

Effekte eines CpG-Motivs in einem Endotoxinämie-Modell der Ratte

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Vorgelegt von
Stephan Alfred Düren
aus Bonn-Bad Godesberg

2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Günther Mathiak
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Minor

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Tag der Mündlichen Prüfung: 31.10.2007

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Bonn
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. D.C. Wirtz

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	9
1.1. Übersicht.....	9
1.2. Das Immunsystem.....	10
1.3. Toll-like Rezeptoren (TLRs).....	11
1.3.1. Liganden der TLRs.....	12
1.4. Immunologische Wirkung bakterieller DNS.....	12
1.4.1. Synthetische CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODNs).....	13
1.4.1.1. CpG-ODN-induzierte Signaltransduktion in der Zelle.....	14
1.4.1.2. Wirkung von CpG-ODNs auf das Immunsystem.....	16
1.4.1.3. Therapeutische Nutzung von CpG-ODNs.....	16
1.5. Lipopolysaccharide (LPS).....	17
1.5.1. LPS-induzierte Signaltransduktion in der Zelle.....	18
1.5.2. Gram-negative Sepsis.....	19
1.5.3. Die LPS-Toleranz.....	21
1.6. Kreuz-Toleranzen verschiedener Toll-like Rezeptoren.....	22
1.7. Fragestellung.....	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1. Lipopolysaccharid.....	23
2.2. Oligodeoxynukleotide.....	23
2.3. Versuchstiere.....	23
2.4. Studienprotokoll.....	24
2.4.1. Ermittlung der Letalitätsdosen.....	24
2.4.2. Letalität der Endotoxinämie nach Vorbehandlung mit ODNs.....	25
2.4.3. Materialgewinnung nach Applikation von ODN und LPS.....	25
2.5. Auswertung der Blutproben.....	26
2.6. Untersuchung der Lungen.....	27
2.6.1. Bestimmung der Lungen-Nassgewichte.....	27
2.6.2. Bronchoalveoläre Lavage (BAL).....	27
2.6.3. Messung von IL-6 in BAL-Flüssigkeit.....	28
2.7. Untersuchung von Leber und Milz.....	29

2.8. Histopathologische Untersuchung.....	29
2.8.1. Anfertigung von Schnittpräparaten.....	29
2.8.2. Auswertung der Schnittpräparate.....	30
2.9. Statistische Analyse.....	30
3. Ergebnisse.....	31
3.1. Letalitätsdosen.....	31
3.2. Natürlicher Verlauf der Endotoxinämie.....	31
3.3. Letalität der Endotoxinämie nach Vorbehandlung mit ODNs.....	32
3.4. Blutbilder.....	34
3.4.1. Leukozyten.....	34
3.4.2. Thrombozyten.....	35
3.4.3. Erythrozyten.....	36
3.4.4. Hämoglobin.....	37
3.4.5. Hämatokrit.....	38
3.5. IL-6 in BAL-Flüssigkeit.....	39
3.6. Gewichte der Zielorgane.....	40
3.6.1. Lungen-Nassgewichte.....	40
3.6.2. Leber-Nassgewichte.....	41
3.6.3. Milz-Nassgewichte.....	42
3.7. Histopathologische Untersuchung.....	43
4. Diskussion.....	46
5. Zusammenfassung.....	52
6. Literaturverzeichnis.....	54
Danksagung.....	65
Lebenslauf.....	66

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro (10^{-6})
AP1	„activating protein 1“
ARDS	„acute respiratory distress syndrome“
BAL	bronchoalveoläre Lavage
CD	„cluster of differentiation“
CpG	Cytosin-Guanosin Dinukleotid
DIC	„disseminated intravascular coagulation“
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zelle
E. coli	Escherichia coli
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
INF-γ	Interferon gamma
IRAK	„interleukin-1 receptor-activated kinase“
IRF	„interferon regulatory factor“
KG	Körpergewicht
LBP	LPS-bindendes Protein
LD	Letalitätsdosis
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leuzin-reiche Regionen
m	Milli (10^{-3})
MyD88	„myeloid differentiation factor 88“
n	Nano (10^{-9})
NF-κB	„nuclear Factor κB“
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLR	„NOD-like receptor“
NOD	„nucleotide-binding oligomerization domain“
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
PAMP	„pathogen-associated molecular pattern“
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase

PRR	„pattern recognition receptor“
RIG	„Retinoid acid-inducible gene-1“
RLH	„RIG-like helicase“
RNS	Ribonukleinsäure
SIRS	„systemic inflammatory response syndrome“
SR	Scavenger Rezeptoren
STAT1	„signal transducers and activators of transcription“
T _H 1	T-Helfer-1-Zelle
T _H 2	T-Helfer-2-Zelle
TIR	Toll / Interleukin-1-Rezeptor
TIRAP	„TIR domain-containing adapter protein“
TLR	„Toll-like receptor“
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF6	„TNF receptor-associated factor 6“
TRAM	„TRIF-related adapter molecule“
TRIF	„TIR domain-containing, adapter-inducing IFN- β protein“

1. Einleitung

1.1 Übersicht

Bereits vor über 100 Jahren wurde erkannt, dass die Immunantwort im Rahmen einer bakteriellen Infektion in der Lage ist, erfolgreich Tumoren zu bekämpfen und somit therapeutisch genutzt werden kann (Coley, 1893). In den letzten Jahrzehnten wurde die Standardisierung bakterieller Lysate möglich und die Fortschritte auf dem Gebiet der Immunologie haben zu einem besseren Verständnis des Wirkmechanismus geführt. 1984 trennten Tokunaga et al. ein Lysat in verschiedene Fraktionen auf und konnte nachweisen, dass die Fraktion mit der bakteriellen Desoxyribonukleinsäure (DNS) die höchste Aktivität aufwies. Die nachfolgende Forschung, konnte die aktiven Sequenzen innerhalb der bakteriellen DNS eingrenzen. Es handelt sich um Cytosin-Guanosin (CpG) -Motive, die eingebettet in synthetische Oligodeoxynukleotide (ODNs) die gleiche Immunantwort hervorrufen, wie die gesamte bakterielle DNS (Yamamoto et al., 1992, 1994; Krieg et al., 1995). CpG-ODN ist in therapeutisch genutzten Dosierungen nebenwirkungsarm und somit bestens als Immuntherapeutikum geeignet (Jones et al., 1999).

CpG-ODN wird vorwiegend von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt. Diese Zellen sind in der Lage, verschiedene charakteristische molekulare Muster als potenzielle Krankheitserreger zu identifizieren und eine spezifische Immunantwort zu initiieren. Für diese Mustererkennung sind die Zellen des angeborenen Immunsystems mit einem begrenzten Repertoire an Rezeptoren ausgestattet. Die wichtigsten werden als Toll-like Rezeptoren (TLRs) bezeichnet. Die Signaltransduktion bei verschiedenen pathogenen Molekülen ist daher sehr ähnlich (Häcker et al., 2000).

Zu diesen Molekülen gehört auch Lipopolysaccharid (LPS), ein in der Zellwand Gram-negativer Bakterien vorkommendes Endotoxin. Im Rahmen der Gram-negativen Sepsis kommt es zu einer Endotoxämie und LPS ist für die überschießende Immunreaktion des Organismus verantwortlich, die letztendlich zum septischen Schock und zum Tode führt. Um diesen Verlauf abzuschwächen oder gar zu verhindern ist ein frühzeitiges Eingreifen in die immunologische Kaskade von Nöten.

Bereits 1978 konnten Greer und Rietschel eine Toleranzentwicklung bei wiederholter Gabe von LPS in einem Tiermodell nachweisen. Darüber hinaus führt die repetitive Stimulation verschiedener TLRs mit ihrem eigenen Liganden ebenfalls zu einer Abschwächung der immunologischen Antwort. Aufgrund der Ähnlichkeit der TLRs und der nachfolgenden

Signaltransduktion, ist die Wahrscheinlichkeit von Kreuz-Toleranzen hoch, und tatsächlich wurden Kreuz-Toleranzen zwischen TLRs *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen. (Dalpke et al., 2005)

Hieraus ergibt sich die Fragestellung dieser Arbeit: Induziert CpG-ODN eine Toleranz in einem Endotoxinämie-Modell der Ratte?

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem von Säugetieren nutzt zwei verschiedene Strategien zur Abwehr von Krankheitserregern.

Die erworbene Immunität hinterlässt ein immunologisches Gedächtnis, das eine schnellere und stärkere Reaktion bei erneutem Zusammentreffen mit demselben Pathogen ermöglicht. Diese Strategie basiert auf einem umfangreichen Repertoire an Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren, die hochspezifisch für ein Antigen sind und eine große Affinität zu diesem Antigen aufweisen. Es werden zytotoxische T-Zellen produziert, die einen langandauernden Schutz gewährleisten. (Paul, 2003)

Das angeborene Immunsystem besteht aus humoralen Bestandteilen, wie dem Komplementsystem, dem Lysozym und den Akute-Phase-Proteinen, sowie aus zellulären Bestandteilen, zu denen Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), dendritische Zellen (DZ) und Monozyten zählen. Mit diesen Zellen präsentiert das angeborene Immunsystem eine große Anzahl an Rezeptoren, die unter dem Überbegriff PRRs (pattern recognition receptors) zusammengefasst werden. Hierzu gehören Kollektine, Ficolline, C-Typ Lektine, Scavenger Rezeptoren (SR), verschiedene Komplementfaktoren, Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like – Rezeptoren (NLRs), Retinoid acid-inducible gene-1 (RIG)-like - Helicasen (RLHs) und TLRs (Gordon, 2002; Meylan et al., 2006).

Diese PRRs können sogenannte PAMPs (pathogen associated molecular patterns) erkennen, zu denen eine Vielzahl an Molekülen gezählt werden, die ausschließlich bei pathogenen Mikroorganismen vorkommen und somit ein charakteristisches Muster darstellen, wie zum Beispiel CpG-Motive und LPS. (Medzhitov und Janeway, 1998)

Diese Funktionsweise ermöglicht dem angeborenen Immunsystem eine schnelle Reaktion gegenüber einer Vielzahl an fremden Erregern, ohne dass eine vorausgegangene frühere Exposition stattgefunden hat.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren nach ihrer Aktivierung verstärkt kostimulatorische Oberflächenmoleküle und produzieren Mediatoren, wie zum Beispiel proinflammatorische Zytokine (Akira, 2003). In der Folge werden weitere Komponenten des angeborenen Immunsystems aktiviert und die resultierende Entzündungsreaktion steuert die nachgeschaltete Antwort des erworbenen Immunsystems durch Stimulation von T- und B-Zellen.

1.3 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Unter den bekannten PRRs stellen die TLRs eine eigenständige sehr genau charakterisierte Familie dar (Rock et al., 1998).

Die Benennung ergibt sich aus ihrer Ähnlichkeit mit dem Toll Typ I Transmembranrezeptor der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Das Protein Toll wurde als erstes bei *Drosophila* als Gen beschrieben, welches die dorso-ventrale Achsenbildung des Embryos kontrolliert (Anderson et al., 1985). Es kodiert für einen Rezeptor mit einer intra- und einer extrazellulären Komponente. Außerhalb der Zelle finden sich Leuzin-reiche Regionen (LRR) und die intrazelluläre Domäne ähnelt dem Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R), weshalb sie als Toll / IL-1R (TIR) bezeichnet wird (Dunne und O'Neill, 2003). Die immunologische Funktion von Toll wurde 1996 von Lemaitre et al. nachgewiesen. 1997 zeigten Medzhitov et al. das ein strukturell verwandter Rezeptor auch an der Immunantwort des Menschen beteiligt ist. Dieser Rezeptor wurde später in TLR4 umbenannt.

Dreizehn verschiedene TLRs konnten bisher identifiziert werden, von denen beim Menschen lediglich zehn vorkommen (Tabeta et al., 2004). Die TLRs sind für die Erkennung von PAMPs und daraufhin für die Einleitung einer Signalkaskade über Adapterproteine verantwortlich, die in der Folge Transkriptionsfaktoren aktivieren und somit eine Immunantwort initiieren.

Die verschiedenen Zellen des Immunsystems präsentieren TLRs auf unterschiedliche Art und Weise. Während zum Beispiel TLR4 auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, befindet sich TLR3 sowohl auf, als auch im Inneren der Zelle (Hornef et al., 2003; Matsumoto et al., 2003). TLR9 hingegen ist nur in intrazellulären Kompartimenten zusammen mit seinem Liganden lokalisiert (Ahmad-Nejad et al., 2002). Die endosomale Reifung ist für TLR9 essentiell. Eine Inhibition der Ansäuerung von Endosomen durch Chloroquin oder andere Substanzen unterbricht die Signaltransduktion von TLR9 (Häcker et al., 1998).

Die Liganden der TLRs konnten in den letzten Jahren fast vollständig bestimmt werden (Takeda et al., 2003).

1.3.1 Liganden der TLRs

Als Erster, wurde ein Agonist von TLR4 eindeutig bestimmt. Es handelt sich um LPS, einen integralen Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (Chow et al., 1999). Später wurden dann weitere Liganden des TLR4 identifiziert, wie zum Beispiel Pneumolysin, ein wichtiger Virulenzfaktor von Pneumokokken (Malley et al., 2003).

Natürliche Agonisten für TLR2 sind verschiedene Lipoproteine, Peptidoglykan und Lipoteichonsäure. Diese Bestandteile von Gram-positiven Bakterien können im Rahmen einer Infektion einen toxischen Schock auslösen. Weitere Liganden sind Zellwandbestandteile von Mykobakterien und Hefen. TLR1 und TLR6 bilden mit TLR2 Heterodimere aus und sind so an der Erkennung von vielen dieser Strukturen beteiligt. Durch die Kooperation der TLRs wird das Repertoire der Liganden erweitert (Ozinsky et al., 2000; Takeuchi et al., 2001, 2002).

TLR3 erkennt doppelsträngige virale Ribonukleinsäure (RNS) (Alexopoulou et al. 2001), wohingegen TLR5 durch Flagellin, ein Monomer des extrazellulären Geißelapparates von Bakterien, aktiviert wird (Hayashi et al., 2001).

Die niedermolekularen synthetischen Imidazoquinoline, Loxribin und Bropirimin stimulieren TLR7, ebenso wie einzelsträngige RNS, die zudem an TLR8 bindet (Hemmi et al., 2002; Heil et al., 2003)

Für TLR11 stellen uropathogene *Escherichia coli* (*E. coli*) und ein Eiweißbestandteil von *Toxoplasma gondii* das entsprechende PAMP dar. Dieser Rezeptor kommt jedoch nicht im humanen Immunsystem vor, sondern wurde bei Mäusen nachgewiesen. (Zhang et al., 2004; Lauw et al., 2005)

Bakterielle DNS sowie synthetische erzeugte ODNs, die unmethylierte CpG-Dinukleotide enthalten, aktivieren Immunzellen durch die Bindung an TLR9 (Hemmi et al., 2000). Dabei werden hochspezifisch nur die unmethylierten Formen erkannt. (Bauer et al., 2001).

1.4 Immunologische Wirkung bakterieller DNS

Der New Yorker Chirurg William Coley beobachtete, dass sich ein Sarkom zurückbildete, nachdem eine bakterielle Infektion die Umgebung des Tumors befallen und sich ein Erysipel ausgebildet hatte. Daraufhin begann Coley, Bakterien oder bakterielle Lysate lokal in Sarkome zu injizieren. Es kam in der Folge zu einer zeitlich begrenzten Rückbildung der Tumore. (Coley,

1893) Diese ersten immuntherapeutischen Ansätze rückten jedoch in den folgenden Jahrzehnten in den Hintergrund. 1963 wurde dann die immunstimulatorische Wirkung „fremder“ DNS auf Zellen von Jensen et al. beschrieben. Es zeigte sich, dass die Produktion von Interferon gamma (INF- γ) induziert werden konnte. Tokunaga et al. (1984) fraktionierten das Lysat von Bacillus Calmette-Guerin in verschiedene Teile und konnte nachweisen, dass die Fraktion mit der DNS die höchste immunstimulatorische Aktivität aufwies.

1.4.1 Synthetische CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODNs)

Die immunologisch aktiven DNS-Sequenzen konnten durch nachfolgende Untersuchungen exakt definiert werden. Es handelt sich um eine spiegelbildlich angeordnete Sequenz mit einem zentralen Cytosin-Guanosin-Dinukleotid (CpG, das p bezeichnet die Phosphatbindung), das am 5'-Ende und am 3'-Ende von je zwei Basen flankiert wird. Ein solches CpG-Motiv besteht insgesamt aus einer Folge von sechs Basen. (Yamamoto et al., 1992 a, 1994; Krieg et al., 1995) Yamamoto et al. (1992 b) entdeckten früh das die bakterielle DNS, nicht aber die DNS von Wirbeltieren immunstimulatorisch wirkt. Tatsächlich sind CpG-Motive in eukaryonter DNS unterrepräsentiert und kommen nur mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 1:60 vor. Dagegen entspricht die Häufigkeit von CpG-Dinukleotiden in Bakterien 1:16. Eine weitere Ursache liegt in der Methylierung des CpG-Motivs. Die DNS von Prokaryonten weist bis zu 80 Prozent 5-Methyl-Cytosin in allen CpG-Dinukleotiden auf, wohingegen die CpG-Motive in eukaryonter DNS in der Regel unmethyliert sind. (Krieg et al., 1995)

Zur immuntherapeutischen Nutzung werden 8-30 Basen lange ODNs mit einem oder mehreren unmethylierten CpG-Motiven synthetisiert. Diese künstlichen CpG-ODNs weisen die gleiche immunstimulatorische Komponente wie genomische bakterielle DNS auf (Yamamoto et al., 1994). Für die Anwendung *in vivo* muss ein nicht an der Bindung beteiligtes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom ersetzt werden, da unmodifizierte ODNs schnell durch Nukleasen abgebaut werden. Diese Modifikation wird als Phosphorothioat-Modifikation bezeichnet und ist immunstimulatorisch aktiv. (Hartmann et al., 1996)

1.4.1.1. CpG-ODN-induzierte Signaltransduktion in der Zelle

Die durch CpG-ODNs induzierte Signaltransduktion läuft in zwei Phasen ab (Abbildung 1): Zuerst werden CpG-ODNs rasch von den Immunzellen aufgenommen, was möglicherweise mit Hilfe von Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3Ks) geschieht, und interagieren dann mit dem TLR9, der in endosomalen Kompartimenten präsentiert wird. (Hemmi et al., 2000; Ishii et al., 2002) Es ist davon auszugehen, dass TLR9 und CpG-ODN hier eine direkte Bindung eingehen (Bauer et al., 2001). Es kommt daraufhin zu einem Anschwellen und zu einer Ansäuerung der Endosomen sowie zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Diese Vorgänge sind für eine Immunstimulation durch CpG-ODNs entscheidend. Eine Inhibition der endosomalen Reifung durch Chloroquin oder andere Substanzen verhindert die Signaltransduktion. (Takeshita et al., 2001; Yi et al., 1998; Häcker et al., 1998)

Die Aktivierung von TLR9 führt in der zweiten Phase zu einer Rekrutierung der zytoplasmatischen Adapterproteine MyD88 (myeloid differentiation factor 88), IRAK1 (interleukin-1 receptor-activated kinase) und TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6). Diese Signalkaskade wird als MyD88-abhängig bezeichnet und kulminiert in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (nuclear factor κ B) und AP-1 (activating protein 1), welche dann die Transkription der Gene vermitteln, die zu einer Produktion der Zell-spezifischen, pro-inflammatorischen Zytokine führen. Des Weiteren werden ko-stimulatorische Moleküle wie CD (cluster of differentiation) 40, CD80 und CD86 hochreguliert und vermehrt auf den Immunzellen exprimiert. (Medzhitov, 2001; Klinman, 2004; Häcker et al., 2000)

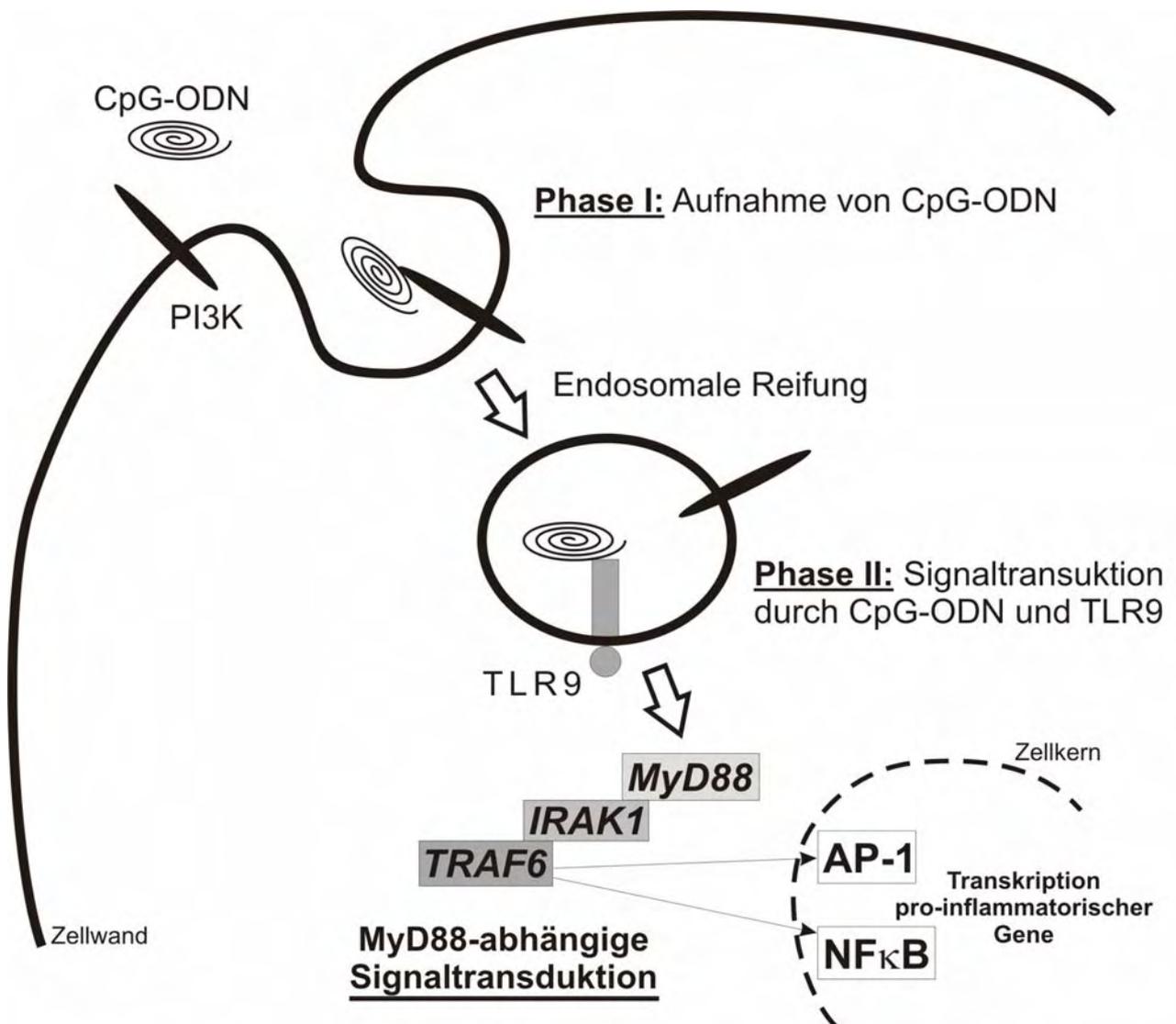


Abbildung 1: Die zwei Phasen der CpG-ODN-induzierten Signaltransduktion mit MyD88-abhängiger Aktivierung von Transkriptionsfaktoren

1.4.1.2 Wirkung von CpG-ODNs auf das Immunsystem

CpG-ODN wird als molekulares Muster für intrazelluläre Erreger (Bakterien oder Viren) erkannt und ruft direkt oder indirekt eine vielfältige, spezifische immunologische Antwort hervor. Die sehr starke Aktivierung von plasmazytoiden DZ nimmt hierbei eine Schlüsselrolle ein und vermittelt zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem, durch die induzierte Reifung, Differenzierung und Proliferation von NK- und T-Zellen. Die Ausschüttung von Typ I Interferonen, Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α) und Interleukin (IL-) 12 stimuliert NK-Zellen, die in der Folge INF- γ produzieren (Yamamoto et al., 2000).

B-Zellen als Teil des erworbenen Immunsystems werden durch CpG-ODN direkt stimuliert. Dies führt zu einer polyklonalen Proliferation dieser Zelllinie und CpG-ODN steigert synergistisch zusammen mit einem Antigen die Produktion von Antikörpern. Des weiteren sezernieren aktivierte B-Zellen IL-6 und IL-10. (Peng, 2005) Abhängig von der Spezies werden auch weitere Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten und Makrophagen durch CpG-ODN aktiviert (Dalpke und Heeg, 2004).

Gemeinsam erzeugen alle genannten Zellen ein pro-inflammatorisches (IL-1, IL-6, IL-18, TNF- α) und T-Helfer-1-Zellen (T_H1) -gewichtetes (IL-12, INF- γ) immunologisches Milieu. (Klinman, 2004) Diese Art der Immunmodulation macht verschiedene therapeutische Anwendungen für CpG-ODNs möglich (Krieg et al., 1999).

1.4.1.3 Therapeutische Nutzung von CpG-ODNs

In vielen Untersuchungen konnte eine therapeutische Aktivität bei Tumoren, Allergien und Infektionen nachgewiesen werden.

Durch CpG-ODNs stimulierte NK-Zellen sind verstärkt gegenüber Tumorgewebe aktiv (Carpentier et al., 1999). Zudem verstärkt diese Aktivierung der Immunzellen die Wirksamkeit von therapeutisch genutzten Antikörpern, wie sie zur Behandlung des follikulären Lymphoms (Rituximab) oder zur adjuvanten Therapie des kolorektalen Karzinoms (Endrecolomab) eingesetzt werden (Wooldridge et al., 1997). Im Rahmen der Vakzinierung gegen Tumoren unterstützt CpG-ODN die Immunisierung gegen Tumor-spezifische Antigene oder fördert die Reifung Tumorantigen-gepulster DZ *in vitro* (Brunner et al., 2000). Maligne Erkrankungen an

Nieren, Haut und Mamma sind durch die Behandlung mit CpG-ODN beeinflussbar (Jahrsdorfer und Weiner, 2003; Carpentier et al., 2003).

Da bei allergischen Erkrankung eine T-Helfer-2-Zellen (T_H2) –gewichtete Antwort überwiegt, ist CpG-ODN als Induktor einer T_H1 -gewichteten Immunreaktion auch in diesem Bereich therapeutisch nutzbar. In Tiermodellen konnte von Kline et al. (1998) eine Wirksamkeit bei der Behandlung von allergischem Asthma gezeigt werden.

Die Immunmodulation durch CpG-ODN schützt gegenüber einer Reihe an Infektionen mit Bakterien, Parasiten oder Viren (Dittmer und Olbrich, 2003). Zudem ist CpG-ODN ein potentes Vakzine-Adjuvans und führt als Zusatz zu herkömmlichen Impfstoffen zu einem schnelleren und effektiveren Schutz (Klinman, 2004). Dies konnte insbesondere bei der Impfung gegen Hepatitis B nachgewiesen werden. In Untersuchungen an Primaten konnten deutlich protektivere Antikörpertiter bei der Kombination von Hepatitis-B-Impfstoff Suspension (Engerix®-B) mit CpG-ODN erreicht werden (Hartmann et al., 2000; Davis et al., 2000). Ende 2004 wurde von Cooper et al. die erste klinische Phase I/II Studie beendet, in der diese Effekte am gesunden Menschen bestätigt werden konnten. Jetzt stehen Phase III Studien kurz bevor.

CpG-ODN ist sogar in hohen Dosen gut verträglich und war in bisherigen Studien ein nebenwirkungsarmes und sicheres Immuntherapeutikum (Jones et al., 1999; Klinman, 2004).

1.5 Lipopolysaccharide (LPS)

Vor 100 Jahren zeigte Richard Pfeiffer, dass abgetötete Bakterien in der Lage sind einen toxischen Schock auszulösen. Er war überzeugt, dass sich der Auslöser innerhalb der Bakterien befindet und bezeichnete ihn, in Abgrenzung zu dem bereits bekannten Exotoxin, als Endotoxin. Dieses Endotoxin wird heute seiner Substanzklasse nach auch als LPS bezeichnet und ist ein integraler Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (Alexander und Rietschel, 2001).

LPS besteht aus einer Poly- oder Oligosaccharid-Kette, die mit dem sogenannten Lipid A in der äußeren Zellmembran verankert ist. Das Lipid A ist die eigentliche immunstimulatorische Komponente und ist bei stark endotoxisch wirkenden LPS-Formen gleich. Die Saccharidkette hingegen ist artspezifisch und variiert daher sehr stark. (Schromm et al., 2000; Holst et al., 1996)

1.5.1 LPS-induzierte Signaltransduktion in der Zelle

Nachdem es zur Endotoxinämie gekommen ist, bindet LPS rasch an LBP (LPS-bindendes protein). Der resultierende Komplex hat eine hohe Affinität zu CD14. Dieser LPS-Rezeptor wird auf der Zelloberfläche präsentiert und verfügt über keine zytoplasmatische Domäne. Die weitere Signaltransduktion erfolgt daher mit Hilfe von TLR4 und einem Adaptermolekül. (Nagai et al., 2002) (Abbildung 2)

Analog zu der oben beschriebenen CpG-induzierten Signaltransduktion folgt eine MyD88-abhängige Signalkaskade. Hierbei werden die zytoplasmatischen Adapterproteine MyD88, IRAK1 und TRAF6 rekrutiert, was in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 kulminiert. (Medzhitov, 2001)

Überraschenderweise lässt sich bei MyD88-defizienten Mäusen weiterhin eine verzögerte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch den initialen Kontakt mit LPS nachweisen, was die Existenz von alternativen, MyD88-unabhängigen Signalkaskaden beweist. In der Folge wurde das Adapterprotein TIRAP (TIR domain-containing adapter protein) identifiziert (Horng et al., 2001). Dieses Molekül bindet ebenso wie MyD88 an TLR4 und ist für die Signalübertragung über IRAK1 und TRAF6 von Bedeutung (Yamamoto et al., 2002). Ein weiterer MyD88-unabhängiger Weg führt über die Adapterproteine TRIF (TIR domain-containing, adapter-inducing IFN- β protein) und TRAM (TRIF-related adapter molecule) zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 (interferon regulatory factor) (Fitzgerald et al., 2003).

Somit stimuliert LPS eine Vielzahl an Immunzellen zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α) und führt zur Hochregulation ko-stimulatorischer Moleküle wie CD40, CD80 und CD86. IRF3 vermittelt die Transkription von Genen, die für die Produktion von INF- β verantwortlich sind. Dieses Zytokin aktiviert durch Bindung an seinen Rezeptor den Transkriptionsfaktor STAT1 (signal transducers and activators of transcription), welcher wie auch NF- κ B chemotaktische Moleküle induziert.

Diese vielfältigen Aktivierungsmöglichkeiten durch LPS führen zu einer ausgeprägten generalisierten Entzündungsreaktion, die sich klinisch als systemisch inflammatorische Reaktion (SIRS) manifestiert.

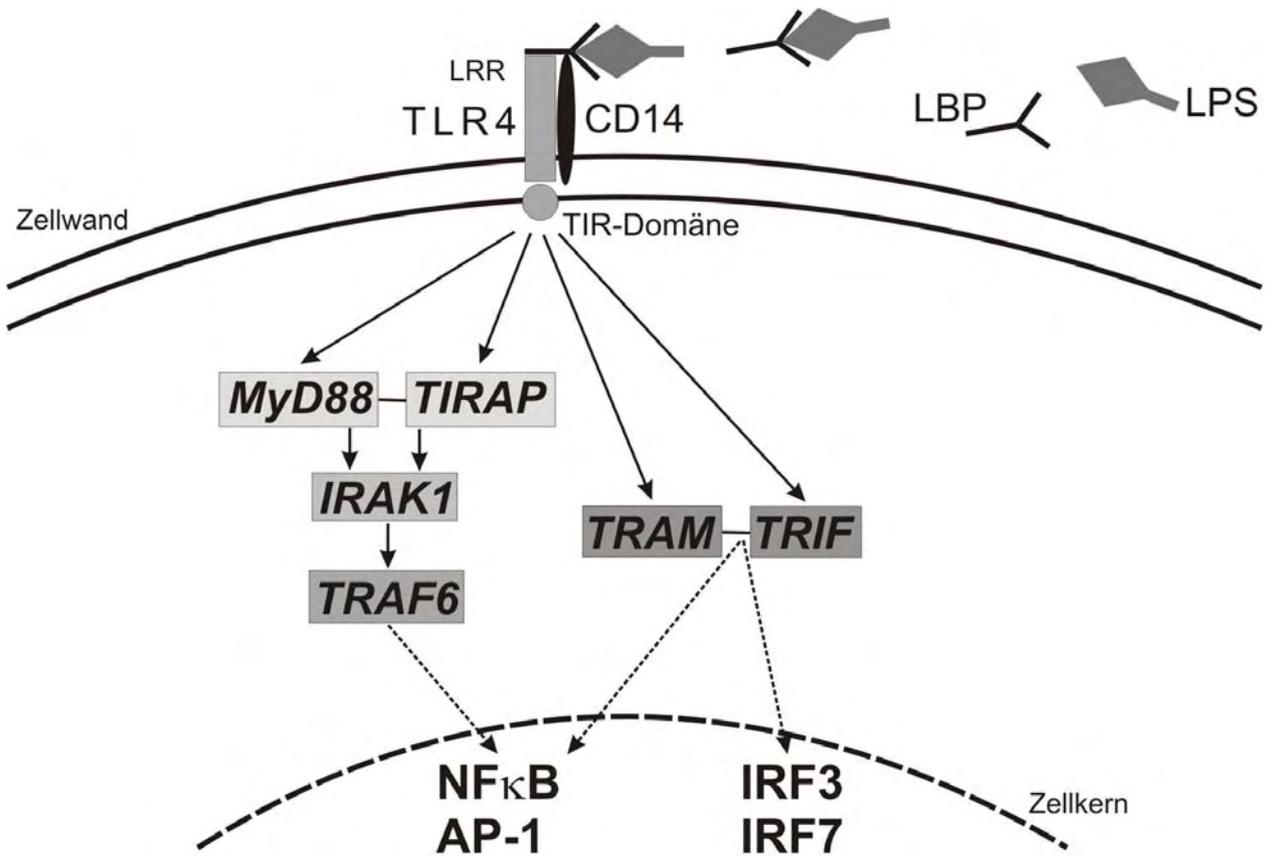


Abbildung 2: Die LPS-induzierte Signaltransduktion über MyD88-abhängige und MyD88-unabhängige Wege

1.5.2 Gram-negative Sepsis

SIRS, Sepsis und septischer Schock sind, trotz therapeutischer Fortschritte, weltweit die Haupttodesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen. Die Tendenz einen solchen schweren Krankheitsverlauf zu entwickeln, hängt dabei weniger vom Auslöser, als vielmehr von der Antwort des Immunsystems ab. Eine derart ausgeprägte Entzündungsreaktion wird durch Verbrennungen, physische Traumata und mikrobielle Invasion hervorgerufen. Die Gram-negative Bakteriämie mit der folgenden Endotoxinämie ist die häufigste Ursache für das

Auftreten einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks, in deren Folge es zu einer entzündungsbedingten Schädigung multipler Organe kommt (Brun-Buisson et al., 1995).

LPS führt durch die geschilderten Mechanismen zu einer überschießenden und sich selbst erhaltenden Entzündungsreaktion. Es kommt zu einer Schädigung der körpereigenen Zellen. TNF- α induziert zum Beispiel die Freisetzung großer Mengen an Sauerstoffradikalen, die zu Gewebeschäden führen (Sikora, 2002). Die vermehrte Präsentation von Adhäsionsmolekülen führt zur Bindung neutrophiler Granulozyten an Endothelzellen, die daraufhin durch proteolytische Enzyme geschädigt werden. Das zerstörte Endothel lässt nun eine Infiltration des Gewebeparenchyms durch Plasmaprodukte und Entzündungsmediatoren zu, was zu multiplen Organdysfunktionen führt. (Rivkind et al., 1991) Des Weiteren kommt es durch die Endothelschäden in der Endstrombahn zur Mikroziirkulationsstörung und damit zur verminderten Gewebeoxygenierung, was wiederum eine Organdysfunktion begünstigt (Vincent et al., 1990). Da die Makroziirkulation initial nicht beeinträchtigt ist, wird der septische Schock als hyperdynamisches Schocksyndrom bezeichnet. Hierbei ist das Herzzeitvolumen aufgrund einer erhöhten Sympathikuswirkung und später durch kompensatorische Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems gesteigert. Ferner sind die präkapillären Arteriolen enggestellt und die arteriovenösen Kurzschlussgefäße geöffnet. Erst bei Versagen dieser gegenregulatorischen Mechanismen geht der septische Schock in eine hypodynamische Form über. In der Folge verstärken sich die Organdysfunktionen durch die Zentralisation des Kreislaufs.

Lebensbegrenzende Schockkomplikationen manifestieren sich in erster Linie als akutes Nieren- oder Lungenversagen. Die zusätzliche Kompromittierung von Herz, Leber und Gastrointestinaltrakt im Rahmen des Schockgeschehens führt zu einem komplexen und nur schwer beherrschbaren Syndrom.

Lediglich die symptomatische Therapie der Organdysfunktionen konnte in den letzten Jahren die Letalität der Sepsis senken (Friedmann et al., 1998). Ein modernes hämodynamisches Management, neue Beatmungsstrategien, frühzeitige extrakorporale Nierenersatz- oder Leberunterstützungsverfahren sowie die generelle Weiterentwicklung der Intensivmedizin und der Einsatz verbesserter Antibiotika spielten hierbei eine wesentliche Rolle. Um jedoch den geschilderten Gewebeschaden zu verringern oder sogar zu verhindern ist ein frühzeitiges Eingreifen in die immunologische Kaskade von Nöten.

Unter Berücksichtigung der Pathophysiologie wurden verschiedene Strategien entwickelt, wie zum Beispiel antientzündliche Antikörper gegen LPS oder Zytokine. Diese Ansätze mussten jedoch wegen fehlender Erfolge in Phase III Studien verworfen werden (Deitsch, 1998). Eine weitere Strategie fokussierte sich auf die unerwünschte Aktivierung der endogenen Gerinnungskaskade. Tatsächlich senkte die Therapie mit rekombinantem aktiviertem Protein C

(aktiviertes Drotrecogin alfa) in einer grossen, internationalen, randomisierten, doppel-blind Studie (PROWESS) die Letalität (Bernard et al., 2001). Weiterführende Analysen der Subgruppen und die ADDRESS-Studie relativierten jedoch die positiven Ergebnisse und führten zu einer eingeschränkten Empfehlung in den aktuellen Leitlinien zur Therapie der Sepsis (Angus et al., 2004; Abraham et al., 2005; Reinhart et al., 2005).

1.5.3 Die LPS-Toleranz

Die prophylaktische Gabe von klinisch ungefährlichen Dosen Endotoxin erzeugte in einer Vielzahl von Studien einen Schutz gegenüber der entzündungsbedingten Schädigung bei einer erneuten LPS-Exposition. Dieses Phänomen wird als LPS- oder Endotoxin-Toleranz bezeichnet und wird seit Jahrzehnten intensiv untersucht. (Lehner und Hartung, 2002)

Pathophysiologisch können zwei Phasen unterschieden werden. Innerhalb von wenigen Stunden entwickelt sich, unabhängig von dem Endotoxin, das zur Desensibilisierung benutzt wurde, eine Toleranz, die zu einer abgeschwächten Reaktion gegenüber der gesamten Substanzklasse der LPS führt. Diese unspezifische Toleranz resultiert unter anderem aus einer verminderten Präsentation von TLR4 auf der Zelloberfläche von Immunzellen und verschwindet nach einigen Tagen (Nomura et al., 2000). Danach beschränkt sich die Toleranzentwicklung auf das LPS, welches während der Vorbehandlungsphase benutzt wurde. Diese späte Phase basiert auf der Bildung von LPS-spezifischen Antikörpern. (Johnston und Greisman, 1985)

Die reduzierte Ausschüttung von IL-6 und anderen Mediatoren im Rahmen der LPS-Toleranz ist eine gut belegte Tatsache und wurde beim Menschen sowie bei zahlreichen anderen Spezies *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen. Ein Schutz gegenüber der entzündungsbedingten Zerstörung der Leber konnte von Freudenberg und Galanos (1988) gezeigt werden, die zudem eine Senkung der Letalität im Tiermodell erreichten. Diese Ergebnisse wurden durch viele andere Untersuchungen an Mäusen und Ratten bestätigt, was zu der Idee führte, das Phänomen der LPS-Toleranz zur Bekämpfung von Infektionen zu nutzen. Tatsächlich schützt eine Vorbehandlung mit Endotoxin in mehreren Studien gegen eine nachfolgende Infektion mit einer Vielzahl an Erregern. (Lehner und Hartung, 2002)

Eine klinische Einführung und therapeutische Nutzung von LPS zur Prophylaxe von SIRS, Sepsis und septischem Schock verbietet sich jedoch, da ein breites Spektrum von Nebenwirkungen nach der Applikation bekannt ist. Endotoxin verursacht eine unkalkulierbare Immunstimulation, die klinisch sowohl inapparent bleiben kann, als auch in der Lage ist, zum

Vollbild eines SIRS mit Multiorganversagen zu führen. Die Nutzung von synthetischem Lipid A oder von anderen ungiftigen Induktoren einer Endotoxin-Toleranz könnte einen Lösungsansatz darstellen. (Lehner und Hartung, 2002)

1.6 Kreuz-Toleranzen verschiedener Toll-like Rezeptoren

Analog zur LPS-Toleranz führt die repetitive Stimulation verschiedener TLRs mit ihrem eigenen Liganden ebenfalls zu einer Abschwächung der immunologischen Antwort. Diese Toleranzentwicklung konnte neben TLR4 für die Liganden von TLR2 (plus TLR1 oder TLR6), TLR3, TLR5, TLR7 und TLR9 *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden (Sato et al., 2000, 2002; Mizel und Snipes, 2002; Yeo et al., 2003). Darüber hinaus zeigten sich bei verschiedenen TLRs Kreuz-Toleranzen. So führt die *in vitro*-Stimulation von TLR2, TLR4 oder TLR9 zu Toleranz und Kreuz-Toleranz gegenüber einer erneuten Aktivierung von einem der drei TLRs (Dalpke et al., 2005). Sato et al. konnten 2002 nachweisen, dass TLR3 und TLR7 eine Kreuz-Toleranz bezüglich TLR4 vermitteln.

1.7 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Untersuchung der Effekte eines CpG-Motivs in einem Endotoxinämie-Modell der Ratte. Es soll geklärt werden, ob das genutzte CpG-ODN eine Toleranz bezüglich einer nachfolgenden Endotoxinämie, analog dem bekannten Phänomen der Endotoxin-Toleranz, induziert.

Im ersten Studienabschnitt wird der Einfluss auf die Letalität und die Überlebenszeitverteilung untersucht. Im zweiten Studienabschnitt erfolgt dann die Qualifizierung und Quantifizierung anhand verschiedener Parameter, wie zum Beispiel der Zytokinausschüttung, der Blutbildveränderungen, der histopathologischen Begutachtung der Zielorgane und deren Gewichtsveränderungen.

2. Material und Methoden

2.1. Lipopolysaccharid

Für alle Versuche wurde das mit Trichloressigsäure (TCA) extrahierte LPS von *E. coli* Serotyp O111:B4 der Firma Sigma-Aldrich, München verwendet.

Das lyophilisierte Endotoxin wurde in steriler 0,9%iger isotonischer Kochsalzlösung der Firma Fresenius Kabi, Bad Homburg gelöst und auf eine Konzentration von 10 mg/ml verdünnt. Die Lösung wurde in Aliquots bei -30°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.2 Oligodeoxynukleotide

Die verwendeten ODNs waren phosphorothioat-modifiziert, einzelsträngig und hatten eine Länge von 20 Basen. Sie wurden von der Firma MWG Biotec AG, München synthetisiert, HPSF (High Purity Salt Free) -gereinigt und in lyophilisierter Form geliefert.

Die Sequenz des CpG-ODN war 5'- TTC ATG ACG TTC CTG ATG CT -3' und enthielt eines der immunstimulatorisch aktivsten CpG-Motive: GACGTT (Weighardt et al., 2000; Krieg et al., 1995).

Die Sequenz des Kontroll-ODN war 5'- GCT TGA TGA CTC AGC CGG AA -3' und wurde ausgewählt, da es keine effektiven CpG-Motive enthält und in verschiedenen Studien keinerlei biologische Aktivität zeigte (Weighardt et al., 2000).

Die lyophilisierten ODNs wurden in Aqua_{bidest.} gelöst und auf eine Konzentration von 60 nmol/ml beziehungsweise 240 nmol/ml verdünnt. Die Lösungen wurden aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -30°C gelagert.

2.3 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Sprague Dawley Ratten der Firma Harlan-Winkelmann, Borcheln mit einem Körpergewicht (KG) von 300 ± 50 g am Tag der ODN-Applikation verwendet.

Die Tiere lebten unter standardisierten Bedingungen in einzelnen Käfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Nahrung.

Die Durchführung der Experimente richtete sich nach den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) und nach den Leitlinien für Tierversuche der *National Institutes of Health* (NIH). Der Tierversuchsantrag wurde durch die Tierschutzkommission der Bezirksregierung Köln begutachtet und in der Folge von der Behörde genehmigt. Die Versuche wurden vor Ort durch das Veterinäramt der Stadt Bonn und den Tierschutzbeauftragten des Universitätsklinikums Bonn überwacht.

2.4 Studienprotokoll

Falls nicht anders vermerkt, erfolgte die Einleitung der Narkose durch intramuskuläre Injektion von 2 mg/kg KG Xylazin (Rompun®, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen) und 90 mg/kg KG Ketamin (Ketavet®, Bayer AG, Leverkusen).

2.4.1 Ermittlung der Letalitätsdosen

47 Ratten wurde LPS in verschiedenen Dosierungen pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) injiziert.

In der Folge wurden die Tiere über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet.

Das Ziel dieses Studienabschnittes war die Ermittlung einer LPS-Dosis bei der eine Letalität von 80% erreicht wird (Letalitätsdosis₈₀, LD₈₀). Die LD₈₀ wurde benötigt, da im folgenden Studienabschnitt der Einfluss einer Vorbehandlung mit ODNs auf die Letalität untersucht werden sollte.

Des Weiteren musste eine Dosis gefunden werden, bei der trotz deutlicher Krankheitszeichen kein tödlicher Verlauf resultiert (LD₀). Diese LD₀ wurde im dritten Studienabschnitt genutzt, um eine kontrollierte Materialgewinnung zu ermöglichen.

2.4.2 Letalität der Endotoxinämie nach Vorbehandlung mit ODNs

116 Ratten wurden randomisiert und in 8 Gruppen aufgeteilt (Tabelle 1).

Es folgte die i.p. Injektion von CpG- oder Kontroll-ODN in einer Dosierung von 12 oder 48 nmol. 8 Stunden oder 7 Tage später erfolgte dann die Induktion der Endotoxinämie durch einen i.p. Bolus von 25 mg/kg KG LPS (=LD₈₀).

In der Folge wurden die Tiere über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet und die Letalität dokumentiert.

Zeit bis zur LPS- Applikation	ODN Dosis		12 nmol	48 nmol
	ODN Typ			
8 Stunden	CpG		<i>n</i> =10	<i>n</i> =10
	Kontrolle		<i>n</i> =10	<i>n</i> =10
7 Tage	CpG		<i>n</i> =19	<i>n</i> =19
	Kontrolle		<i>n</i> =19	<i>n</i> =19

Tabelle 1: Studienprotokoll zur Dokumentation der Letalität und der Überlebenszeiten.

2.4.3 Materialgewinnung nach Applikation von ODN und LPS

72 Ratten wurden randomisiert und in 12 Gruppen aufgeteilt (Tabelle 2).

Es folgte die i.p. Injektion von 12 nmol CpG- oder Kontroll-ODN. 8 Stunden oder 7 Tage später erfolgte dann die Induktion der Endotoxinämie durch einen i.p. Bolus von 10 mg/kg KG LPS (=LD₀).

Nach weiteren 3, 12 oder 36 Stunden wurden die Tiere mit einer überdosierten Narkose (10 mg/kg KG Xylazin und 50 mg/kg KG Ketamin) schmerzfrei getötet, um in der Folge Blutproben zu gewinnen und Organe zu entnehmen.

Zeit bis zur LPS- Applikation	ODN Typ	Zeitpunkte nach LPS-Applikation (Stunden)		
		3	12	36
8 Stunden	CpG	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6
	Kontrolle	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6
7 Tage	CpG	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6
	Kontrolle	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6

Tabelle 2: Studienprotokoll zur Materialgewinnung.

Nach der Sternotomie erfolgte die intrakardiale Blutentnahme. Es wurde eine 2,7 ml EDTA K-Monovette® der Firma Sarstedt AG & Co, Nümbrecht befüllt. Die Trachea wurde direkt unterhalb des Larynx abgesetzt und die Lungen konnten *en bloc* mit der Luftröhre entnommen werden. Nach medianer Laparotomie wurden Leber und Milz entnommen.

2.5 Auswertung der Blutproben

Das gewonnene Ethylendiamintetraacetat (EDTA) -Vollblut wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Bonn mit einem elektronischen Zellzählgerät der Firma Sysmex GmbH, Norderstedt ausgewertet. Es wurden Blutbilder mit Werten für Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten erstellt.

2.6 Untersuchung der Lungen

Aus jeder Gruppe wurde eine der 6 Lungen zufällig ausgewählt und zur histopathologischen Untersuchung vorbereitet. Bei den übrigen 5 wurde das Lungen-Nassgewicht bestimmt und eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt.

2.6.1 Bestimmung der Lungen-Nassgewichte

Direkt nach der Entnahme wurden die Lungen von anhaftendem Gewebe befreit und komplett mit den extrapulmonalen Abschnitten des Bronchialsystems und der Trachea gewogen. Nachdem die BAL wie unten beschrieben durchgeführt worden war, konnten die beiden Hauptbronchien an den Hili abgesetzt werden. Das Gewicht von Hauptbronchien und Trachea wurden bestimmt und von dem zuvor ermittelten Gesamtgewicht abgezogen. Die Differenz entspricht dem reinen Lungen-Nassgewicht ohne extrapulmonales Gewebe.

Bei der Berechnung des Verhältnisses von Lungen-Nassgewicht zu Körpergewicht wurde das Körpergewicht am Tag der ODN-Applikation verwendet.

2.6.2 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Zur Durchführung der BAL wurde eine 14 Gauge Venenverweilkanüle der Firma B.Braun AG, Melsungen ohne Mandrin in die Trachea eingeführt. Daraufhin erfolgten 5 Spülungen mit je 8 ml steriler 0,9%iger isotonischer Kochsalzlösung, sodass insgesamt circa 30 ml Lavage-Flüssigkeit gewonnen wurde.

Nachdem die BAL-Flüssigkeit für 10 Minuten mit 1000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C zentrifugiert worden war, konnten die Überstände in Aliquots bis zur weiteren Untersuchung bei -30°C gelagert werden.

2.6.3 Messung von IL-6 in BAL-Flüssigkeit

Zur Messung der IL-6 Werte in den Überständen der BAL-Flüssigkeit wurde ein hochspezifisches Quantikine® M Ratten IL-6 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) der Firma R&D Systems GmbH, Wiesbaden verwendet.

Bei diesem Testsystem erfolgt der quantitative IL-6-Nachweis mit Hilfe eines auf einer Mikrotitrierplatte immobilisierten zytokinspezifischen Antikörpers (Capture-Antikörper), an den das in den Überständen vorhandene IL-6 bindet. (Abbildung 3) Nach Auswaschen aller ungebundenen Substanzen wird ein zytokinspezifischer, enzymmarkierter Detektionsantikörper hinzugegeben, der ebenfalls eine Bindung mit IL-6 eingeht. Die ungebundenen Überreste der Reagenz werden ausgewaschen und eine Substratlösung wird in die Mikrotitrierplatte pipettiert. Das Enzym setzt in der Folge solange das farblose Substrat in ein farbiges Produkt um, bis die Stop-Lösung hinzugegeben wird. Die resultierende Farbintensität ist proportional zur Menge an gebundenem IL-6.

Die einzelnen Schritte des Testsystems wurden nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt und die Messung der Extinktion erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm.

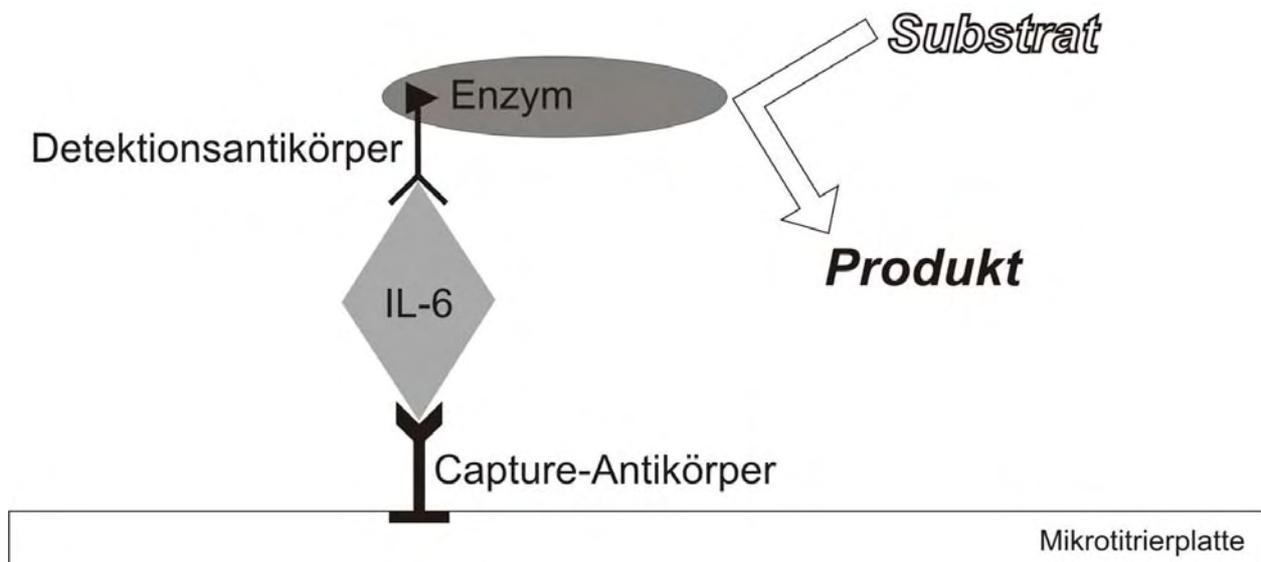


Abbildung 3: Das ELISA – Prinzip.

2.7 Untersuchung von Leber und Milz

Direkt nach der Entnahme wurden Leber und Milz von anhaftendem Gewebe befreit. Die zu- und abführenden Strukturen wurden an den Hili abgesetzt und die Organe wurden gewogen. Bei der Berechnung des Verhältnisses von Organ-Nassgewicht zu Körpergewicht wurde das Körpergewicht am Tag der ODN-Applikation verwendet.

2.8 Histopathologische Untersuchung

Die entnommenen Organe (Lungen, Leber, Milz) wurden umgehend für mindestens 4 Tage in 4%iger gepufferter Formalinlösung fixiert und bis zur weiteren Verarbeitung kühl gelagert.

2.8.1 Anfertigung von Schnittpräparaten

Zur Anfertigung histologischer Präparate wurden die Organe in einer aufsteigenden Isopropanolreihe entwässert und über das Intermedium Methylbenzoat ganz oder teilweise in flüssiges Paraffin eingebettet. Nach dem Aushärten konnten die in den Paraffinblöckchen enthaltenen Proben mit einem Mikrotom auf eine Dicke von 3 µm geschnitten und auf Objektträger verbracht werden. Danach wurden die Schnitte getrocknet und es folgte die Hämatoxylin-Eosin (HE) –Färbung.

Hierzu wurden die Präparate mit Alkohol entparaffiniert und in Hämatoxylin gefärbt. Nach der Spülung mit Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit Eosin. Abschließend wurden die Schnitte erneut mit Isopropanol entwässert und eingedeckt.

Die erforderlichen Chemikalien wurden von der Firma Medite GmbH, Burgdorf bezogen.

2.8.2 Auswertung der Schnittpräparate

Nach der Gewebeaufbereitung erfolgte die lichtmikroskopische Untersuchung der Präparate und die fotografische Dokumentation ausgewählter Befunde. Hierzu wurde ein Lichtmikroskop der Firma Olympus, Hamburg genutzt, das mit einer digitalen Kamera ausgestattet war. Die Ergebnisse wurden abschließend von einer erfahrenen Fachärztin für Pathologie validiert.

2.9 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von SPSS® 12.0 für Microsoft Windows® und Microsoft Excel® 2000 durchgeführt.

Die Überlebenszeiten der LD₈₀-, Kontroll-ODN und CpG-ODN-Gruppen wurden im Kaplan-Meier-Verfahren dargestellt. Die Überlebenszeitverteilung wurde daraufhin mit dem Log-rank Test (Cox-Mantel) verglichen und auf signifikante Unterschiede überprüft.

Um die Mittelwerte der Organgewichte, der Blutbild-Parameter und der IL-6-Werte miteinander zu vergleichen, wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (U-Test) benutzt. Zum Vergleich der Mittelwerte an verschiedenen Zeitpunkten wurde zusätzlich eine Varianzanalyse (ANOVA) mit *post hoc* LSD (Least Significant Difference) -Testung durchgeführt. p-Werte <0,05 wurde als signifikant gewertet.

Es wurden Diagramme zur Verdeutlichung der Ergebnisse erstellt. Hierbei werden alle Werte als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Letalitätsdosen

Insgesamt 47 Ratten wurden verschiedenen Dosierungen pro Kilogramm Körpergewicht LPS i.p. appliziert. Die Tiere wurden danach für 7 Tage beobachtet.

Bei einer Dosierung von 25 mg/kg KG verstarben in dieser Zeit 8 von 10 Ratten. Somit entspricht diese Dosis der gesuchten LD₈₀. Bei einer Dosierung von 10 mg/kg KG erkrankten die Tiere, aber die Endotoxinämie führte nicht zum Tod. Diese Dosis entspricht der LD₀.

3.2 Natürlicher Verlauf der Endotoxinämie

In der initialen Phase der Endotoxinämie (0-12 Stunden) war bei den Ratten sowohl bei LD₀ als auch bei LD₈₀ eine Tachypnoe und Bewegungsarmut zu beobachten. Ab Stunde 12 nach LPS-Applikation entwickelte sich zudem eine progrediente hämorrhagische Konjunktivitis und Rhinitis. Innerhalb des ersten Tages verstarben in der LD₈₀ Gruppe bereits 5 von 10 Tieren. Weitere 3 Ratten verstarben innerhalb der nächsten vier Tage. (Abbildung 4) Vor dem Exitus letalis waren bei den Tieren eine verstärkte Atemarbeit und deutlich hörbare feuchte Atemgeräusche sowie ein schaumiger Nasenausfluss und teilweise perianaler Blutabgang zu beobachten.

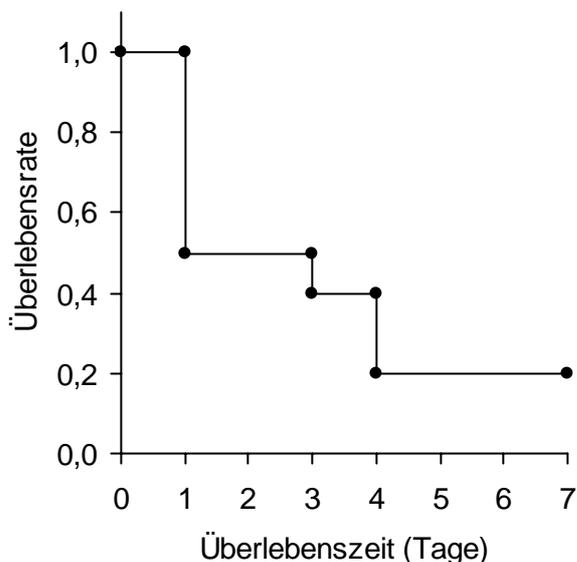


Abbildung 4:

Überlebensrate von Ratten nach Induktion einer Endotoxinämie durch i.p. Injektion von 25 mg/kg KG LPS (LD₈₀). (n=10)

3.3 Letalität der Endotoxinämie nach Vorbehandlung mit ODNs

Die i.p. Injektion von 12 oder 48 nmol CpG-ODN, 8 Stunden oder 7 Tage vor Induktion der Endotoxinämie durch einen i.p. Bolus von 25 mg/kg KG LPS (=LD₈₀), erbrachte gegenüber den Kontrollgruppen keine statistisch signifikante Änderung der Letalität innerhalb der folgenden 7 Tage. (Tabelle 3)

Zeit bis zur LPS- Applikation	ODN Dosis		12 nmol	48 nmol
	ODN Typ			
8 Stunden	CpG		90%	100%
	Kontrolle		80%	80%
7 Tage	CpG		68%	63%
	Kontrolle		53%	68%

Tabelle 3: Letalität von Ratten nach i.p. Applikation von 25 mg/kg KG LPS (=LD₈₀) und vorausgegangener i.p. Injektion von CpG- oder Kontroll-ODN in verschiedenen Dosierungen. Die Tiere wurden für sieben Tage beobachtet. (8 Stunden-Gruppen: $n=10$, 7 Tage-Gruppen: $n=19$)

Ein genauerer Vergleich der Überlebenszeitverteilungen zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den CpG- und Kontroll-ODN-Gruppen (Abbildung 5). Auch gegenüber dem oben beschriebenen natürlichen Verlauf der Endotoxinämie (Abbildung 4) konnte für keine Gruppe ein statistisch relevanter Unterschied nachgewiesen werden.

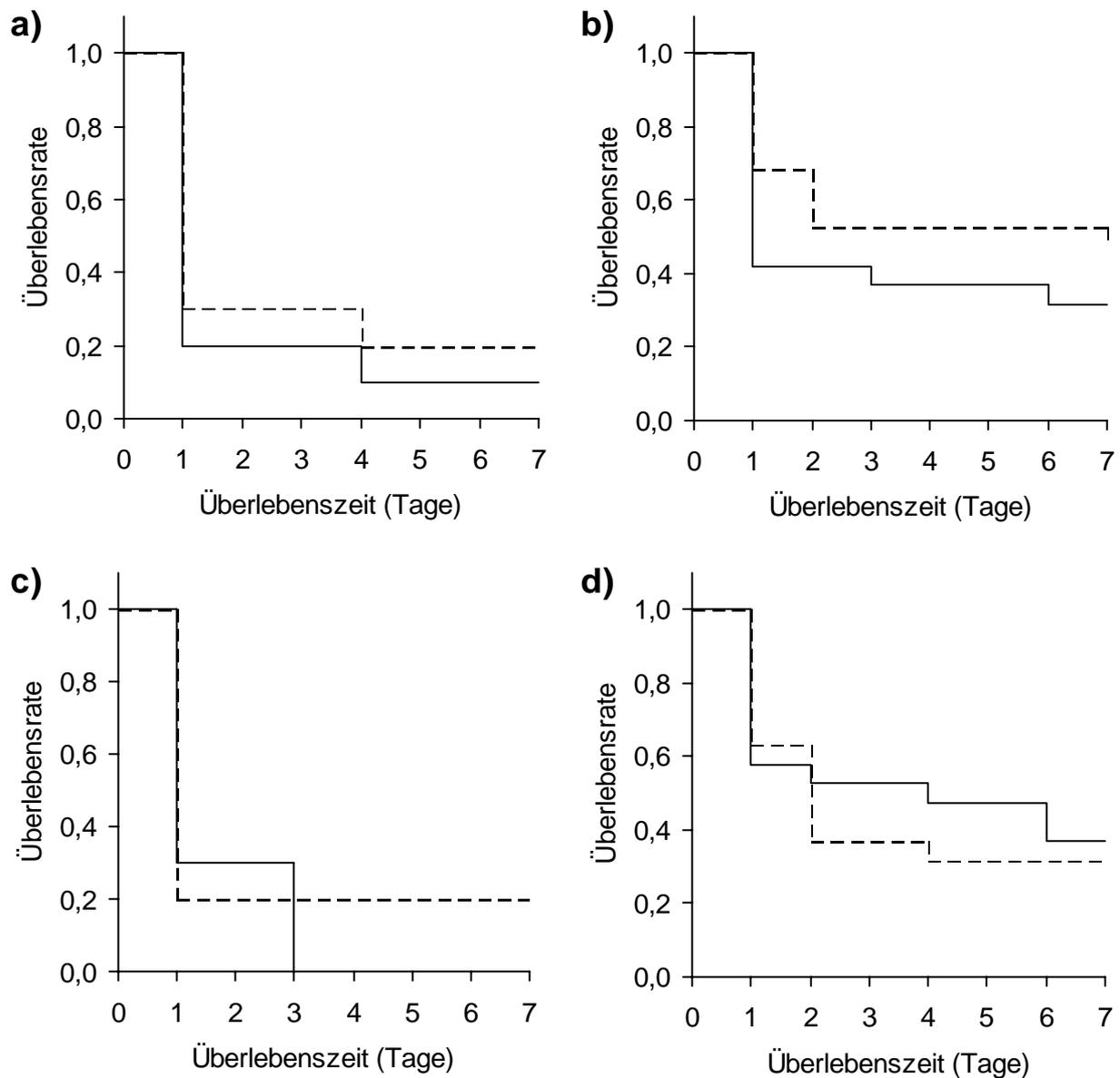


Abbildung 5: Überlebensraten von Ratten nach i.p. Applikation von 25 mg/kg KG LPS (=LD₈₀) und vorausgegangener (Abb. **a**) und **c**): 8 Stunden-Gruppen, $n=10$; **b**) und **d**): 7 Tage-Gruppen, $n=19$) i.p. Injektion von CpG- oder Kontroll-ODN in verschiedenen Dosierungen (Abbildung **a**) und **b**): 12 nmol, **c**) und **d**): 48 nmol). Mit einer durchgezogenen Linie sind die CpG-ODN-Gruppen dargestellt, mit einer gestrichelten Linie die Kontroll-ODN-Gruppen.

3.4 Blutbilder

3.4.1 Leukozyten

In allen Gruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Leukozyten nach der Applikation von LPS (von der 3. zur 36. Stunde im Mittel aller Gruppen von $2,28 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ auf $9,45 \cdot 10^3/\mu\text{l}$). Insbesondere die Steigerung der Werte von der 3. zur 12. Stunde nach LPS Injektion war in allen Gruppen deutlich signifikant (p-Werte $<0,012$). Der Anstieg setzte sich in den Kontroll-ODN-Gruppen von der 12. zur 36. Stunde signifikant fort (p-Werte $<0,029$). In den CpG-ODN-Gruppen war die Steigerung der Werte ebenfalls erkennbar, aber bei hoher Standardabweichung nicht signifikant.

Ein signifikanter Unterschied zwischen einer CpG- und Kontroll-ODN-Gruppe konnte lediglich 12 Stunden nach LPS-Applikation in den 7 Tage-Gruppen nachgewiesen werden. Hier waren die gemessenen Werte für Leukozyten in der Kontroll-ODN-Gruppe ($6,69 \pm 0,39 \cdot 10^3/\mu\text{l}$) signifikant höher als die in der CpG-ODN-Gruppe ($4,27 \pm 0,87 \cdot 10^3/\mu\text{l}$, $p=0,011$). Dieser Unterschied war in der 36. Stunde nicht mehr nachweisbar. (Abbildung 6)

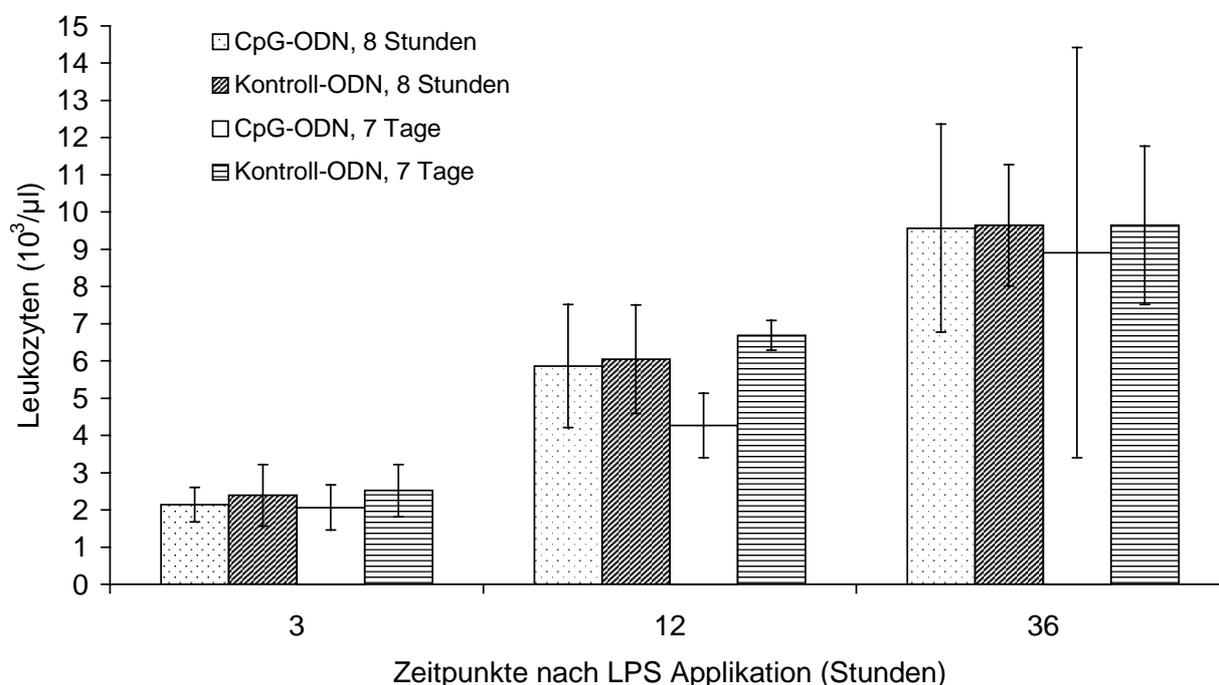


Abbildung 6: Leukozyten im Blut von Ratten 3, 12 und 36 Stunden nach i.p. Applikation von 10 mg/kg KG LPS (=LD₀) und 8 Stunden bzw. 7 Tage vorausgegangener i.p. Injektion von 12 nmol CpG- oder Kontroll-ODN. ($n=6$)

3.4.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten fielen in allen Gruppen nach der Applikation von LPS von der 3. zur 12. Stunde ab (im Mittel aller Gruppen von $264 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ auf $71 \cdot 10^3/\mu\text{l}$). Lediglich bei einer Gruppe (Kontroll-ODN, 8 Stunden) konnte bei hoher Standardabweichung keine Signifikanz nachgewiesen werden (alle anderen Gruppen: p-Werte $<0,02$). Von der 12. zur 36. Stunde stieg in einer Gruppe (CpG-ODN, 7 Tage) der Mittelwert wieder an (von $49 \pm 37 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ auf $184 \pm 235 \cdot 10^3/\mu\text{l}$). Es zeigte sich jedoch eine hohe Standardabweichung und eine Signifikanz war nicht nachweisbar. Die Werte aller anderen Gruppen fielen von der 12. zur 36. Stunde signifikant ab (im Mittel der Gruppen von $78 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ auf $9 \cdot 10^3/\mu\text{l}$, p-Werte $<0,017$).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den CpG- und den Kontroll-ODN-Gruppen konnte nicht nachgewiesen werden. (Abbildung 7)

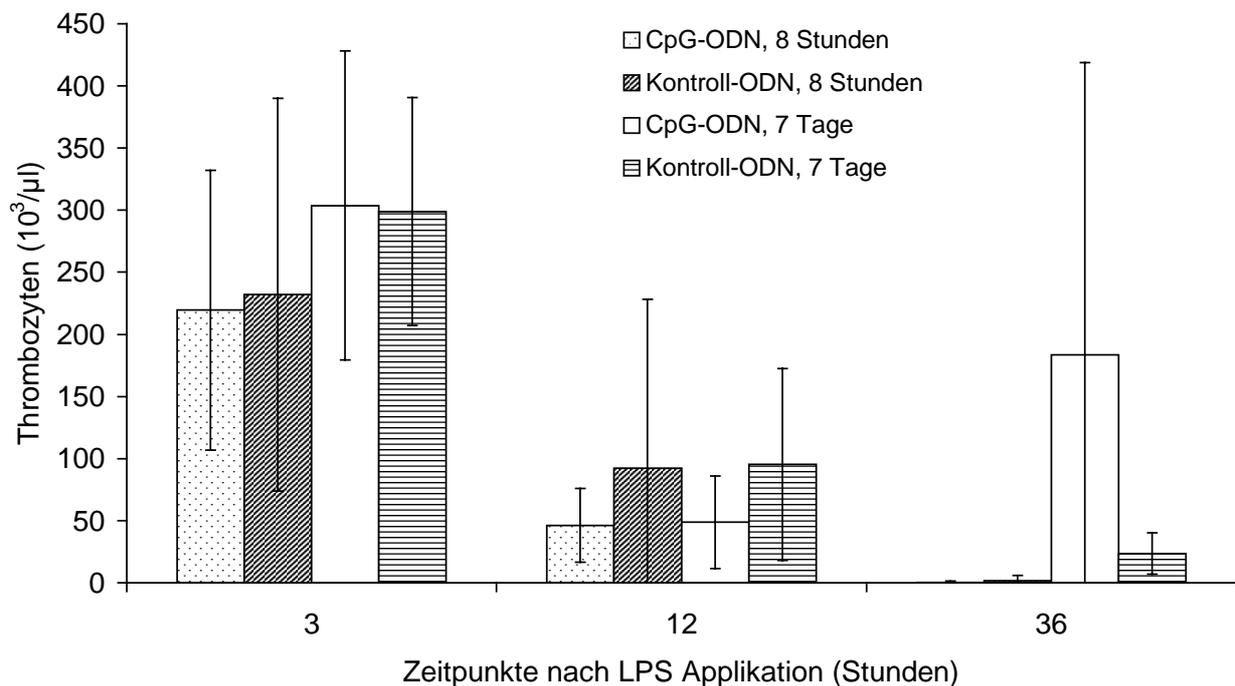


Abbildung 7: Thrombozyten im Blut von Ratten 3, 12 und 36 Stunden nach i.p. Applikation von 10 mg/kg KG LPS (=LD₀) und 8 Stunden bzw. 7 Tage vorausgegangener i.p. Injektion von 12 nmol CpG- oder Kontroll-ODN. (n=6)

3.4.3 Erythrozyten

Von der 3. zur 12. Stunde konnte keine signifikante Änderung der Werte für Erythrozyten nachgewiesen werden. In zwei Gruppen (CpG- und Kontroll-ODN, 8 Stunden) fielen die Mittelwerte von der 12. zur 36. Stunde signifikant ab (im Mittel der zwei Gruppen von $8,71 \cdot 10^6/\mu\text{l}$ auf $7,73 \cdot 10^6/\mu\text{l}$, p-Werte $<0,029$).

Ein signifikanter Unterschied zwischen einer CpG- und Kontroll-ODN-Gruppe konnte lediglich 12 Stunden nach LPS-Applikation in den 7 Tage-Gruppen nachgewiesen werden. Hier waren die gemessenen Werte für Erythrozyten in der Kontroll-ODN-Gruppe ($8,43 \pm 0,32 \cdot 10^6/\mu\text{l}$) signifikant höher als die in der CpG-ODN-Gruppe ($7,91 \pm 0,09 \cdot 10^6/\mu\text{l}$, $p=0,011$). Dieser Unterschied war in der 36. Stunde nicht mehr nachweisbar. (Abbildung 8)

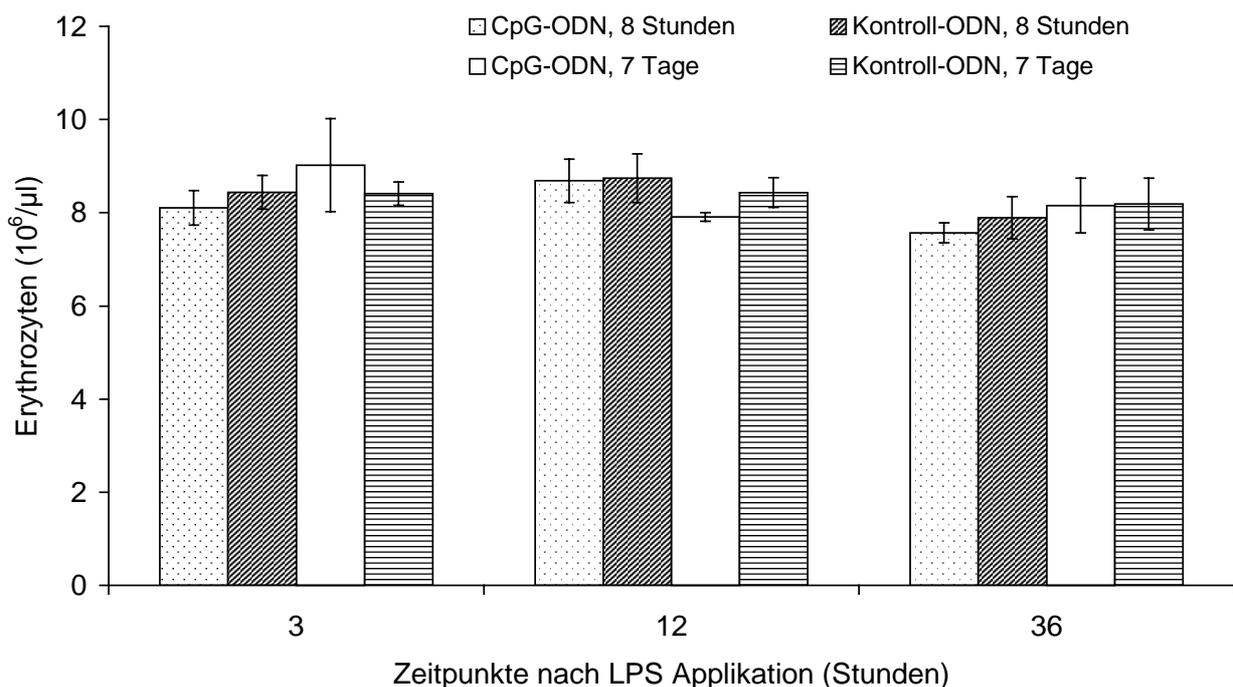


Abbildung 8: Erythrozyten im Blut von Ratten 3, 12 und 36 Stunden nach i.p. Applikation von 10 mg/kg KG LPS (=LD₀) und 8 Stunden bzw. 7 Tage vorausgegangener i.p. Injektion von 12 nmol CpG- oder Kontroll-ODN. (n=6)

3.4.4 Hämoglobin

Analog zum Verlauf der Erythrozyten verhielten sich auch die Hämoglobinwerte. Es konnte keine signifikante Änderung von der 3. zur 12. Stunde nachgewiesen werden. In zwei Gruppen (CpG- und Kontroll-ODN, 8 Stunden) fielen die Mittelwerte von der 12. zur 36. Stunde signifikant ab (im Mittel der zwei Gruppen von 17,2 g/dl auf 15,0 g/dl, p-Werte <0,02).

Ein signifikanter Unterschied zwischen einer CpG- und Kontroll-ODN-Gruppe konnte, wie bei den Erythrozyten, lediglich 12 Stunden nach LPS-Applikation in den 7 Tage-Gruppen nachgewiesen werden. Hier waren die gemessenen Hämoglobinwerte in der Kontroll-ODN-Gruppe ($15,9 \pm 0,3$ g/dl) signifikant höher als die in der CpG-ODN-Gruppe ($15,1 \pm 0,3$ g/dl, $p=0,01$). Dieser Unterschied war in der 36. Stunde nicht mehr nachweisbar. (Abbildung 9)

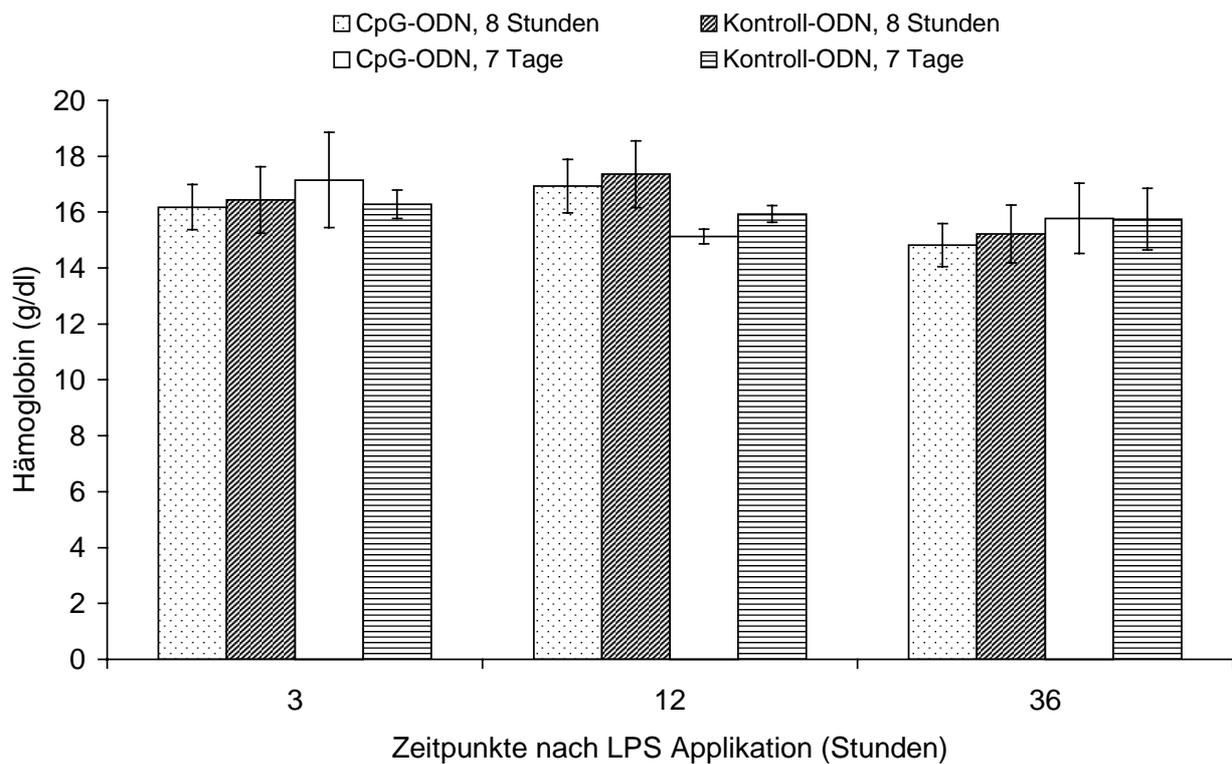


Abbildung 9: Hämoglobin im Blut von Ratten 3, 12 und 36 Stunden nach i.p. Applikation von 10 mg/kg KG LPS (=LD₀) und 8 Stunden bzw. 7 Tage vorausgegangener i.p. Injektion von 12 nmol CpG- oder Kontroll-ODN. (n=6)

3.4.5 Hämatokrit

In einer Gruppe (Kontroll-ODN, 7 Tage) fiel der Hämatokrit von der 3. zur 12. Stunde signifikant ab (von $49,3 \pm 1,2$ % auf $47,5 \pm 1,3$ %, $p=0,037$). In allen anderen Gruppen verhielt sich der Hämatokrit analog zum Hämoglobinwert und zu den Erythrozyten und es konnte keine signifikante Änderung von der 3. zur 12. Stunde nachgewiesen werden. In zwei Gruppen (CpG- und Kontroll-ODN, 8 Stunden) fielen die Mittelwerte von der 12. zur 36. Stunde signifikant ab (im Mittel der zwei Gruppen von $50,2$ % auf $45,7$ %, p -Werte $<0,019$).

Ein signifikanter Unterschied zwischen einer CpG- und Kontroll-ODN-Gruppe konnte, wie bei den Erythrozyten und dem Hämoglobinwert, lediglich 12 Stunden nach LPS-Applikation in den 7 Tage-Gruppen nachgewiesen werden. Hier waren die gemessenen Hämatokritwerte in der Kontroll-ODN-Gruppe ($47,5 \pm 1,3$ %) signifikant höher als die in der CpG-ODN-Gruppe ($45,5 \pm 0,7$ g/dl, $p=0,019$). Dieser Unterschied war in der 36. Stunde nicht mehr nachweisbar. (Abbildung 10)

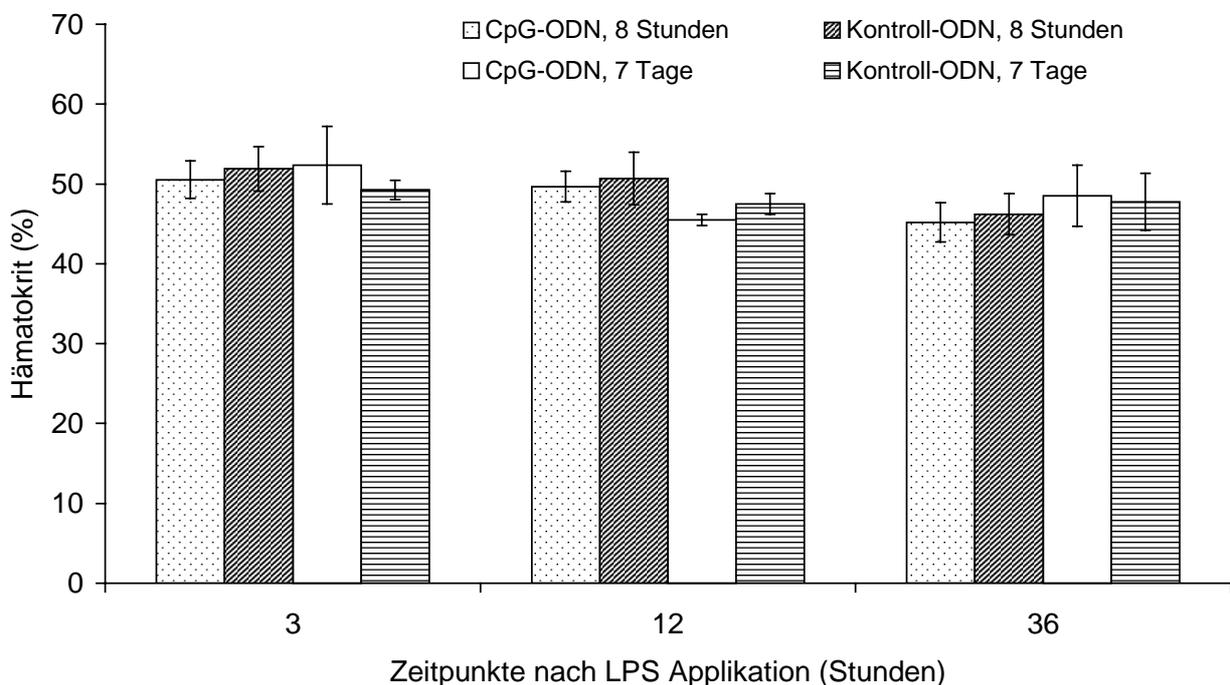


Abbildung 10: Hämatokrit im Blut von Ratten 3, 12 und 36 Stunden nach i.p. Applikation von 10 mg/kg KG LPS (=LD₀) und 8 Stunden bzw. 7 Tage vorausgegangener i.p. Injektion von 12 nmol CpG- oder Kontroll-ODN. ($n=6$)

3.5 IL-6 in BAL-Flüssigkeit

3 Stunden nach der LPS-Applikation konnten bei allen Gruppen die höchsten IL-6-Werte in der BAL-Flüssigkeit nachgewiesen werden (im Mittel aller Gruppen 545,10 pg/ml). In den 7 Tage-Gruppen bestand ein signifikanter Unterschied zwischen CpG- und Kontroll-ODN-Gruppe. Hier sind die gemessenen Werte in der Kontroll-ODN-Gruppe ($821,15 \pm 464,49$ pg/ml) signifikant höher als die in der CpG-ODN-Gruppe ($389,74 \pm 180,26$ pg/ml, $p=0,047$). Dieser Unterschied war an den folgenden Zeitpunkten nicht mehr nachweisbar.

In einer Gruppe (Kontroll-ODN, 8 Stunden) konnte ein signifikanter Abfall der IL-6-Konzentration nur von der 3. zur 36. Stunde nachgewiesen werden ($p=0,017$). In den anderen Gruppen kam es sowohl von der 3. zur 12. (p -Werte $<0,026$) und von der 12. zur 36. Stunde (p -Werte $<0,034$) zum signifikanten Absinken der Werte. 12 Stunden nach der LPS-Applikation konnte im Mittel aller Gruppen eine IL-6-Konzentration von 174,30 pg/ml gemessen werden, nach 36 Stunden lag der Wert bei 65,76 pg/ml. (Abbildung 11)

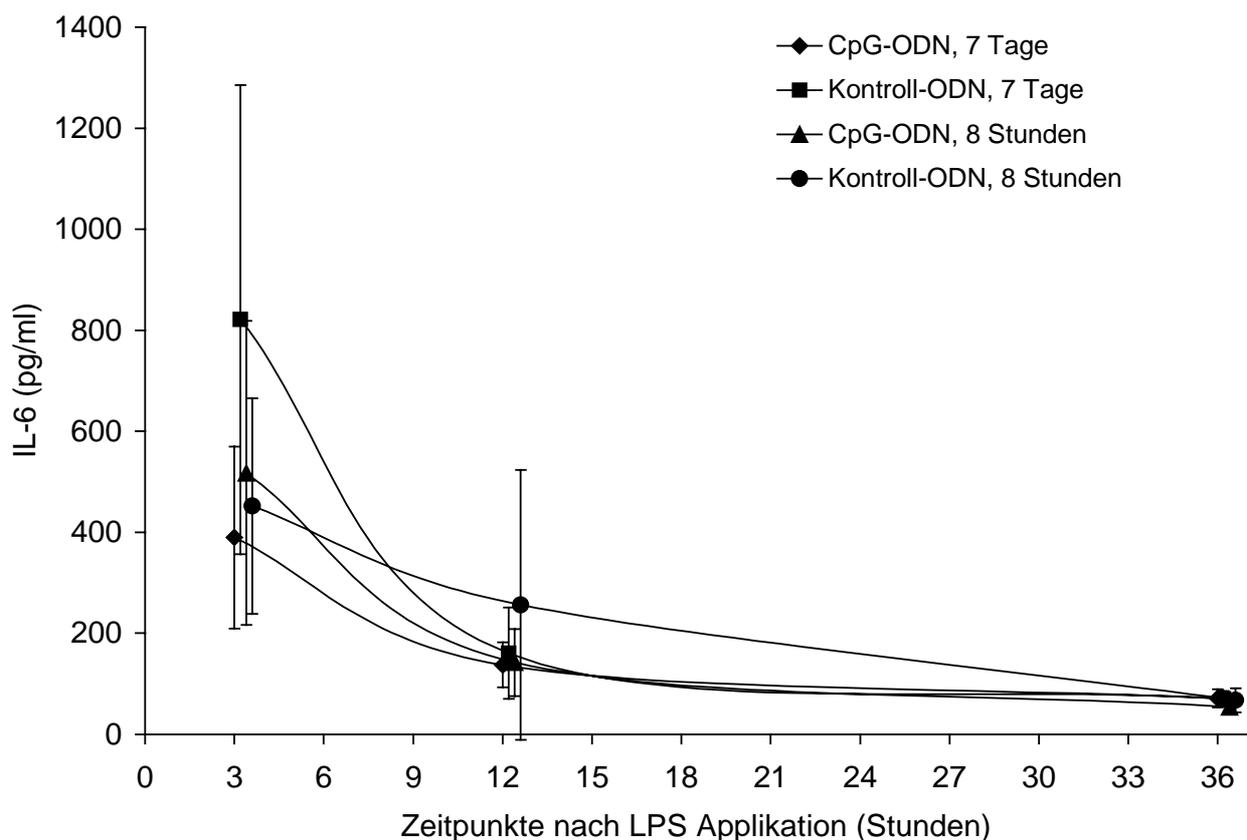


Abbildung 11: IL-6 in der BAL-Flüssigkeit von Ratten 3, 12 und 36 Stunden nach i.p. Applikation von 10 mg/kg KG LPS (=LD₀) und 8 Stunden bzw. 7 Tage vorausgegangener i.p. Injektion von 12 nmol CpG- oder Kontroll-ODN. ($n=5$)

3.6 Gewichte der Zielorgane

3.6.1 Lungen-Nassgewichte

Das Lungen-Nassgewicht in Relation zum Körpergewicht bei ODN-Applikation stieg in allen Gruppen nach der Injektion von LPS von der 3. zur 36. Stunde an (im Mittel aller Gruppen von 4,7 auf 5,5 mg/g). Lediglich bei einer Gruppe (CpG-ODN, 7 Tage) konnte hierfür keine Signifikanz nachgewiesen werden (alle anderen Gruppen: p-Werte <0,026).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den CpG- und den Kontroll-ODN-Gruppen konnte nicht nachgewiesen werden. (Abbildung 12)

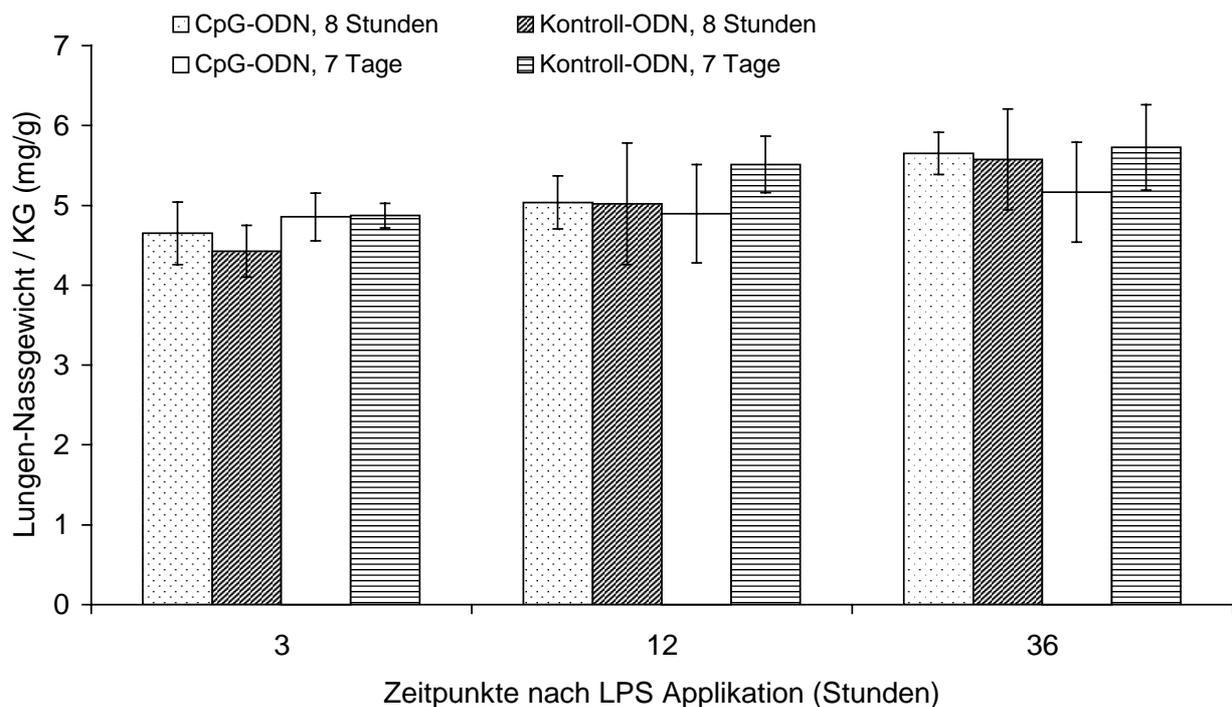


Abbildung 12: Lungen-Nassgewicht in Relation zum Körpergewicht bei Ratten 3, 12 und 36 Stunden nach i.p. Applikation von 10 mg/kg KG LPS (=LD₀) und 8 Stunden bzw. 7 Tage vorausgegangener i.p. Injektion von 12 nmol CpG- oder Kontroll-ODN. (n=5)

3.6.2 Leber-Nassgewichte

Das Leber-Nassgewicht in Relation zum Körpergewicht bei ODN-Applikation sank in allen Gruppen von der 3. zur 12. Stunde ab und stieg dann zur 36. Stunde wieder an (im Mittel aller Gruppen von 31,5 auf 28,8 mg/g und von 28,8 auf 32,6 mg/g). Diese Veränderungen waren jedoch nur in einer Gruppe (CpG-ODN, 8 Stunden) statistisch signifikant ($p=0,004$, $p=0,011$).

Ein signifikanter Unterschied zwischen einer CpG- und Kontroll-ODN-Gruppe konnte lediglich 3 Stunden nach LPS-Applikation in den 8 Stunden-Gruppen nachgewiesen werden. Hier waren die Werte in der CpG-ODN-Gruppe (31,6 mg/g) signifikant höher als die in der Kontroll-ODN-Gruppe (29,8 mg/g, $p=0,01$). Dieser Unterschied war an den folgenden Zeitpunkten nicht mehr nachweisbar. (Abbildung 13)

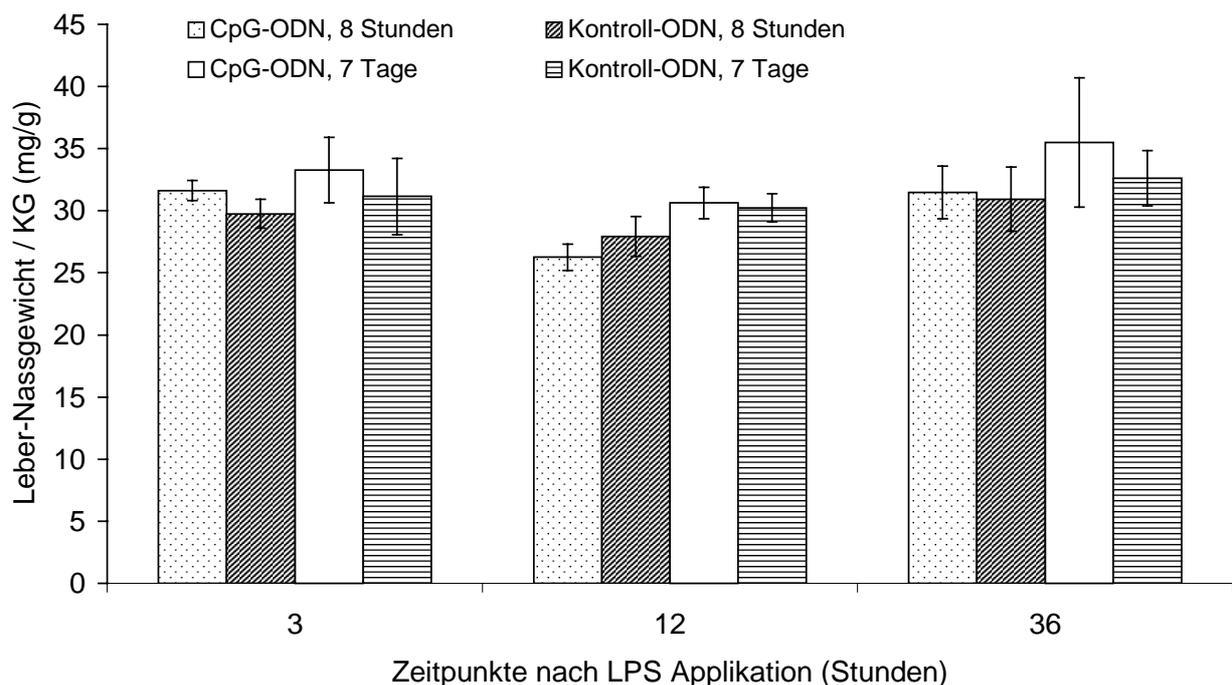


Abbildung 13: Leber-Nassgewicht in Relation zum Körpergewicht bei Ratten 3, 12 und 36 Stunden nach i.p. Applikation von 10 mg/kg KG LPS (=LD₀) und 8 Stunden bzw. 7 Tage vorausgegangener i.p. Injektion von 12 nmol CpG- oder Kontroll-ODN. ($n=6$)

3.6.3 Milz-Nassgewichte

Von der 3. zur 12. Stunde kam es in allen Gruppen zu einem Abfall der Milz-Nassgewichte in Relation zum Körpergewicht bei ODN-Applikation (im Mittel aller Gruppen von 2,6 auf 2,2 mg/g). Lediglich für eine Gruppe (CpG-ODN, 7 Tage) konnte für diese Veränderung keine Signifikanz nachgewiesen werden (alle anderen Gruppen: p-Werte <0,038).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den CpG- und den Kontroll-ODN-Gruppen konnte nicht nachgewiesen werden. (Abbildung 14)

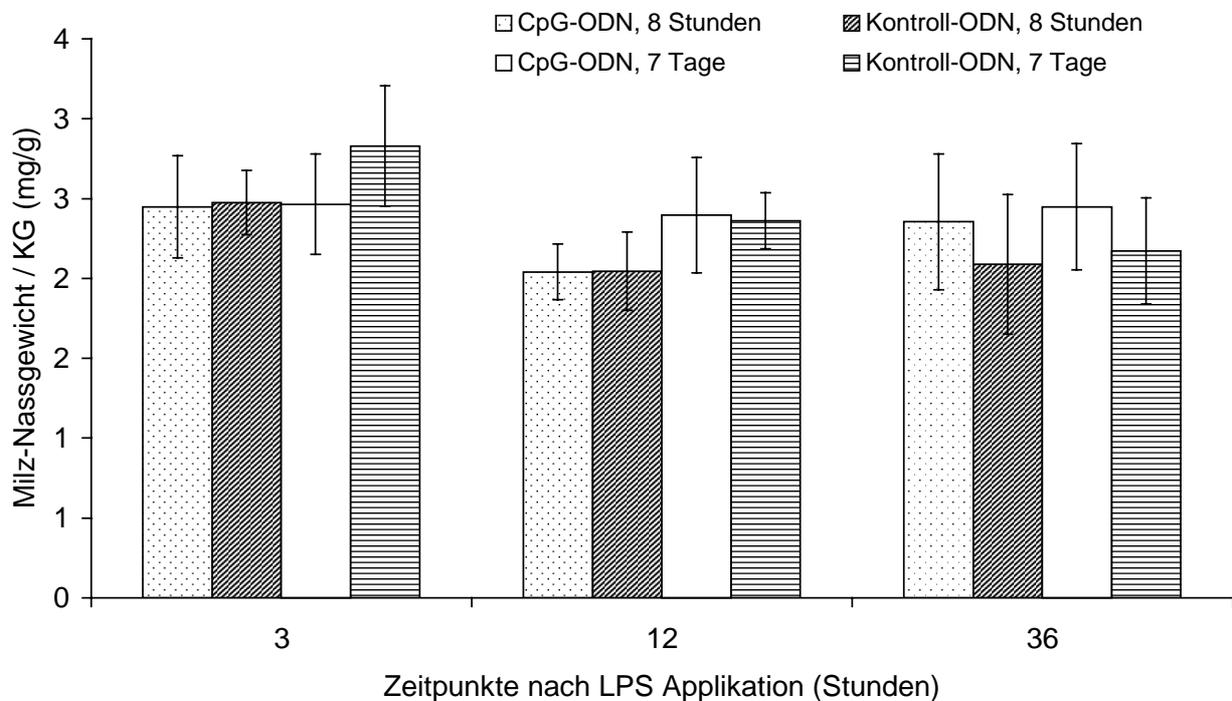


Abbildung 14: Milz-Nassgewicht in Relation zum Körpergewicht bei Ratten 3, 12 und 36 Stunden nach i.p. Applikation von 10 mg/kg KG LPS (=LD₀) und 8 Stunden bzw. 7 Tage vorausgegangener i.p. Injektion von 12 nmol CpG- oder Kontroll-ODN. (n=6)

3.7 Histopathologische Untersuchung

Bei der histologischen Untersuchung der Lungen konnten in keiner Gruppe pathologische Veränderungen nachgewiesen werden. Insbesondere das vermehrte Auftreten von Leukozyten oder ödematöse Veränderungen zeigten sich nicht.

Die untersuchten Leberpräparate zeigten 3 Stunden nach LPS-Applikation keine pathologischen Veränderungen. Nach 12 und 36 Stunden konnten in einigen Schnitten landkartenartige Gruppennekrosen nachgewiesen werden (im Mittel aller Gruppen bei 24% der Präparate). Die Bezirke waren durch Zelldetritus auffällig, welcher von nur wenigen Abwehrzellen und Reparationsgewebe umgeben bzw. durchsetzt war. Die Zellkerne ließen Karyopyknose, Karyorrhexis und Karyolyse erkennen. (Abbildung 15) Lediglich in einer Gruppe (CpG-ODN, 8 Stunden) traten zu keinem Zeitpunkt Zellnekrosen auf.

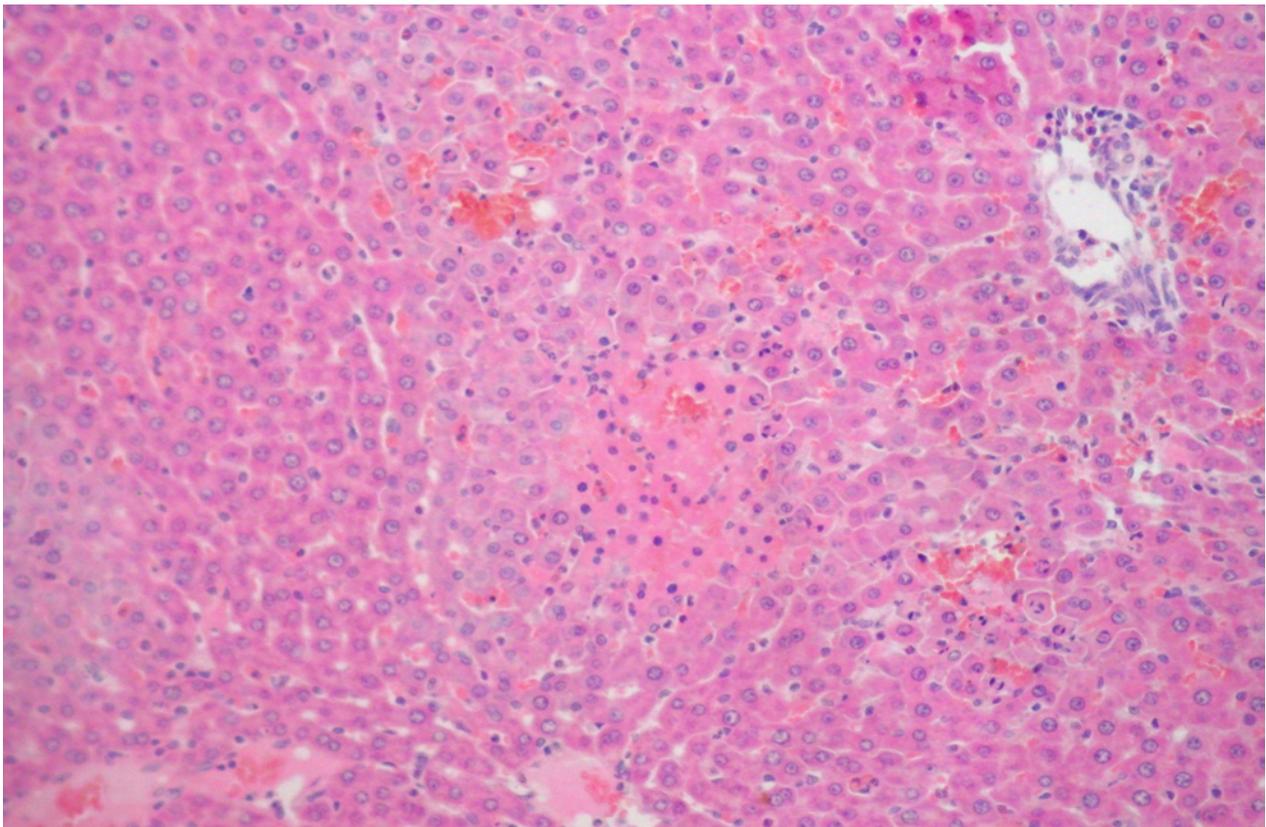


Abbildung 15: Landkartenartige Gruppennekrosen in der Rattenleber 36 Stunden nach i.p. Applikation von 10 mg/kg KG LPS (=LD₀) und 7 Tage vorausgegangener i.p. Injektion von 12 nmol CpG-ODN. (HE, x20)

Eine mikrovesikuläre Leberverfettung konnte 36 Stunden nach der LPS-Gabe in allen Gruppen beobachtet werden (im Mittel aller Gruppen bei 95% der Präparate). Es zeigten sich kleine lipidhaltige Vesikel im hepatozellulären Zytoplasma. (Abbildung 16)

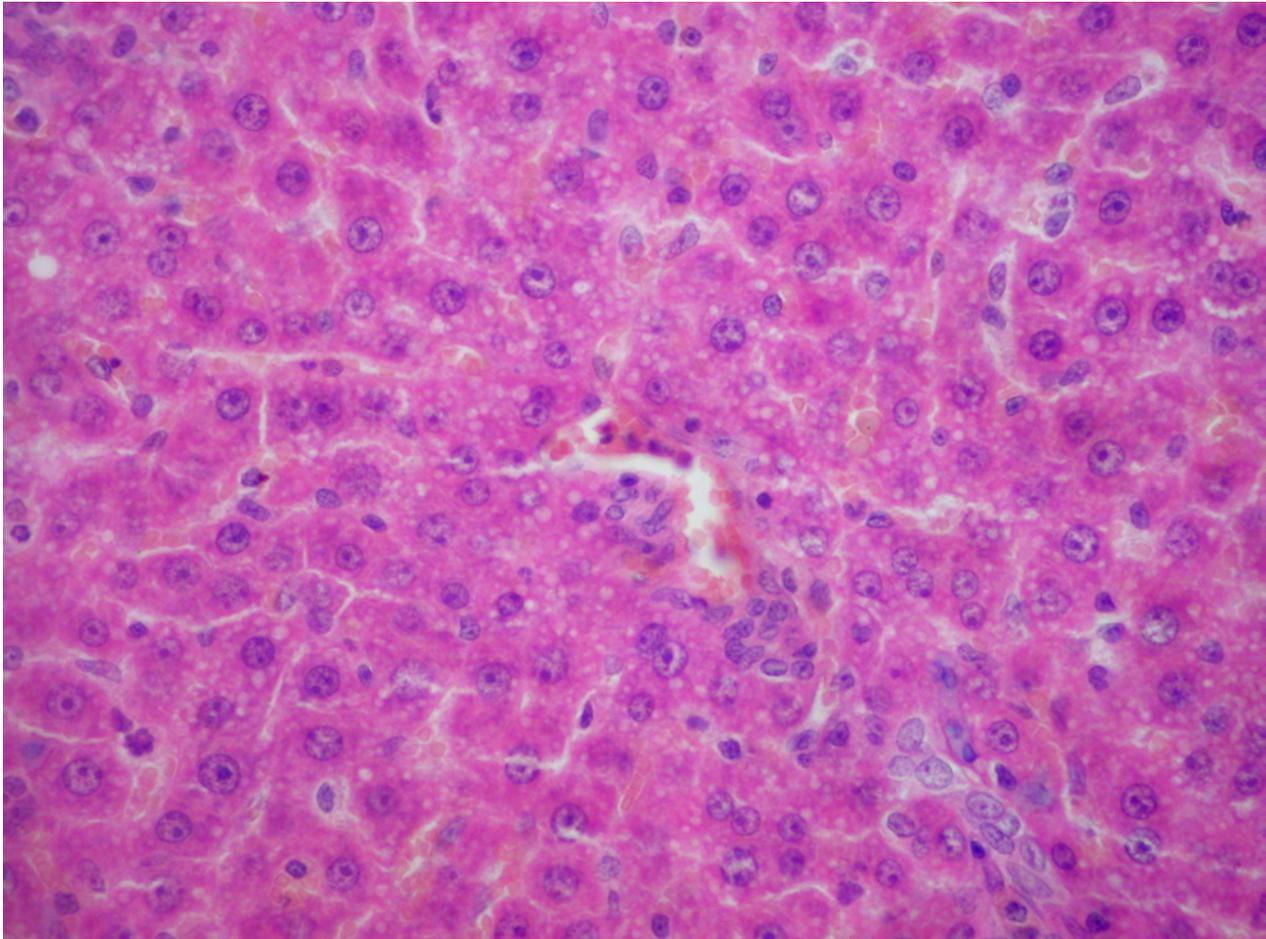


Abbildung 16: Mikrovesikuläre Verfettung in der Rattenleber 36 Stunden nach i.p. Applikation von 10 mg/kg KG LPS (=LD₀) und 7 Tage vorausgegangener i.p. Injektion von 12 nmol CpG-ODN. (HE, x40)

Bei der histologischen Untersuchung der Milzpräparate konnten die typischen Zeichen der unspezifischen Splenitis nachgewiesen werden. Bereits 3 Stunden nach der Applikation von Endotoxin konnte in allen untersuchten Schnitten eine Aktivierung der Milzfollikel nachgewiesen werden. Die Veränderungen waren zu diesem Zeitpunkt auf die Mantelzone beschränkt. Nach 12 Stunden war die weiße Pulpa stark hyperplastisch und mit vielen Makrophagen durchtränkt. (Abbildung 17)

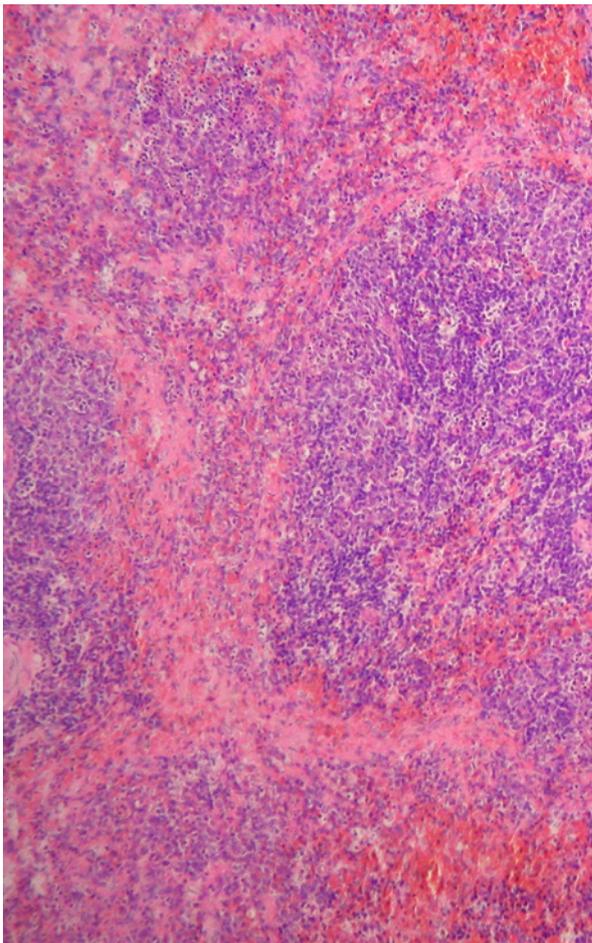
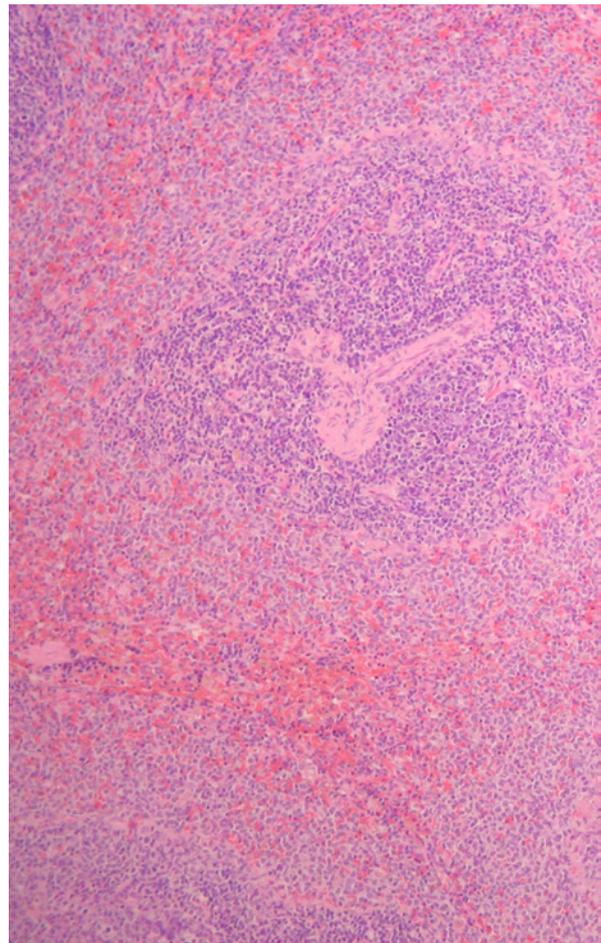
**a)****b)**

Abbildung 17: **a)** Unspezifische Splenitis in der Rattenmilz 12 Stunden nach i.p. Applikation von 10 mg/kg KG LPS (=LD₀) und 7 Tage vorausgegangener i.p. Injektion von 12 nmol CpG-ODN: Viele Makrophagen in stark hyperplastischer weißen Pulpa. (HE, x10)

b) Normalbefund der Milz einer unbehandelten Ratte. (HE, x10)

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung der Effekte eines CpG-Motivs in einem Endotoxinämie-Modell der Ratte. Es sollte geklärt werden, ob das genutzte CpG-ODN eine Toleranz bezüglich einer nachfolgenden Endotoxinämie, analog dem bekannten Phänomen der Endotoxin-Toleranz, induziert. Hierzu wurde in einem ersten Studienabschnitt der Einfluss auf die Letalität und die Überlebenszeitverteilung untersucht und in einem zweiten Studienabschnitt erfolgte dann die Qualifizierung und Quantifizierung anhand verschiedener Parameter, wie zum Beispiel der Zytokinausschüttung, der Blutbildveränderungen, der histopathologischen Begutachtung der Zielorgane und deren Gewichtsveränderungen.

In der vorliegenden Studie führte die Vorbehandlung der Versuchstiere mit CpG-ODN zu keiner signifikanten Änderung der Letalität und der Überlebenszeitverteilung. Diese entsprachen dem natürlichen Verlauf in dem durchgeführten Endotoxinämie-Modell.

Nach der Applikation von LPS konnte in allen Gruppen ein signifikanter Anstieg der Leukozyten im Blut nachgewiesen werden, was aus einer Induktion von pro-inflammatorischen Mediatoren resultiert und insbesondere zu einer Vermehrung der neutrophilen Granulozyten führt (Lehner et al., 2001).

Der gemessene Abfall der Thrombozyten erfolgte im Rahmen einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC). Die ausgeprägte LPS-induzierte Endothelschädigung führt zur Freisetzung des Proteins *tissue factor*, welches die endogene Gerinnungskaskade und das fibrinolytische System aktiviert. In der Folge kommt es zu einer schweren Koagulopathie, die durch Thrombosen im Bereich von Mikrozirkulationsstörungen gekennzeichnet ist. Eine Folge ist der Verbrauch von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren. Typisch für die DIC sind die in der vorliegenden Studie beobachteten Blutungen an verschiedenen Lokalisationen, insbesondere im Gastrointestinaltrakt. (Bell, 1994) Hieraus resultierte in einigen Gruppen ein Absinken der Werte für Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokrit.

Endotoxin induziert durch verschiedene Mechanismen eine Schädigung der körpereigenen Zellen, was letztendlich zu multiplen Organdysfunktionen führt.

Häufig sind frühzeitig die Lungen betroffen. (Beal und Cerra, 1994) Pulmonale Epithelzellen exprimieren wie klassische Entzündungszellen ebenfalls PRRs und sind somit immunologisch aktiv. Die resultierende Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden kann direkt die lokale

Abwehrpotenz stärken und gleichzeitig stört das entstehende hoch-entzündliche Mikromilieu wichtige Funktionen, wie den Erhalt der mechanischen Barriere. Interzelluläre Junctionsproteine werden abgebaut und es entstehen Lücken, die letztendlich eine Schrankenstörung verursachen. Die Hyperpermeabilität der alveolokapillären Barriere mit Ödembildung, pulmonalarterieller Vasokonstriktion und Störung der Ventilations- /Perfusionsverteilung beeinflusst in der Folge erheblich die pulmonale Gasaustauschfunktion. (Bals et al., 2004; Hippenstiel et al., 2006; Patterson und Lum, 2001) Das klinische Bild beinhaltet die bei den Ratten beobachtete Tachypnoe, die verstärkte Atemarbeit und die deutlich hörbaren feuchten Atemgeräusche. Weitere Hinweise auf ein Lungenödem durch ein Kapillarleck sind der schaumige Nasenausfluss und der Anstieg der Lungen-Nassgewichte in Relation zum Körpergewicht. Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass sich in den ersten 12 Stunden nach Beginn der LPS-Applikation ein Protein-armes Lungenödem entwickelt. Erst ab Stunde 24 konnte bei kontinuierlicher Endotoxin-Gabe ein Protein- und Zell-reiches Ödem nachgewiesen werden. (Simons et al., 1991) In der vorliegenden Studie wurde vor der Untersuchung der Lungen lediglich ein LPS-Bolus in niedriger Dosierung (LD_0) appliziert. Dieser Unterschied im Studiendesign erklärt das Fehlen typischer histopathologischer Veränderungen im Rahmen eines ARDS (acute respiratory distress syndrome), wie das vermehrte Auftreten von Leukozyten, Erythrozyten, pulmonalen Makrophagen oder Fibrin in den Alveolen. (Bernhard et al., 1994)

Durch die bestehende Endotoxinämie kommt es zur Liberation multipler pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine in verschiedenen Kompartimenten. Agonisten von TLR2, TLR4 und TLR9 induzieren zum Beispiel die Freisetzung von $TNF-\alpha$ und IL-6 durch pulmonale Epithelzellen. (Hippenstiel et al., 2006) Die Bestimmung von IL-6 im Schockorgan Lunge ist von besonderem Interesse, da hier die Zytokin-induzierte Rekrutierung, Sequestration und Aktivierung von intrapulmonalen neutrophilen Granulozyten für die Entstehung eines ARDS mitverantwortlich ist. (Simons et al., 1996) Die gemessenen Werte von IL-6 in der BAL-Flüssigkeit waren in allen Gruppen 3 Stunden nach der LPS-Applikation am höchsten und sanken in der Folge kontinuierlich ab.

Die nachgewiesenen histopathologischen Veränderungen der Leber entsprechen ebenfalls einer Organmanifestation im Rahmen eines septischen Schockgeschehens. Die verminderte Gewebeoxygenierung führt in der Leber zur fettigen Metamorphose und es lassen sich kleine lipidhaltige Vesikel im hepatozellulären Zytoplasma nachweisen. Unter physiologischen

Bedingungen sind die Lipide der Zellen strukturgebunden und nicht darstellbar. Eine weitere Folge der Gewebhypoxie stellen die landkartenartigen Gruppennekrosen von Leberzellen dar.

Die feingewebliche Untersuchung der Milz erbrachte den Befund einer unspezifischen Splenitis. Dies entspricht der typischen Reaktion der Milz auf eine akute Entzündung. Es kommt zu einer Aktivierung der Milzfollikel, was zu einer Hyperplasie der weißen Pulpa führt. Makrophagen durchtränken zuerst die rote und später auch die weiße Pulpa. Im Rahmen einer massiven Entzündung können die Keimzentren letztendlich zugrunde gehen.

Die in der vorliegenden Studie nachgewiesenen Effekte nach der Applikation von Endotoxin sind pathophysiologisch alle gut erklärbar und entsprechen den Ergebnissen früherer Untersuchungen (Simons et al., 1991, 1996). Lediglich im direkten Vergleich der CpG-ODN-Gruppen mit den Kontroll-ODN-Gruppen zeigten sich einzelne signifikante Unterschiede. Diese traten gehäuft in den Gruppen auf, bei denen die LPS-Gabe 7 Tage nach der Vorbehandlung mit dem ODN erfolgte.

3 Stunden nach Einleitung der Endotoxinämie konnte in der Kontroll-ODN-Gruppe eine signifikant höhere IL-6-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit nachgewiesen werden als in der CpG-ODN-Gruppe. Nach 12 und 36 Stunden waren die Mittelwerte dann annähernd gleich. Die Leukozyten stiegen nach 12 Stunden im Mittel in der Kontroll-ODN-Gruppe auf signifikant höhere Werte als in der CpG-ODN-Gruppe. Diese Unterschiede konnten an keinem anderen Zeitpunkt mehr nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich, dass nur in der CpG-ODN-Gruppe kein signifikanter Anstieg des Lungen-Nassgewichtes in Relation zum Körpergewicht von der 3. zur 36. Stunde erfolgte. Zudem fielen lediglich in dieser Gruppe die Thrombozyten von der 12. zur 36. Stunde nicht weiter ab.

Diese Daten können als Ausdruck einer diskreten Toleranzentwicklung nach der Gabe von CpG-ODN bezüglich einer nachfolgenden Endotoxinämie gewertet werden. Die nachgewiesenen Effekte beschränken sich jedoch auf einzelne Zeitpunkte und führen zu keiner Beeinflussung der Letalität, der Überlebenszeitverteilung oder der histopathologischen Veränderungen an den Zielorganen. Hierfür können einige mögliche Ursachen angeführt werden.

Die exakte Sequenz der CpG-Motive, die zu einer optimalen Aktivierung von Immunzellen führt unterliegt einer Spezies-Spezifität (Bauer et al., 2001). Dies erklärt sich durch einen Unterschied im molekularen Aufbau der TLRs, der sich im Laufe der Evolution herausgebildet hat. Zum Beispiel unterscheidet sich die Zusammensetzung der Aminosäuren des humanen TLR9-Moleküls zu 24% von dem entsprechenden murinen Rezeptor. (Hemmi et al., 2000) Aus diesem

Grunde sind die flankierenden Regionen um das zentrale Dinukleotid entscheidend für die Wirkung eines CpG-Motivs. Die optimale Sequenz zur Stimulation muriner Zellen ist GACGTT (Krieg et al., 1995). Dieses Motiv gehört zu den immunstimulatorisch aktivsten und wurde bereits in vielen *in vivo*- Modellen erfolgreich eingesetzt (Weighardt et al., 2000). Auch in der vorliegenden Studie erfolgte die Applikation dieses Motivs, da die *in vivo*- Stimulation von Ratten mit CpG-Motiven bislang nur unzureichend in der Literatur beschrieben ist. Aus diesem Grunde basierten die Dosierungen der injizierten ODNs auf Erfahrungswerten und wurden in Anlehnung an Modelle mit Mäusen gewählt. Dies könnte ein Grund für die nur schwach ausgeprägten Effekte von CpG-ODN in der vorliegenden Studie sein.

Bisher konnte die Entwicklung einer Kreuz-Toleranz bei repetitiver Stimulation von TLR4 und TLR9 lediglich *in vitro* nachgewiesen werden (Dalpke et al., 2005). Aufgrund der komplexen Vorgänge können einzelne Erkenntnisse jedoch nur schwer in eine *in vivo*- Studie übertragen werden. Sato et al. (2002) konnten zum Beispiel nachweisen, dass die MyD88-abhängige und die MyD88-unabhängige Signalkaskade im Rahmen der Entwicklung einer Kreuz-Toleranz unterschiedlich beeinflusst wird. Das beweist, dass eine Toleranzentwicklung sowohl durch Veränderungen in der proximalen, als auch in der distalen Signalkaskade entsteht. Die verminderte Präsentation von TLR4 auf der Zelloberfläche von Immunzellen spielt also in der frühen Phase der LPS-Toleranz ebenso eine Rolle, wie zum Beispiel die Veränderungen der IRAK (Nomura et al., 2000; Yeo et al., 2003). Die späte Phase der klassischen Endotoxin-Toleranz wird durch die Bildung von LPS-spezifischen Antikörpern erklärt (Johnston und Greisman, 1985). Die Vorbehandlung mit Endotoxin schützt daher erklärbar gegen eine nachfolgende Infektion mit einer Vielzahl an Gram-negativen Bakterien. Überraschenderweise entwickelt sich auch gegenüber einigen Mykobakterien, Gram-positiven Bakterien, Pilzen und Parasiten ein protektiver Effekt, obwohl diese weder Agonisten des TLR4 sind, noch durch LPS-Antikörper beeinflusst werden. (Lehner und Hartung, 2002) Diese zur Zeit unerklärbaren Ergebnisse von *in vivo*- Studien, deuten auf eine Beteiligung von unbekanntem Mechanismen hin.

Die vielversprechenden Ergebnisse der *in vitro*- Studien wurden an isolierten Zellreihen erzielt. Da die verschiedenen Mechanismen des angeborenen Immunsystems zur Erkennung und Differenzierung von Pathogenen jedoch in einem komplexen Zusammenspiel agieren, kommt es häufig zu Überlagerungen verschiedener Effekte, was höchste Ansprüche an das Design von *in vivo*- Studien in diesem Bereich stellt.

So spielen neben den TLRs weitere PRRs eine Rolle. Im Zusammenhang mit der Endotoxinämie sind besonders die Scavenger Rezeptoren (SR) zu erwähnen, bei denen es sich um Glykoproteine auf der Oberfläche von Zellen handelt, die mit einer hohen Affinität eine große Anzahl von Liganden binden. Unter anderem schützen die SRs den Organismus vor einem endotoxischen Schock durch das Abfangen von LPS. (Gough und Gordon, 2000) In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von neuen bislang unbekanntes PRRs entdeckt und es ist davon auszugehen, dass weitere folgen werden. Äquivalent zu den TLRs beteiligen sich zum Beispiel die zytosolischen Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like – Rezeptoren (NLRs) und die Retinoid acid-inducible gene-1 (RIG)-like - Helicasen (RLHs) an der Detektion von PAMPs und initiieren eine Wirtsantwort über Adaptermoleküle und Transkriptionsfaktoren (Meylan et al., 2006).

Neben der Vielzahl an PRRs kommt erschwerend hinzu, dass die meisten Immunzellen unterschiedliche Rezeptoren in verschiedenen Kombinationen präsentieren. Ein Beispiel ist der neutrophile Granulozyt, der als erste Zelle am Ort der Infektion erscheint und alle TLRs außer TLR3 exprimiert (Hayashi et al., 2003; Trevani et al., 2003). Im Gegensatz dazu sind humane Monozyten und myeloide DZ nur mit TLR3, TLR4 und TLR8 bestückt (Jarrossay et al., 2001; Blackwell und Krieg, 2003; Kadowaki et al., 2001). Plasmazytoide DZ und B-Zellen exprimieren TLR7 und TLR9 (Hornung et al., 2002; Okada et al., 2003). Die Präsentation von TLRs auf den verschiedenen Immunzellen variiert zudem bei verschiedenen Spezies (Dalpke und Heeg, 2004).

Da sich die verschiedenen Zellen des Immunsystems in ihrer Fähigkeit immunkompetente Stoffe zu synthetisieren ebenfalls unterscheiden, führt die differenzierte Aktivierung von Signalkaskaden durch ein PAMP zur Ausbildung eines für die jeweilige Zelle spezifischen immunologischen Milieus. Im Falle der mikrobiellen Invasion eines Wirtes kommt es somit durch die Detektion mehrerer PAMPs eines einzigen Erregertyps durch verschiedene TLRs und zytoplasmatische Rezeptoren unterschiedlicher Immunzellen zur komplexen Expression inflammatorischer Mediatoren, welche nachfolgend die Immunantwort entscheidend steuern. (Meylan et al., 2006; Takeda et al., 2003) So sind zum Beispiel an der Erkennung von Pneumokokken TLR1/2- und TLR2/6-Heterodimere (Lipoteichonsäure / Peptidoglykan), NOD2 (Peptidoglykan), TLR4 (Pneumolysin) ebenso wie TLR9 (CpG-ODN) beteiligt (Albiger et al., 2006; Bals und Hiemstra, 2004; Curtis, 2005; Hippenstiel et al., 2006; Zhang et al., 2000).

Die Signalwege der unterschiedlichen Rezeptoren konvergieren auf Ebene intrazellulärer Schlüssel-moleküle, wie zum Beispiel dem Adapterprotein MyD88 und dem Transkriptionsfaktor NF- κ B. Die gezielte Blockade solcher Schlüssel-moleküle verhindert die Zellaktivierung durch ganze Gruppen von PRRs. (Bals und Hiemstra, 2004; Hippenstiel et al., 2006; Takeda et al.,

2003; Takeuchi und Akira, 2002) Hier bleibt abzuwarten, ob sich die Blockade dieser Regulatoren auch positiv auf den Verlauf einer Sepsis auswirkt.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit LPS gegenüber der entzündungsbedingten Schädigung einer erneuten Endotoxin-Exposition schützt (Lehner und Hartung, 2002). Analog zu diesen Ergebnissen wurde *in vitro* nachgewiesen, dass auch die Vorbehandlung mit CpG-ODN bei einer erneuten Aktivierung durch LPS zu einer Abschwächung der immunologischen Antwort führt (Dalpke et al., 2005). Diese Toleranz-Phänomene stellen jedoch nur einen Baustein in dem komplexen System der angeborenen Immunität dar. Das CpG-ODN und Endotoxin gegen nachfolgende Infektionen mit einer Vielzahl an Erregern schützen, erklärt sich vielmehr durch die hervorgerufene Immunmodulation. (Dittmer und Olbrich, 2003; Lehner und Hartung, 2002). Jedes einzelne PAMP versetzt das Immunsystem eines Wirtes in einen Alarmzustand, was in der Folge zu einer verbesserten Abwehrlage führt. Endotoxin induziert eine ausgeprägte generalisierte Entzündungsreaktion, die nur schwer kalkulierbar ist. Im Gegensatz dazu entsteht bei CpG-ODN durch eine selektivere Stimulation ein T_H1-gewichtetes (IL-12, INF- γ) immunologisches Milieu, welches die Einzigartigkeit dieses PAMP ausmacht und eine Vielzahl an therapeutischen Anwendungen ermöglicht. (Klinman, 2004; Krieg et al., 1999)

Das Wissen um die molekulare Interaktion von Pathogenen mit Wirtszellrezeptoren kann wichtige Grundlagen für neue diagnostische und therapeutische Entwicklungen legen. Die hohe Redundanz bei der Erregererkennung lässt jedoch daran zweifeln, dass die isolierte Aktivierung oder Blockade eines PRRs im Rahmen einer Sepsis zur effektiven Modulation der Immunantwort führt.

5. Zusammenfassung

Die Zellen des angeborenen Immunsystems identifizieren charakteristische molekulare Muster wie Lipopolysaccharide (LPS) und CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODNs) als potenzielle Krankheitserreger. Diese Mustererkennung wird u.a. durch die Präsentation von verschiedenen Toll-like Rezeptoren (TLRs) ermöglicht. Die Signalwege der Rezeptoren konvergieren auf Ebene intrazellulärer Schlüsselmoleküle, die daraufhin eine spezifische Immunantwort initiieren. Die repetitive Stimulation verschiedener TLRs mit ihrem Liganden führt zu einer Abschwächung der immunologischen Antwort. Zwischen verschiedenen TLRs konnten Kreuz-Toleranzen nachgewiesen werden. Die *in vitro*-Stimulation mit CpG-ODN erzeugt eine Toleranz gegenüber einer nachfolgenden LPS-Applikation. Hieraus ergibt sich die Fragestellung dieser Arbeit: Induziert CpG-ODN eine Toleranz in einem Endotoxinämie-Modell der Ratte?

116 Ratten wurden randomisiert und in 8 Gruppen aufgeteilt. Es folgte die i.p. Injektion von CpG- oder Kontroll-ODN (12 oder 48 nmol). 8 Stunden oder 7 Tage später erfolgte die Induktion der Endotoxinämie durch einen i.p. Bolus *E. coli* LPS (25 mg/kg (=LD₈₀)). Die Letalität wurde in den folgenden 7 Tagen dokumentiert. 72 Ratten wurden randomisiert und in 12 Gruppen aufgeteilt. Es folgte die i.p. Injektion von 12 nmol CpG- oder Kontroll-ODN. 8 Stunden oder 7 Tage später erfolgte die Induktion der Endotoxinämie durch einen i.p. Bolus LPS (10 mg/kg (=LD₀)). Nach 3, 12 oder 36 Stunden wurden Blutproben gewonnen. Die Lungen, Leber und Milz wurden entnommen, gewogen und histologisch untersucht. Bei einem Teil der Lungen wurde eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt. In der BAL-Flüssigkeit erfolgte die quantitative Bestimmung von IL-6 mittels ELISA.

In der vorliegenden Studie führte die Vorbehandlung der Versuchstiere mit CpG-ODN zu keiner signifikanten Änderung der Letalität und der Überlebenszeitverteilung. Die nachgewiesenen Effekte wie Leukozytose, Thrombozytopenie, Blutungen, Lungenversagen, Leberzellnekrosen, unspezifische Splenitis und erhöhte IL-6-Werte in der BAL-Flüssigkeit nach der Applikation von Endotoxin sind pathophysiologisch gut erklärbar und entsprechen den Ergebnissen früherer Untersuchungen. Im direkten Vergleich der CpG- mit den Kontroll-ODN-Gruppen zeigten sich auf einzelne Zeitpunkte beschränkte signifikante Unterschiede, die als Ausdruck einer diskreten Toleranzentwicklung gewertet werden können. Diese Toleranz-Phänomene stellen jedoch nur einen Baustein in dem komplexen System der angeborenen Immunität dar. Die hohe Redundanz bei der Erregererkennung lässt daran zweifeln, dass die isolierte Aktivierung oder Blockade eines PRRs im Rahmen einer Sepsis zur effektiven Modulation der Immunantwort führt.

6. Literaturverzeichnis

Abraham E, Laterre PF, Garg R, Levy H, Talwar D, Trzaskoma BL, Francois B, Guy JS, Bruckmann M, Rea-Neto A, Rossaint R, Perrotin D, Sablotzki A, Arkins N, Utterback BG, Macias WL. Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and low risk of death. *N Engl J Med* 2005; 353: 1332-1341

Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1958-1968

Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 5-11

Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H, Akira S, Normark S, Henriques-Normark B. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol* 2006; 9: 633-644

Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 2001; 7: 167-202

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732-738

Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985; 42: 779-791

Angus DC, Laterre PF, Helterbrand J, Ely EW, Ball DE, Garg R, Weissfeld LA, Bernard GR. The effect of drotrecogin alfa (activated) on long-term survival after severe sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32: 2199-2206

Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 2004; 23: 327-333

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9237-9242

Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA* 1994; 271: 226-233

Bell WR. The pathophysiology of disseminated intravascular coagulation. *Semin Hematol* 1994; 31 Supplement 1: 19-24

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A, Spragg R. Report of the American-European Consensus conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Consensus Committee. *J Crit Care* 1994; 9: 72-81

Blackwell SE, Krieg AM. CpG-A-induced monocyte IFN-gamma-inducible protein-10 production is regulated by plasmacytoid dendritic cell-derived IFN-alpha. *J Immunol* 2003; 170: 4061-4068

Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA*. 1995; 274: 968-974

Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, Bidlingmaier M, Eigler A, Haimerl W, Lehr HA, Krieg AM, Hartmann G, Endres S. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol* 2000; 165: 6278-86

Carpentier AF, Auf G, Delattre JY. CpG-oligonucleotides for cancer immunotherapy, review of the literature and potential applications in malignant glioma. *Front Biosci* 2003; 8:115-127

Carpentier AF, Chen L, Maltonti F, Delattre JY. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res* 1999; 59: 5429-5432

Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; 274: 10689-10692

Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893 (classical article). *Clin Orthop Relat Res* 1991; (262): 3–11

Cooper CL, Davis HL, Morris ML, Efler SM, Adhami MA, Krieg AM, Cameron DW, Heathcote J. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol* 2004; 24: 693-701

Curtis JL. Cell-mediated adaptive immune defense of the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 412-416

Dalpke AH, Heeg K. CpG-DNA as immune response modifier. *Int J Med Microbiol* 2004; 294: 345-354

Dalpke AH, Lehner MD, Hartung T, Heeg K. Differential effects of CpG-DNA in Toll-like receptor-2/-4/-9 tolerance and cross-tolerance. *Immunology* 2005; 116: 203-212

Davis HL, Suparto I, Weeratna R, Jumintarto-Iskandriati D, Chamzah S, Maruf A, Nente C, Pawitri D, Krieg AM, Heriyanto-Smits W, Sajuthi D. CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* 2000; 18: 1920–1924

Deitsch EA. Animal models of sepsis and shock: A review and lessons learned. *Shock* 1998; 9: 1-11

Dittmer U, Olbrich ARM. Treatment of infectious diseases with immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 472-477

Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003; 171: 3

Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003; 198: 1043-1055

Freudenberg MA, Galanos C. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pre-treatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect Immun* 1988; 56: 1352-1357

Friedmann G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med* 1998; 26: 1956-1958

Gordon S. Pattern recognition receptors: Doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002; 111: 927-930

Greer GG, Rietschel ET. Inverse relationship between the susceptibility of lipopolysaccharide (lipid A)-pretreated mice to the hypothermic and lethal effect of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1978; 20: 366-374

Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 1998; 17: 6230-6240

Häcker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6. *J Exp Med* 2000; 192: 595–600

Hartmann G, Krug A, Waller-Fontaine K, Endres S. Oligodeoxynucleotides enhance lipopolysaccharide-stimulated synthesis of tumor necrosis factor: dependence on phosphorothioate modification and reversal by heparin. *Mol Med* 1996; 2: 429–438

Hartmann G, Weeratna R, Ballas ZK, Payette P, Blackwell S, Suparto I, Rasmussen WL, Waldschmidt M, Sajuthi D, Purcell RH, Davis HL, Krieg AM. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *Journal of Immunology* 2000; 164: 1617–1624

Hartmann G, Weiner G, Krieg AM. CpG DNA as a signal for growth, activation and maturation of human dendritic cells. *PNAS* 1999; 96: 9305–9310

Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003; 102:2660-2669

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410: 1099-1103

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species specific recognition of single stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2003; 5: 1526-1529

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745

Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanja H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signalling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3: 196-200

Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttorp N. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia – molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir Res* 2006; 7: 97

Holst O, Ulmer AJ, Brade H, Flad HD, Rietschel ET. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996; 16: 83-104

Hornef MW, Normark BH, Vandewalle A, Normark S. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2003; 198:1225-1235

Hornig T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; 2: 835-841

Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168: 4531-4537

Ishii KJ, Takeshita F, Gursel I, Gursel M, Conover J, Nussenzweig A, Klinman DM. Potential role of phosphatidylinositol 3 kinase, rather than DNA-dependent protein kinase, in CpG DNA-induced immune activation. *J Exp Med* 2002; 196: 269-274

Jahrsdorfer B, Weiner GJ. CpG oligodeoxynucleotides for immune stimulation in cancer immunotherapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4: 686-690

Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:3388-3393

Jensen KE, Neal AL, Owens RE, Warren J. Interferon Responses of Chick Embryo Fibroblasts to Nucleic Acids and Related Compounds. *Nature* 1963; 200: 433-434

Johnston CA, Greisman SE. Mechanism of endotoxin tolerance. In: Hinshaw IB, ed. *Handbook of endotoxin*. Elsevier Science Publishers, 1985: 359-401

Jones TR, Obaldia N 3rd, Gramzinski RA, Charoenvit Y, Kolodny N, Kitov S, Davis HL, Krieg AM, Hoffman SL. Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in aotus monkeys. *Vaccine* 1999;17: 3065-3070

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194: 863-869

Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, Krieg AM. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 1998; 160: 2555-2559

Klinmann DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev* 2004; 4: 249-258

Krieg AM, Yi AK, Hartmann G. Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory CpG DNA. *Pharmacol Ther* 1999; 84: 113–120

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-Cell activation. *Nature* 1995; 374: 546-549

Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* 2005; 26: 509-511

Lehner MD, Hartung T. Endotoxin tolerance – Mechanisms and beneficial effects in bacterial infection. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2002; 144: 95-141

Lehner MD, Ittner J, Bundschuh DS, van Rooijen N, Wendel A, Hartung T. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to salmonella enterica serovar typhimurium infection despite attenuated cytokine response. *Infect Immun* 2001; 69: 463–471

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-983

Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1966-1971

Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2003; 171: 3154-3162

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Rev Immunol* 2001; 1: 135-145

Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity, the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1998; 91: 295-298

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397

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

Mizel SB, Snipes JA. Gram-negative flagellin-induced self-tolerance is associated with a block in interleukin-1 receptor-associated kinase release from toll-like receptor 5. *J Biol Chem* 2002; 277: 22414-22420

Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 2002; 3: 667-672

Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, Eichacker PQ, Danner RL. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med* 1994; 120: 771-783

Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000; 164: 3476-3479

Okada T, Lian ZX, Naiki M, Ansari AA, Ikehara S, Gershwin ME. Murine thymic plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1012-1019

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schröder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13766-13771

Patterson CE, Lum H. Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. *Endothelium* 2001; 8: 75-105

Paul WE, Hrsg. *Fundamental immunology*. New York: Raven Press, 2003: 1-20

Peng SL. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 230-236

Reinhart K, Brunkhorst FM, Bloos F, Bone HG, Gerlach H, Gründling M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A, Peckelsen C, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stüber F, Weiler N, Welte T, Werdan K. Diagnose und Therapie der Sepsis - S2 Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin. AWMF-Leitlinien-Register 2005; Nr. 079/001

Rivkind AI, Siegel JH, Littleton M, De Gaetano A, Mamantov T, Laghi F, Stoklosa JC. Neutrophil oxidative burst activation and the pattern of respiratory physiologic abnormalities in the fulminant post-traumatic adult respiratory distress syndrome. *Circ Shock* 1991; 33: 48-62

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 588-593

Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K, Akira S. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signalling pathways. *J Immunol* 2000; 165: 7096-7101

Sato S, Takeuchi O, Fujita T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. *Int Immunol* 2002; 14: 783-791

Schrohm AB, Brandenburg K, Loppnow H, Moran AP, Koch MHJ, Rietschel ET, Seydel U. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur J Biochem* 2000; 267: 2008-2013

Sikora JP. Immunotherapy in the management of sepsis. *Arch Immunol Ther Exp* 2002; 50: 317-324

Simons RK, Junger WG, Loomis WH, Hoyt DB. Acute lung injury in endotoxemic rats is associated with sustained circulating IL-6 levels and intrapulmonary CINC activity and neutrophil recruitment – role of circulating TNF- α and IL- β ? *Shock* 1996; 6: 39-45

Simons RK, Maier RV, Chi EY. Pulmonary effects of continuous endotoxin infusion in the rat. *Circ Shock* 1991; 33: 233-243

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101: 3516-3521

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003 ; 21: 335-376

Takehita F, Ishii KJ, Ueda A, Ishigatsubo Y, Klinman DM. Positive and negative regulatory elements contribute to CpG oligonucleotide-mediated regulation of human IL-6 gene expression. *Eur J Immunol* 2000; 30: 108-116

Takeuchi O, Akira S. MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270: 155-167

Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like Receptor 6. *Int Immunol* 2001; 13: 933-940

Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169: 10-14

Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 955-962

Trevani AS, Chorny A, Salamone G, Vermeulen M, Gamberale R, Schettini J, Raiden S, Geffner J. Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. *Eur J Immunol* 2003; 33: 3164-3174

Vincent JL, Van der Linden P. Septic shock: particular type of acute circulatory failure. *Crit Care Med* 1990; 18: 70-74

Weighardt H, Feterowski C, Veit M, Rump M, Wagner H, Holzmann B. Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J Immunol* 2000; 165: 4537–4543

Wooldridge JE, Ballas Z, Krieg AM, Weiner GJ. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* 1997; 89: 2994–2998

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002; 420: 324-329

Yamamoto S, Yamamoto T, Iho S, Tokunaga T. Activation of NK cell (human and mouse) by immunostimulatory DNA sequence. *Springer Semin Immunopathol* 2000; 22: 35-43

Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce INF and augment INF-mediated natural killer activity. *J Immunol* 1992 a; 148: 4072-4076

Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga, T. DNA from Bacteria, but Not from Vertebrates, Induces Interferons, Activates Natural Killer Cells and Inhibits Tumor Growth. *Microbiol Immunol* 1992 b; 36: 983-997

Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, Komuro K, Kohase M, Tokunaga T. Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 775–779

Yeo SJ, Yoon JG, Hong SC, Yi AK. CpG DNA induces self and cross-hyporesponsiveness of RAW264.7 cells in response to CpG DNA and lipopolysaccharide: alterations in IL-1 receptor associated kinase expression. *J Immunol* 2003; 170: 1052-1061

Yi AK, Tuetken R, Redford T, Waldschmidt M, Kirsch J, Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol* 1998;160: 4755-4761

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303: 1522-1526

Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev* 2000; 173: 39-51

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herr Priv.-Doz. Dr. med. Günther Mathiak für die Überlassung dieses Themas und die engagierte Betreuung.

Herr Dr. med. Koroush Kabir danke ich herzlichst für die kompetente und freundschaftliche Betreuung.

Ich danke Herr Dr. med. Guido Grass für seine Hilfsbereitschaft und wertvolle Unterstützung.

Herr Prof. Dr. med. Thomas Minor und seinen Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die nette Arbeitsatmosphäre.

Vielen herzlichen Dank an Frau Dr. med. Micaela Mathiak und Frau Inge Heim für die kompetente Unterstützung.

Diese Arbeit wurde durch das BONFOR Programm gefördert. (Stipendium-Nr. O-113.00004)

In besonderem Maße bedanke ich mich bei Eva Steinringer, für die Zeit, die sie mit mir im Labor verbracht hat und den liebevollen Rückhalt an jedem einzelnen Tag.

Mein großer Dank gilt meinen Eltern Irmgard und Werner Düren sowie meinen Großeltern, die mich zu jeder Zeit fördern und mir familiäre Geborgenheit schenken.