können daher als Beleg für eine Beteiligung von TNF an der verminderten Zytokin-Produktionsfähigkeit nach einer Primärinfektion mit TNF-Freisetzung gewertet werden. Zusätzlich erfordern sie eine differenziertere Betrachtung des Phänomens "Immunparalyse" und zwar dahingehend, dass man die Reduktion der Zytokin-Produktionskapazität nicht zwangsläufig mit einer gesteigerten Empfindlichkeit für Superinfektionen gleichsetzen kann.

Somit ergeben sich für die Rolle von TNF und der Aktivierung des TNFR1 in einer Sepsis folgende Punkte: 1. TNF trägt zu einer reduzierten Produktionskapazität für systemisch messbare Zytokine bei und kann diese direkt verursachen. 2. Eine durch rhTNF induzierte Reduktion der Zytokin-Produktionsfähigkeit führte zu einer geringeren Empfindlichkeit für eine Superinfektion mit *S.typhimurium*. 3. Die Effekte in 1. und 2. konnten auch durch Gabe von toten *S.typhimurium* hervorgerufen werden, wobei die Freisetzung von endogenem TNF (s. Abb. 8-2) als zentraler Faktor eine plausible Erklärung dafür zu sein scheint, dass als gegenregulatorische Maßnahme die Zytokin-Produktionsfähigkeit vermindert wird. Dabei handelt es sich jedoch um sterile Ereignisse, an denen weder lebende Bakterien noch nekrotisches Gewebe beteiligt sind.

Dasselbe Phänomen war auch in TNF- und TNFR1-defizienten Tieren nach vorangegangener CLP zu beobachten. Dies wiederum legt die Schlussfolgerung nahe, dass TNF-unabhängige Wege existieren müssen, die zwar eine Hemmung der Zytokin-Produktionsfähigkeit hervorrufen, aber ebenso wie im Fall der „sterilen“ "Immunparalyse", zu einer verlängerten Überlebenszeit nach einer Superinfektion führen.

Die hier zusammengestellten Ergebnisse waren somit der Anlass dafür den Ausdruck „Immunparalyse“ nicht uneingeschränkt zu übernehmen, sondern eine Differenzierung zwischen „reduzierter Zytokin-Produktionsfähigkeit“ und „gesteigerter Empfindlichkeit für Superinfektionen“ einzuführen.

10.5 Protektive Effekte nach CLP

Da sowohl die Gabe toter *S.typhimurium*-Bakterien als auch die Gabe von rhTNF zu einer reduzierten Zytokin-Produktionsfähigkeit führten, dabei aber gleichzeitig den Wirts-Organismus in einen Zustand gesteigerter Abwehrbereitschaft versetzten, und dieses Phänomen nach CLP auch in TNF- und TNFR1-defizienten Tieren auftrat, stellt sich die Frage, ob zwei Tage nach einer subletalen CLP tatsächlich ein völliger Zusammenbruch der Immunabwehr vorliegt oder ob es sich dabei nur um bestimmte Bereiche handelt, die blockiert sind wohingegen andere eventuell aktiviert sein könnten. In diesem Fall müssen Mechanismen existieren, die unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind den Organismus vor weiteren Infektionen zu schützen.

Die verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit nach subletaler CLP korrelierte mit einer verlängerten Überlebenszeit der Versuchstiere im D-GalN/LPS Leber-Toxizitätsmodell, was vergleichbar mit einer LPS-Toleranz ist, die durch Applikation von niedrig dosiertem LPS induziert wird (Freudenberg et al. 1988). Eine CLP-induzierte LPS-Toleranz wird durch den Befund, dass die TNF-Produktionsfähigkeit zumindest in den Hepatozyten weitestgehend zum Erliegen gekommen ist und somit die Hepatozyten-Apoptose in vermindertem Umfang erfolgt, bestätigt.

Bei Experimenten, in denen zwei Tage nach CLP hoch-dosiertes LPS zur Induktion eines letalen Schocks eingesetzt wurde, wurde zwar ein stärkerer Temperaturabfall gemessen als bei Tieren ohne vorausgegangene CLP, auf die Überlebenszeit hatte dieser Effekt jedoch letztlich keinerlei Auswirkungen. Somit ließ sich kein Schutz durch CLP

vor den Folgen der Applikation einer letalen LPS Menge darstellen. Folglich kann auch keine pauschale Aussage getroffen werden die eine verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit nach CLP dem Phänomen der LPS-Toleranz gleichsetzt, da die klassische LPS-Toleranz auch Schutz vor letalen LPS-Dosen induziert (Lehmann et al. 1987).

Die Verwendung von vollständigen, Phenol-inaktivierten *S.typhimurium* zur Induktion eines Schocks (Abb. 9-3) weist in Richtung einer partiellen Schutzwirkung, ist jedoch nicht signifikant und lässt daher keine eindeutige Interpretation zu. Der Einsatz großer Mengen lebender Erreger 48 Stunden nach CLP hingegen zeigte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit wenn *S.typhimurium* in diesen Experimenten als Belastungskeim eingesetzt wurde. Wurde *P.aeruginosa* als Belastungskeim eingesetzt war ebenfalls ein umfassender Schutz zu beobachten, der durch das Überleben aller Tiere, die CLP-vorbehandelt worden sind, gekennzeichnet war (Abb. 9-4).

Der Widerspruch, der sich aus den Experimenten mit lebenden Erregern einerseits und abgetöteten Erregern sowie Bestandteilen von diesen andererseits ergibt, wirft eine Reihe von Fragen auf, die sowohl die Rolle der Erreger selbst als auch die der Abwehrbereitschaft des immunologisch supprimierten Organismus betreffen. Dabei können spezifische Eigenschaften der Erreger wie z.B. Pathogenitätsfaktoren, Vermehrungszyklus, Vermehrungsort und viele weitere Faktoren ebenso eine Rolle spielen wie der Applikations- und Infektionsweg. So ist beispielsweise *P.aeruginosa* durchaus ein Modellkeim für den Nachweis einer gesteigerten Empfindlichkeit für Superinfektion zwei Tage nach CLP, wenn er intranasal (in press Pollack et al 2005) oder intratracheal (Chen et al. 2000) appliziert wird. Daraus ergibt sich, dass auch der Wirt und die einzelnen Kompartimente, die infiziert werden, für eine Superinfektion wichtig sind (Steinhauser et al. 1999).

Insgesamt kann im Ergebnis festgehalten werden, dass im Rahmen dieser Promotionsarbeit zwar die Mechanismen, die dem Phänomen der "Immunparalyse" zugrunde liegen, nicht vollständig geklärt werden konnten, jedoch wertvolle Erkenntnisse gewonnen wurden, die eine sinnvolle Basis für weitere Forschung darstellen. Die Erkenntnis beispielsweise, dass es während der "Immunparalyse" durchaus noch wirksame Verteidigungsmechanismen gibt, die den Wirt vor den Folgen eines Schocks oder schockähnlicher Zustände schützen, eröffnet die Möglichkeit nach

den molekularen Ursachen hierfür zu suchen und eventuelle protektive Mechanismen zu charakterisieren. So könnte möglicherweise der Zustand der "Immunparalyse" aufgehoben werden ohne direkt in das Zytokinnetzwerk einzugreifen.

Zusammenfassung

Die in den letzten Jahrzehnten immer effektiver gewordene intensivmedizinische Betreuung ist zunehmend in der Lage, Patienten in frühen Phasen von kritisch-septischen Zuständen behandeln zu können und dadurch die Mortalitätsrate in der Frühphase zu reduzieren. In der Folge treten jedoch immunologische Prozesse auf, die häufig durch einen immun-supprimierten Status gekennzeichnet sind, der sich in einer gesteigerten Empfindlichkeit für bakterielle Superinfektionen manifestiert. Dieser Zustand, der in seiner schwersten Ausprägung als "Immunparalyse" bezeichnet wird, gilt als besonders kritisch, da ihm die moderne Medizin wenig entgegenzusetzen hat.

Im Rahmen dieser Arbeit ist anhand des Tiermodells der subletalen CLP versucht worden, den Zustand der "Immunparalyse" genauer zu charakterisieren und mögliche molekulare Ursachen für ihr Zustandekommen zu finden. Dazu wurden im Einzelnen folgende Ergebnisse erarbeitet:

- ✦ Das Modell der subletalen CLP ist auf den C57BL/6 Inzucht-Mausstamm sowie auf TNF-, TNFR1- und TNFR2-defiziente Zuchtlinien übertragbar.
- ✦ Die verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit von Mäusen nach subletaler CLP ist unabhängig von TNF und kann nicht auf einen persistierend erhöhten IL-10 Serumspiegel zurückgeführt werden.
- ✦ Eine verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit ist durch Gram-negative und Gram-positive bakterielle Komponenten sowie bakterielle DNA darstellbar.
- ✦ Die LPS-induzierte verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit 48 Stunden nach subletaler CLP tritt in TNF-, TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen auf und ist unabhängig von LBP-Serum-Konzentrationen.
- ✦ Zwei Tage nach subletaler CLP ist das Minimum der Zytokin-Produktionsfähigkeit erreicht, was mit einer gesteigerten Empfindlichkeit für Superinfektionen korreliert.

- ✦ TNF, exogenes und endogenes, ist in der Lage eine verminderte Zytokin-Produktionsfähigkeit zu induzieren, diese korreliert jedoch nicht mit einer gesteigerten Empfindlichkeit für bakterielle Superinfektionen.
- ✦ In TNF- und TNFR1-defizienten Tieren ist nach subletaler CLP eine Verlängerung der Überlebenszeit bei Superinfektion mit *S.typhimurium* feststellbar.
- ✦ Während der "Immunparalyse" existieren noch protektive Effekte, die hinsichtlich LPS-induziertem Schock und Schockinduktion durch tote oder lebende Bakterien wirksam sind.

11 Literaturverzeichnis

1. **Abbas, A.K., A.H. Lichtmann, and J.S. Pober.** 2000. Cellular and molecular immunology. W.B.Saunders company
2. **Aderka, D., H. Englemann, V. Hornik, Y. Skornick, Y. Levo, D. Wallach, and G. Kushtai.** 15-10-1991. Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res.* **51**: 5602-5607.
3. **Aderka, D., P. Sorkine, S. Abu-Abid, D. Lev, A. Setton, A.P. Cope, D. Wallach, and J. Klausner.** 1-2-1998. Shedding kinetics of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors after systemic TNF leaking during isolated limb perfusion. Relevance to the pathophysiology of septic shock. *J.Clin.Invest* **101**: 650-659.
4. **Aderka, D., A. Wysenbeek, H. Engelmann, A.P. Cope, F. Brennan, Y. Molad, V. Hornik, Y. Levo, R.N. Maini, M. Feldmann, and .** 1993. Correlation between serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **36**: 1111-1120.
5. **Aggarwal, B.B., W.J. Kohr, P.E. Hass, B. Moffat, S.A. Spencer, W.J. Henzel, T.S. Bringman, G.E. Nedwin, D.V. Goeddel, and R.N. Harkins.** 25-2-1985. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J.Biol.Chem.* **260**: 2345-2354.
6. **Aggarwal, B.B. and K. Natarajan.** 1996. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur.Cytokine Netw.* **7**: 93-124.
7. **Aggarwal, B.B., S. Shishodia, K. Ashikawa, and A.C. Bharti.** 2002. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* **1**: 327-341.
8. **Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, E. Lazzeri, R. Manetti, V. Vanini, P. Romagnani, E. Maggi, and S. Romagnani.** 5-8-2002. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp.Med* **196**: 379-387.
9. **Aspalter, R.M., M.M. Eibl, and H.M. Wolf.** 2003. Regulation of TCR-mediated T cell activation by TNF-RII. *J Leukoc.Biol.* **74**: 572-582.

10. **Ayala, A., G.Y. Song, C.S. Chung, K.M. Redmond, and I.H. Chaudry.** 2000. Immune depression in polymicrobial sepsis: the role of necrotic (injured) tissue and endotoxin. *Crit Care Med.* **28**: 2949-2955.
11. **Bachwich, P.R., S.W. Chensue, J.W. Larrick, and S.L. Kunkel.** 14-4-1986. Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E2 production in resting macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **136**: 94-101.
12. **Bauer, S., C.J. Kirschning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, and G.B. Lipford.** 31-7-2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 9237-9242.
13. **Bernheiden, M., J.M. Heinrich, G. Minigo, C. Schutt, F. Stelter, M. Freeman, D. Golenbock, and R.S. Jack.** 2001. LBP, CD14, TLR4 and the murine innate immune response to a peritoneal Salmonella infection. *J.Endotoxin.Res.* **7**: 447-450.
14. **Beutler, B., I.W. Milsark, and A.C. Cerami.** 30-8-1985. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* **229**: 869-871.
15. **Bhakdi, S., T. Klonisch, P. Nuber, and W. Fischer.** 1991. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect.Immun.* **59**: 4614-4620.
16. **Bird, A.** 10-7-1992. The essentials of DNA methylation. *Cell* **70**: 5-8.
17. **Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March, and D.P. Cerretti.** 20-2-1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**: 729-733.
18. **Bone, R.C.** 10-1-1994. Gram-positive organisms and sepsis. *Arch.Intern.Med.* **154**: 26-34.
19. **Bone, R.C., C.L. Sprung, and W.J. Sibbald.** 1992. Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med.* **20**: 724-726.
20. **Butler, D.M., A.M. Malfait, L.J. Mason, P.J. Warden, G. Kollias, R.N. Maini, M. Feldmann, and F.M. Brennan.** 15-9-1997. DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition. *J Immunol.* **159**: 2867-2876.

21. **Carswell, E.A., L.J. Old, R.L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson.** 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **72**: 3666-3670.
22. **Cassatella, M.A., L. Meda, S. Bonora, M. Ceska, and G. Constantin.** 1-12-1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J.Exp.Med.* **178**: 2207-2211.
23. **Cavaillon, J.M., M. Adib-Conquy, C. Fitting, C. Adrie, and D. Payen.** 2003. Cytokine cascade in sepsis. *Scand.J.Infect.Dis.* **35**: 535-544.
24. **Chan, F.K.-M., H.J. Chun, L. Zheng, R.M. Siegel, K.L. Bui, and M.J. Lenardo.** 30-6-2000. A Domain in TNF Receptors That Mediates Ligand-Independent Receptor Assembly and Signaling. *Science* **288**: 2351-2354.
25. **Chebath, J., D. Fischer, A. Kumar, J.W. Oh, O. Kolett, T. Lapidot, M. Fischer, S. Rose-John, A. Nagler, S. Slavina, and M. Revel.** 1997. Interleukin-6 receptor-interleukin-6 fusion proteins with enhanced interleukin-6 type pleiotropic activities. *Eur.Cytokine Netw.* **8**: 359-365.
26. **Chen, G.H., R.C. Reddy, M.W. Newstead, K. Tateda, B.L. Kyasapura, and T.J. Standiford.** 1-12-2000. Intrapulmonary TNF gene therapy reverses sepsis-induced suppression of lung antibacterial host defense. *J.Immunol.* **165**: 6496-6503.
27. **Chensue, S.W., P.D. Terebuh, D.G. Remick, W.E. Scales, and S.L. Kunkel.** 1991. In vivo biologic and immunohistochemical analysis of interleukin-1 alpha, beta and tumor necrosis factor during experimental endotoxemia. Kinetics, Kupffer cell expression, and glucocorticoid effects. *Am.J.Pathol.* **138**: 395-402.
28. **Coley, W.B.** 1911. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin.Orthop.Relat Res.* 3-11.
29. **Cope, A.P., D. Aderka, M. Doherty, H. Engelmann, D. Gibbons, A.C. Jones, F.M. Brennan, R.N. Maini, D. Wallach, and M. Feldmann.** 1992. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* **35**: 1160-1169.
30. **Cowdery, J.S., J.H. Chace, A.K. Yi, and A.M. Krieg.** 15-6-1996. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J.Immunol.* **156**: 4570-4575.

31. **Crowe, P.D., T.L. VanArsdale, R.G. Goodwin, and C.F. Ware.** 15-12-1993. Specific induction of 80-kDa tumor necrosis factor receptor shedding in T lymphocytes involves the cytoplasmic domain and phosphorylation. *J.Immunol.* **151**: 6882-6890.
32. **de Chastellier, C. and L. Thilo.** 1997. Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. *Eur.J.Cell Biol.* **74**: 49-62.
33. **de Waal, M.R., J. Abrams, B. Bennett, C.G. Figdor, and J.E. de Vries.** 1-11-1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J.Exp.Med.* **174**: 1209-1220.
34. **Deitch, E.A.** 1998. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* **9**: 1-11.
35. **Di Santo, E., C. Meazza, M. Sironi, P. Fruscella, A. Mantovani, J.D. Sipe, and P. Ghezzi.** 1-7-1997. IL-13 inhibits TNF production but potentiates that of IL-6 in vivo and ex vivo in mice. *J.Immunol.* **159**: 379-382.
36. **Dinarello, C.A., J.G. Cannon, S.M. Wolff, H.A. Bernheim, B. Beutler, A. Cerami, I.S. Figari, M.A. Palladino, Jr., and J.V. O'Connor.** 1-6-1986. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J.Exp.Med.* **163**: 1433-1450.
37. **Ding, L., P.S. Linsley, L.Y. Huang, R.N. Germain, and E.M. Shevach.** 1-8-1993. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J.Immunol.* **151**: 1224-1234.
38. **Diodato, M.D., M.W. Knoferl, M.G. Schwacha, K.I. Bland, and I.H. Chaudry.** 7-5-2001. Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis. *Cytokine* **14**: 162-169.
39. **Domonkos, A., A. Udvardy, L. Laszlo, T. Nagy, and E. Duda.** 2001. Receptor-like properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF. *Eur.Cytokine Netw.* **12**: 411-419.
40. **Dziarski, R.** 2003. Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. *Cell Mol.Life Sci.* **60**: 1793-1804.
41. **Dziarski, R.** 2004. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol.Immunol.* **40**: 877-886.
42. **Echtenacher, B., W. Falk, D.N. Männel, and P.H. Krammer.** 1-12-1990. Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J.Immunol.* **145**: 3762-3766.

43. **Echtenacher, B. and D.N. Männel.** 2002. Requirement of TNF and TNF receptor type 2 for LPS-induced protection from lethal septic peritonitis. *J.Endotoxin.Res.* **8**: 365-369.
44. **Echtenacher, B., R. Urbaschek, K. Weigl, M.A. Freudenberg, and D.N. Männel.** 2003. Treatment of experimental sepsis-induced immunoparalysis with TNF. *Immunobiology* **208**: 381-389.
45. **Echtenacher, B., K. Weigl, N. Lehn, and D.N. Männel.** 2001. Tumor necrosis factor-dependent adhesions as a major protective mechanism early in septic peritonitis in mice. *Infect.Immun.* **69**: 3550-3555.
46. **Eissner, G., S. Kirchner, H. Lindner, W. Kolch, P. Janosch, M. Grell, P. Scheurich, R. Andreesen, and E. Holler.** 15-6-2000. Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. *J Immunol.* **164**: 6193-6198.
47. **Enk, A.H., V.L. Angeloni, M.C. Udey, and S.I. Katz.** 1-9-1993. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J.Immunol.* **151**: 2390-2398.
48. **Erickson, S.L., F.J. de Sauvage, K. Kikly, K. Carver-Moore, S. Pitts-Meek, N. Gillett, K.C. Sheehan, R.D. Schreiber, D.V. Goeddel, and M.W. Moore.** 8-12-1994a. Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* **372**: 560-563.
49. **Erickson, S.L., F.J. de Sauvage, K. Kikly, K. Carver-Moore, S. Pitts-Meek, N. Gillett, K.C. Sheehan, R.D. Schreiber, D.V. Goeddel, and M.W. Moore.** 8-12-1994b. Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* **372**: 560-563.
50. **Eustace, D., X. Han, R. Gooding, A. Rowbottom, P. Riches, and E. Heyderman.** 1993. Interleukin-6 (IL-6) functions as an autocrine growth factor in cervical carcinomas in vitro. *Gynecol.Oncol.* **50**: 15-19.
51. **Faist, E., T.S. Kupper, C.C. Baker, I.H. Chaudry, J. Dwyer, and A.E. Baue.** 1986. Depression of cellular immunity after major injury. Its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation. *Arch.Surg.* **121**: 1000-1005.
52. **Faist, E., A. Mewes, T. Strasser, A. Walz, S. Alkan, C. Baker, W. Ertel, and G. Heberer.** 1988. Alteration of monocyte function following major injury. *Arch.Surg.* **123**: 287-292.
53. **Feldmann, M., F.M. Brennan, E. Paleolog, A. Cope, P. Taylor, R. Williams, J. Woody, and R.N. Maini.** 2004. Anti-TNFalpha therapy of rheumatoid

- arthritis: what can we learn about chronic disease? *Novartis.Found.Symp.* **256**: 53-69.
54. **Fiers, W.** 22-7-1991. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett.* **285**: 199-212.
55. **Fiers, W., R. Beyaert, P. Brouckaert, B. Everaerd, J. Grooten, A. Lenaerts, C. Libert, P. Suffys, N. Takahashi, J. Tavernier, and .** 1990. Tumour necrosis factor: mechanism of action at the molecular, cellular and in vivo level. *Scand.J.Clin.Lab Invest Suppl* **202**: 159-
56. **Fink, M.P. and S.O. Heard.** 1990. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J.Surg.Res.* **49**: 186-196.
57. **Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann.** 1-12-1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J.Exp.Med.* **170**: 2081-2095.
58. **Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J.P. Brakenhoff, K.J. Kallen, A. Wollmer, J. Grotzinger, and S. Rose-John.** 1997. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat.Biotechnol.* **15**: 142-145.
59. **Frater-Schroder, M., W. Risau, R. Hallmann, P. Gautschi, and P. Bohlen.** 1987. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **84**: 5277-5281.
60. **Freudenberg, M.A. and C. Galanos.** 1988. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect.Immun.* **56**: 1352-1357.
61. **Galanos, C. and M.A. Freudenberg.** 1993. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Immunobiology* **187**: 346-356.
62. **Galanos, C., M.A. Freudenberg, and W. Reutter.** 1979a. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**: 5939-5943.
63. **Galanos, C., O. Luderitz, E.T. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto, and H. Yoshimura.** 1-4-1985. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur.J.Biochem.* **148**: 1-5.
64. **Galanos, C., O. Luderitz, and O. Westphal.** 1979b. Preparation and properties of a standardized lipopolysaccharide from salmonella abortus equi (Novo-Pyrexal). *Zentralbl.Bakteriol.[Orig.A]* **243**: 226-244.

65. **Gamble, J.R., J.M. Harlan, S.J. Klebanoff, and M.A. Vadas.** 1985. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**: 8667-8671.
66. **Gearing, A.J., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A.H. Davidson, A.H. Drummond, W.A. Galloway, R. Gilbert, J.L. Gordon, and .** 18-8-1994. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* **370**: 555-557.
67. **Gessani, S., U. Testa, B. Varano, P. Di Marzio, P. Borghi, L. Conti, T. Barberi, E. Tritarelli, R. Martucci, D. Seripa, and .** 1-10-1993. Enhanced production of LPS-induced cytokines during differentiation of human monocytes to macrophages. Role of LPS receptors. *J.Immunol.* **151**: 3758-3766.
68. **Godshall, C.J., M.J. Scott, J.C. Peyton, S.A. Gardner, and W.G. Cheadle.** 2002. Genetic background determines susceptibility during murine septic peritonitis. *J.Surg.Res.* **102**: 45-49.
69. **Gordon, J.R. and S.J. Galli.** 19-7-1990. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* **346**: 274-276.
70. **Govoni, G., F. Canonne-Hergaux, C.G. Pfeifer, S.L. Marcus, S.D. Mills, D.J. Hackam, S. Grinstein, D. Malo, B.B. Finlay, and P. Gros.** 1999. Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect.Immun.* **67**: 2225-2232.
71. **Grell, M.** 1995. Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J Inflamm.* **47**: 8-17.
72. **Grell, M., F.M. Becke, H. Wajant, D.N. Mannel, and P. Scheurich.** 1998. TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur.J.Immunol.* **28**: 257-263.
73. **Hackam, D.J., O.D. Rotstein, W. Zhang, S. Gruenheid, P. Gros, and S. Grinstein.** 20-7-1998. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. *J.Exp.Med.* **188**: 351-364.
74. **Hartmann, G. and A.M. Krieg.** 1999. CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther.* **6**: 893-903.
75. **Heine, H. and E. Lien.** 2003. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **130**: 180-192.

76. **Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira.** 7-12-2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**: 740-745.
77. **Hergersberg, M.** 1-12-1991. Biological aspects of cytosine methylation in eukaryotic cells. *Experientia* **47**: 1171-1185.
78. **Hirano, T.** 1992. Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **62**: S60-S65.
79. **Hober, D., S. Benyoucef, A.S. Delannoy, D. De Groote, F. Ajana, Y. Mouton, and P. Wattre.** 1996. High plasma level of soluble tumor necrosis factor receptor type II (sTNFRII) in asymptomatic HIV-1-infected patients. *Infection* **24**: 213-217.
80. **Hoffmann, P., S. Heinle, U.F. Schade, H. Loppnow, A.J. Ulmer, H.D. Flad, G. Jung, and W.G. Bessler.** 1988. Stimulation of human and murine adherent cells by bacterial lipoprotein and synthetic lipopeptide analogues. *Immunobiology* **177**: 158-170.
81. **Höflich, C. and H.D. Volk.** 2002. [Immunomodulation in sepsis]. *Chirurg* **73**: 1100-1104.
82. **Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira.** 1-4-1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J.Immunol.* **162**: 3749-3752.
83. **Ibelgaufts, H.** 2004. Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. <http://www.copewithcytokines.de>
84. **Jabado, N., A. Jankowski, S. Dougaparsad, V. Picard, S. Grinstein, and P. Gros.** 6-11-2000. Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J.Exp.Med.* **192**: 1237-1248.
85. **Jack, R.S., X. Fan, M. Bernheiden, G. Rune, M. Ehlers, A. Weber, G. Kirsch, R. Mentel, B. Furl, M. Freudenberg, G. Schmitz, F. Stelter, and C. Schütt.** 16-10-1997. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature* **389**: 742-745.
86. **Jacobsen, F.W., C.M. Dubois, L.S. Rusten, O.P. Veiby, and S.E. Jacobsen.** 15-4-1995. Inhibition of stem cell factor-induced proliferation of primitive murine hematopoietic progenitor cells signaled through the 75-kilodalton tumor necrosis factor receptor. Regulation of c-kit and p53 expression. *J Immunol.* **154**: 3732-3741.

87. **Jacobsen, F.W., M. Rothe, L. Rusten, D.V. Goeddel, E.B. Smeland, O.P. Veiby, L. Slordal, and S.E. Jacobsen.** 25-10-1994. Role of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor: inhibition of early hematopoiesis. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **91**: 10695-10699.
88. **Janeway, C.A., Jr.** 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **54 Pt 1**: 1-13.
89. **JENSEN, K.E., A.L. NEAL, R.E. OWENS, and J. WARREN.** 2-11-1963. INTERFERON RESPONSES OF CHICK EMBRYO FIBROBLASTS TO NUCLEIC ACIDS AND RELATED COMPOUNDS. *Nature* **200**: 433-434.
90. **Jones, E.Y., D.I. Stuart, and N.P. Walker.** 16-3-1989. Structure of tumour necrosis factor. *Nature* **338**: 225-228.
91. **Kasama, T., R.M. Strieter, N.W. Lukacs, M.D. Burdick, and S.L. Kunkel.** 1-4-1994. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J.Immunol.* **152**: 3559-3569.
92. **Kaufmann, S.H.** 1994. Bacterial and protozoal infections in genetically disrupted mice. *Curr.Opin.Immunol.* **6**: 518-525.
93. **Kengatharan, K.M., S. De Kimpe, C. Robson, S.J. Foster, and C. Thiemermann.** 20-7-1998. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J.Exp.Med.* **188**: 305-315.
94. **Kim, E.Y. and H.S. Teh.** 15-12-2001. TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *J.Immunol.* **167**: 6812-6820.
95. **Klebanoff, S.J., M.A. Vadas, J.M. Harlan, L.H. Sparks, J.R. Gamble, J.M. Agosti, and A.M. Waltersdorff.** 1-6-1986. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J.Immunol.* **136**: 4220-4225.
96. **Kopf, M., H. Baumann, G. Freer, M. Freudenberg, M. Lamers, T. Kishimoto, R. Zinkernagel, H. Bluethmann, and G. Kohler.** 24-3-1994. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* **368**: 339-342.
97. **Kriegler, M., C. Perez, K. DeFay, I. Albert, and S.D. Lu.** 8-4-1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* **53**: 45-53.
98. **Laichalk, L.L., J.M. Danforth, and T.J. Standiford.** 1996. Interleukin-10 inhibits neutrophil phagocytic and bactericidal activity. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **15**: 181-187.

99. **Lantz, M., F. Bjornberg, I. Olsson, and J. Richter.** 1-2-1994. Adherence of neutrophils induces release of soluble tumor necrosis factor receptor forms. *J.Immunol.* **152**: 1362-1369.
100. **Lehmann, V., M.A. Freudenberg, and C. Galanos.** 1-3-1987. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. *J.Exp.Med.* **165**: 657-663.
101. **Levy, M.M., M.P. Fink, J.C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S.M. Opal, J.L. Vincent, and G. Ramsay.** 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* **31**: 1250-1256.
102. **Lewis, M., L.A. Tartaglia, A. Lee, G.L. Bennett, G.C. Rice, G.H. Wong, E.Y. Chen, and D.V. Goeddel.** 1-4-1991a. 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**: 2830-2834.
103. **Lewis, M., L.A. Tartaglia, A. Lee, G.L. Bennett, G.C. Rice, G.H. Wong, E.Y. Chen, and D.V. Goeddel.** 1-4-1991b. 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**: 2830-2834.
104. **Lipford, G.B., K. Heeg, and H. Wagner.** 1998. Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol.* **6**: 496-500.
105. **Lipford, G.B., T. Sparwasser, M. Bauer, S. Zimmermann, E.S. Koch, K. Heeg, and H. Wagner.** 1997. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur.J.Immunol.* **27**: 3420-3426.
106. **Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo.** 23-2-2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**: 487-501.
107. **Loetscher, H., Y.C. Pan, H.W. Lahm, R. Gentz, M. Brockhaus, H. Tabuchi, and W. Lesslauer.** 20-4-1990. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* **61**: 351-359.
108. **Maier, S., T. Traeger, M. Entleutner, A. Westerholt, B. Kleist, N. Huser, B. Holzmann, A. Stier, K. Pfeffer, and C.D. Heidecke.** 2004. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* **21**: 505-511.
109. **Männel, D.N. and B. Echtenacher.** 2000a. TNF in the inflammatory response. *Chem.Immunol.* **74**: 141-161.

110. **Männel, D.N. and B. Echtenacher.** 2000b. TNF in the inflammatory response. *Chem.Immunol.* **74**: 141-161.
111. **Männel, D.N., R.N. Moore, and S.E. Mergenhagen.** 1980. Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect.Immun.* **30**: 523-530.
112. **Marino, M.W., A. Dunn, D. Grail, M. Inglese, Y. Noguchi, E. Richards, A. Jungbluth, H. Wada, M. Moore, B. Williamson, S. Basu, and L.J. Old.** 22-7-1997b. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **94**: 8093-8098.
113. **Marino, M.W., A. Dunn, D. Grail, M. Inglese, Y. Noguchi, E. Richards, A. Jungbluth, H. Wada, M. Moore, B. Williamson, S. Basu, and L.J. Old.** 22-7-1997a. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**: 8093-8098.
114. **Mason, A.T., D.W. McVicar, C.A. Smith, H.A. Young, C.F. Ware, and J.R. Ortaldo.** 1995. Regulation of NK cells through the 80-kDa TNFR (CD120b). *J Leukoc.Biol.* **58**: 249-255.
115. **Matot, I. and C.L. Sprung.** 2001. Definition of sepsis. *Intensive Care Med.* **27 Suppl 1**: S3-S9.
116. **Means, T.K., D.T. Golenbock, and M.J. Fenton.** 2000. The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**: 219-232.
117. **Mitoma, H., T. Horiuchi, N. Hatta, H. Tsukamoto, S. Harashima, Y. Kikuchi, J. Otsuka, S. Okamura, S. Fujita, and M. Harada.** 2005. Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-alpha. *Gastroenterology* **128**: 376-392.
118. **Mizoguchi, E., A. Mizoguchi, H. Takedatsu, E. Cario, Y.P. de Jong, C.J. Ooi, R.J. Xavier, C. Terhorst, D.K. Podolsky, and A.K. Bhan.** 2002. Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* **122**: 134-144.
119. **Mohler, K.M., D.S. Torrance, C.A. Smith, R.G. Goodwin, K.E. Stremler, V.P. Fung, H. Madani, and M.B. Widmer.** 1-8-1993. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol.* **151**: 1548-1561.
120. **Moore, K.W., M.R. de Waal, R.L. Coffman, and A. O'Garra.** 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.* **19**: 683-765.

121. **Moser, R., B. Schleiffenbaum, P. Groscurth, and J. Fehr.** 1989. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J.Clin.Invest* **83**: 444-455.
122. **Müller, R., A. Marmenout, and W. Fiers.** 3-3-1986. Synthesis and maturation of recombinant human tumor necrosis factor in eukaryotic systems. *FEBS Lett.* **197**: 99-104.
123. **Nawroth, P.P., A. Bierhaus, J. Lin, Y. Zhang, and R. Ziegler.** 1991. [Regulation of the endothelium by TNF]. *Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med.* **97**: 487-489.
124. **Nowak, M., G.C. Gaines, J. Rosenberg, R. Minter, F.R. Bahjat, J. Rectenwald, S.L. MacKay, C.K. Edwards, III, and L.L. Moldawer.** 2000. LPS-induced liver injury in D-galactosamine-sensitized mice requires secreted TNF-alpha and the TNF-p55 receptor. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **278**: R1202-R1209.
125. **Oldenburg, H.S., M.A. Rogy, D.D. Lazarus, K.J. Van Zee, B.P. Keeler, R.A. Chizzonite, S.F. Lowry, and L.L. Moldawer.** 1993. Cachexia and the acute-phase protein response in inflammation are regulated by interleukin-6. *Eur.J.Immunol.* **23**: 1889-1894.
126. **Oloff, A., D. Defeo-Jones, M. Boyer, D. Martinez, D. Kiefer, G. Vuocolo, A. Wolfe, and S.H. Socher.** 14-8-1987. Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. *Cell* **50**: 555-563.
127. **Oswald, I.P., R.T. Gazzinelli, A. Sher, and S.L. James.** 1-6-1992a. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J.Immunol.* **148**: 3578-3582.
128. **Oswald, I.P., T.A. Wynn, A. Sher, and S.L. James.** 15-9-1992b. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**: 8676-8680.
129. **Pasparakis, M., L. Alexopoulou, M. Grell, K. Pfizenmaier, H. Bluethmann, and G. Kollias.** 10-6-1997. Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **94**: 6319-6323.
130. **Pennica, D., J.S. Hayflick, T.S. Bringman, M.A. Palladino, and D.V. Goeddel.** 1985. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**: 6060-6064.

131. **Peschon, J.J., D.S. Torrance, K.L. Stocking, M.B. Glaccum, C. Otten, C.R. Willis, K. Charrier, P.J. Morrissey, C.B. Ware, and K.M. Mohler.** 15-1-1998. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J.Immunol.* **160**: 943-952.
132. **Pestka, S., C.D. Krause, D. Sarkar, M.R. Walter, Y. Shi, and P.B. Fisher.** 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu.Rev.Immunol.* **22**: 929-979.
133. **Pfeffer, K., T. Matsuyama, T.M. Kundig, A. Wakeham, K. Kishihara, A. Shahinian, K. Wiegmann, P.S. Ohashi, M. Kronke, and T.W. Mak.** 7-5-1993b. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* **73**: 457-467.
134. **Pfeffer, K., T. Matsuyama, T.M. Kundig, A. Wakeham, K. Kishihara, A. Shahinian, K. Wiegmann, P.S. Ohashi, M. Kronke, and T.W. Mak.** 7-5-1993a. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* **73**: 457-467.
135. **Philip, R. and L.B. Epstein.** 4-9-1986. Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1. *Nature* **323**: 86-89.
136. **Piguet, P.F., G.E. Grau, B. Allet, and P. Vassalli.** 1-11-1987. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *J.Exp.Med.* **166**: 1280-1289.
137. **Porteu, F. and C. Nathan.** 1-8-1990. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. *J.Exp.Med.* **172**: 599-607.
138. **Ralph, P., I. Nakoinz, A. Sampson-Johannes, S. Fong, D. Lowe, H.Y. Min, and L. Lin.** 1-2-1992. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J.Immunol.* **148**: 808-814.
139. **Ramadori, G., K.H. Meyer zum Buschenfelde, P.S. Tobias, J.C. Mathison, and R.J. Ulevitch.** 1990. Biosynthesis of lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiology* **58**: 89-94.
140. **Ramadori, G., J. Van Damme, H. Rieder, and K.H. Meyer zum Buschenfelde.** 1988. Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Eur.J.Immunol.* **18**: 1259-1264.

141. **Remick, D.G., D.E. Newcomb, G.L. Bolgos, and D.R. Call.** 2000. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* **13**: 110-116.
142. **Rietschel, E.T. and H. Brade.** 1992. Bacterial endotoxins. *Sci.Am.* **267**: 54-61.
143. **Rietschel, E.T., J. Schletter, B. Weidemann, V. El Samalouti, T. Mattern, U. Zahringer, U. Seydel, H. Brade, H.D. Flad, S. Kusumoto, D. Gupta, R. Dziarski, and A.J. Ulmer.** 1998. Lipopolysaccharide and peptidoglycan: CD14-dependent bacterial inducers of inflammation. *Microb.Drug Resist.* **4**: 37-44.
144. **ROTEM, Z., R.A. COX, and A. ISAACS.** 9-2-1963. Inhibition of virus multiplication by foreign nucleic acid. *Nature* **197**: 564-566.
145. **Rothe, J., W. Lesslauer, H. Lotscher, Y. Lang, P. Koebel, F. Kontgen, A. Althage, R. Zinkernagel, M. Steinmetz, and H. Bluethmann.** 26-8-1993a. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* **364**: 798-802.
146. **Rothe, J., W. Lesslauer, H. Lotscher, Y. Lang, P. Koebel, F. Kontgen, A. Althage, R. Zinkernagel, M. Steinmetz, and H. Bluethmann.** 26-8-1993b. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* **364**: 798-802.
147. **Sato, N., T. Goto, K. Haranaka, N. Satomi, H. Nariuchi, Y. Mano-Hirano, and Y. Sawasaki.** 1986. Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *J.Natl.Cancer Inst.* **76**: 1113-1121.
148. **Schroder, J., F. Stuber, H. Gallati, F.U. Schade, and B. Kremer.** 1995. Pattern of soluble TNF receptors I and II in sepsis. *Infection* **23**: 143-148.
149. **Schröder, N.W., S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, T. Hartung, U. Zahringer, U.B. Gobel, J.R. Weber, and R.R. Schumann.** 2-5-2003. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J.Biol.Chem.* **278**: 15587-15594.
150. **Schumann, R.R., S.R. Leong, G.W. Flaggs, P.W. Gray, S.D. Wright, J.C. Mathison, P.S. Tobias, and R.J. Ulevitch.** 21-9-1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**: 1429-1431.

151. **Schumann, R.R., E.T. Rietschel, and H. Loppnow.** 1994. The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)* **183**: 279-297.
152. **Seitz, C., D.N. Mannel, and T. Hehlhans.** 15-2-1998. Isolation and functional characterization of the mouse p75 TNF receptor promoter. *Genomics* **48**: 111-116.
153. **Seki, S., S. Osada, S. Ono, S. Aosasa, Y. Habu, T. Nishikage, H. Mochizuki, and H. Hiraide.** 1998. Role of liver NK cells and peritoneal macrophages in gamma interferon and interleukin-10 production in experimental bacterial peritonitis in mice. *Infect.Immun.* **66**: 5286-5294.
154. **Semenza, G.L.** 1998. Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J Lab Clin.Med* **131**: 207-214.
155. **Smith, C.A., T. Davis, D. Anderson, L. Solam, M.P. Beckmann, R. Jerzy, S.K. Dower, D. Cosman, and R.G. Goodwin.** 25-5-1990. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* **248**: 1019-1023.
156. **Smith, C.A., T. Farrah, and R.G. Goodwin.** 25-3-1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**: 959-962.
157. **Sparwasser, T., E.S. Koch, R.M. Vabulas, K. Heeg, G.B. Lipford, J.W. Ellwart, and H. Wagner.** 1998. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* **28**: 2045-2054.
158. **Sparwasser, T., T. Miethke, G. Lipford, K. Borschert, H. Hacker, K. Heeg, and H. Wagner.** 27-3-1997a. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature* **386**: 336-337.
159. **Sparwasser, T., T. Miethke, G. Lipford, A. Erdmann, H. Hacker, K. Heeg, and H. Wagner.** 1997b. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *Eur.J.Immunol.* **27**: 1671-1679.
160. **Stacey, K.J., M.J. Sweet, and D.A. Hume.** 1-9-1996. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J.Immunol.* **157**: 2116-2122.
161. **Steffen, M., M. Abboud, G.K. Potter, Y.P. Yung, and M.A. Moore.** 1989. Presence of tumour necrosis factor or a related factor in human basophil/mast cells. *Immunology* **66**: 445-450.

162. **Steinhauser, M.L., C.M. Hogaboam, S.L. Kunkel, N.W. Lukacs, R.M. Strieter, and T.J. Standiford.** 1-1-1999. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J.Immunol.* **162**: 392-399.
163. **Stevenson, F.T., S.L. Bursten, R.M. Locksley, and D.H. Lovett.** 1-10-1992. Myristyl acylation of the tumor necrosis factor alpha precursor on specific lysine residues. *J Exp.Med* **176**: 1053-1062.
164. **Syto, R., N.J. Murgolo, E.H. Braswell, P. Mui, E. Huang, and W.T. Windsor.** 1-12-1998. Structural and biological stability of the human interleukin 10 homodimer. *Biochemistry* **37**: 16943-16951.
165. **Takeda, K., S. Iwamoto, H. Sugimoto, T. Takuma, N. Kawatani, M. Noda, A. Masaki, H. Morise, H. Arimura, and K. Konno.** 25-9-1986. Identity of differentiation inducing factor and tumour necrosis factor. *Nature* **323**: 338-340.
166. **Tan, Y., S. Li, B.R. Pitt, and L. Huang.** 1-9-1999. The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo. *Hum.Gene Ther.* **10**: 2153-2161.
167. **Tartaglia, L.A., T.M. Ayres, G.H. Wong, and D.V. Goeddel.** 10-9-1993a. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**: 845-853.
168. **Tartaglia, L.A., D.V. Goeddel, C. Reynolds, I.S. Figari, R.F. Weber, B.M. Fendly, and M.A. Palladino, Jr.** 1-11-1993b. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J.Immunol.* **151**: 4637-4641.
169. **Tokunaga, T., H. Yamamoto, S. Shimada, H. Abe, T. Fukuda, Y. Fujisawa, Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka, T. Sudo, and .** 1984. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J.Natl.Cancer Inst.* **72**: 955-962.
170. **Tracey, K.J. and A. Cerami.** 1989. Cachectin/tumor necrosis factor and other cytokines in infectious disease. *Curr.Opin.Immunol.* **1**: 454-461.
171. **Utsumi, T., T. Takeshige, K. Tanaka, K. Takami, Y. Kira, J. Klostergaard, and R. Ishisaka.** 29-6-2001. Transmembrane TNF (pro-TNF) is palmitoylated. *FEBS Lett.* **500**: 1-6.
172. **Vassalli, P.** 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu.Rev.Immunol.* **10**: 411-452.

173. **Vassalli, P., G.E. Grau, and P.F. Piguet.** 1992. TNF in autoimmune diseases, graft-versus-host reactions, and pulmonary fibrosis. *Immunol.Ser.* **56**: 409-430.
174. **Vazquez-Torres, A., G. Fantuzzi, C.K. Edwards, III, C.A. Dinarello, and F.C. Fang.** 27-2-2001. Defective localization of the NADPH phagocyte oxidase to Salmonella-containing phagosomes in tumor necrosis factor p55 receptor-deficient macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 2561-2565.
175. **Vidal, S., M.L. Tremblay, G. Govoni, S. Gauthier, G. Sebastiani, D. Malo, E. Skamene, M. Olivier, S. Jothy, and P. Gros.** 1-9-1995. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J.Exp.Med.* **182**: 655-666.
176. **Vidal, S.M., E. Pinner, P. Lepage, S. Gauthier, and P. Gros.** 15-10-1996. Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *J.Immunol.* **157**: 3559-3568.
177. **Villa, P., G. Sartor, M. Angelini, M. Sironi, M. Conni, P. Gnocchi, A.M. Isetta, G. Grau, W. Buurman, L.J. van Tits, and P. Ghezzi.** 1995. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **2**: 549-553.
178. **Volk, H.D., P. Reinke, D. Krausch, H. Zuckermann, K. Asadullah, J.M. Müller, W.D. Döcke, and W.J. Kox.** 1996. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med.* **22 Suppl 4**: S474-S481.
179. **Volk, H.D., M. Thieme, S. Heym, W.D. Döcke, U. Ruppe, W. Tausch, D. Manger, S. Zuckermann, A. Golosubow, B. Nieter, and .** 1991. Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Inst.Mitt.* **88**: 208-215.
180. **Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich.** 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death.Differ.* **10**: 45-65.
181. **Walley, K.R., N.W. Lukacs, T.J. Standiford, R.M. Strieter, and S.L. Kunkel.** 1996. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect.Immun.* **64**: 4733-4738.
182. **Weber, J.R., D. Freyer, C. Alexander, N.W. Schroder, A. Reiss, C. Kuster, D. Pfeil, E.I. Tuomanen, and R.R. Schumann.** 2003a. Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein. *Immunity.* **19**: 269-279.

183. **Weber, J.R., P. Moreillon, and E.I. Tuomanen.** 2003b. Innate sensors for Gram-positive bacteria. *Curr.Opin.Immunol.* **15**: 408-415.
184. **Weighardt, H., C. Feterowski, M. Veit, M. Rump, H. Wagner, and B. Holzmann.** 15-10-2000. Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J.Immunol.* **165**: 4537-4543.
185. **Wichterman, K.A., A.E. Baue, and I.H. Chaudry.** 1980. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J.Surg.Res.* **29**: 189-201.
186. **Willems, F., A. Marchant, J.P. Delville, C. Gerard, A. Delvaux, T. Velu, M. de Boer, and M. Goldman.** 1994. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur.J.Immunol.* **24**: 1007-1009.
187. **Wright, S.D., P.S. Tobias, R.J. Ulevitch, and R.A. Ramos.** 1-10-1989. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J.Exp.Med.* **170**: 1231-1241.
188. **Wurfel, M.M. and S.D. Wright.** 15-4-1997. Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid. *J.Immunol.* **158**: 3925-3934.
189. **Yamamoto, S., E. Kuramoto, S. Shimada, and T. Tokunaga.** 1988. In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn.J.Cancer Res.* **79**: 866-873.
190. **Yang, K.K., B.G. Dorner, U. Merkel, B. Ryffel, C. Schutt, D. Golenbock, M.W. Freeman, and R.S. Jack.** 15-10-2002. Neutrophil influx in response to a peritoneal infection with *Salmonella* is delayed in lipopolysaccharide-binding protein or CD14-deficient mice. *J.Immunol.* **169**: 4475-4480.
191. **Zantl, N., A. Uebe, B. Neumann, H. Wagner, J.R. Siewert, B. Holzmann, C.D. Heidecke, and K. Pfeffer.** 1998. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect.Immun.* **66**: 2300-2309.

12 Danksagung

Bei allen, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt:

- ✦ Frau Prof. Daniela N. Männel für die offene und unkomplizierte Weise mit der sie mir die Durchführung einer Promotionsarbeit ermöglicht hat und für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie die Überlassung des interessanten Themas. Die ausgesprochen konstruktive Kritik, vor allem bei der Korrektur des schriftlichen Teiles, hat dabei viel zum Gelingen der Arbeit beigetragen und die diskussionsfreudige Atmosphäre in den Gruppenbesprechungen, „Journal-Clubs“ und Mittwochsseminaren haben dazu beigetragen einen fundierten Einblick in wissenschaftliches Arbeiten und in die Grundlagen und Anforderungen der Forschung zu bekommen.
- ✦ Herrn Prof. Dr. S. Elz, ohne dessen Bereitschaft die fakultätsinterne Vertretung dieser Dissertation zu übernehmen, diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.
- ✦ Den Mitgliedern des Gingerino-Clubs für die freundliche Aufnahme, die einen regen wissenschaftlichen, kulinarischen und psycho-sozialen Austausch mit sich gebracht hat.
- ✦ Allen Mitgliedern des Instituts für Immunologie und Pathologie die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu guter Letzt möchte ich bei all denjenigen bedanken ohne die meine schulische, universitäre und berufliche Laufbahn nicht diesen erfreulichen Verlauf genommen hätte und dabei vor allem bei meinen Eltern und meiner Familie.

13 Anhang

Publikationen die im Rahmen der Promotion entstanden sind:

Sterns, T., N. Pollak, B. Echtenacher, and D.N. Männel. 2005. Divergence of protection induced by bacterial products and sepsis-induced immune suppression. *Infect.Immun.* **73:** 4905-4912.

N. Pollak, Sterns, T., B. Echtenacher, and D.N. Männel. 2005. Improved resistance to bacterial superinfection in mice by treatment with macrophage migration inhibitory factor. *Infect.Immun.* In press.

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

Theobald Sterns