

**Bedeutung der Toll-like Rezeptor 9 Modulation mit synthetischen
Oligodesoxynukleotiden für die pulmonale Entzündungsreaktion
im Modell einer CpG-ODN induzierten Sepsis**

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

Christoph Brill
aus Gdingen/ Polen

2015

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Pascal Knüfermann
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Meyer

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.01.2015

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Hoefft

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	10
1.1 Sepsis.....	10
1.1.1 Definition der Sepsis	11
1.1.2 Epidemiologische Daten zur Sepsis.....	15
1.2 ARDS	18
1.2.1 Definition des ARDS.....	18
1.2.2 Epidemiologie des ARDS	21
1.2.3 Pathophysiologie der Sepsis und des ARDS	21
1.3 Immunsystem	25
1.3.1 Angeborene Immunität.....	25
1.3.2 Toll like Rezeptoren (TLR)	26
1.3.3 Aufbau der TLR.....	27
1.3.4 Signalweg TLR9.....	28
1.3.5 CpG-DNA und TLR9	32
1.4 Zytokine in der Sepsis	35
1.4.1 TNF- α , IL-1 β und IL-6.....	35
1.5 Arbeitshypothese.....	36
2. Material und Methoden	38
2.1 Versuchstiere.....	38
2.2 Versuchsgruppeneinteilung	39
2.3 Stimulation der Mäuse und i.v. Behandlung mit ODN.....	40
2.4 Organentnahme und Gewinnung der Proben	42
2.5 RNA-Extraktion.....	43

2.6 RNA-Konzentrationsbestimmung	45
2.7 cDNA - Transkription	46
2.8 Real Time Reverse- Transkriptase quantitative PCR (RT- qPCR)	47
2.9 Statistische Auswertung	52
3. Ergebnisse	53
3.1 Klinische Manifestation der Infektion	53
3.2 Pulmonale TNF- α Expression.....	54
3.2.1 Pulmonale TNF- α Expression 2 h nach Stimulation	54
3.2.2 Pulmonale TNF- α Expression 6 h nach Stimulation	56
3.3 Pulmonale IL-1 β Expression.....	58
3.3.1 Pulmonale IL-1 β Expression 2 h nach Stimulation	58
3.3.2 Pulmonale IL-1 β Expression 6 h nach Stimulation	60
3.4 Pulmonale IL-6 Expression.....	62
3.4.1 Pulmonale IL-6 Expression 2 h nach Stimulation	62
3.4.2 Pulmonale IL-6 Expression 6 h nach Stimulation	64
3.5 Überleben.....	66
4. Diskussion	68
5. Zusammenfassung.....	81
6. Literaturverzeichnis	82
7. Danksagung.....	101

Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
ALI	„acute lung injury“
ALV	akutes Lungenversagen
ARDS	„acute respiratory distress syndrome“
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad in Celsius
CASP	„colon ascendens stent peritonitis“
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CpG-DNA	CpG-haltige DNA
CpG-ODN	CpG-haltige Oligodesoxynukleotide
CT	„cycle threshold“
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
D-GalN	D-Galaktosamin
dsDNA	„double stranded desoxyribonucleinacid“
ssDNA	„single stranded desoxyribonucleinacid“
DNA	Desoxyribonukleinsäure (“deoxyribonucleic acid”)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	“enzyme linked immunosorbent assay“
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g	Erdschwerebeschleunigung: $g = 9,80665 \text{ m/s}^2$
G	Gauge, Maßeinheit für den Außendurchmesser einer Kanüle
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIT	Guanidinisothiocyanat

ICAM-1	„intercellular adhesion molecule-1“
IFN	Interferon
IKK	„inhibitory κ B kinase“
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
i.p.	intraperitoneal
IRAK	„interleukin-1-receptor-associated-kinase“
IRS954	„immun regulatory sequence 954“
JNK	“C-Jun-N-terminal kinase“
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
MKK6	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase 6
MODS	„multiple organ dysfunction syndrome“
MOV	Multiorganversagen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MyD88	„myeloid differentiation marker 88“
NF κ B	„Nuclear factor κ B“
NIK	NF κ B „inducing kinase“
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAMP	„pathogen associated microbial pattern“
p.o.	per os
PBS	„phosphate-buffered saline“; Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“; Polymerasekettenreaktion
PCWP	Lungenkapillarverschlussdruck
PEEP	„positive end-expiratory pressure“
PGN	Peptidoglykan
PRR	„pattern recognition receptor“
PS-ODN	Phosphorthioat-ODN

PTO-Rückgrat	Phosphorthioat-Rückgrat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RQ	relativer Quotient
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SIRS	„systemic inflammatory response syndrome“
SLE	systemischer Lupus erythematoses
TAK1	„transdermal growth factor-activated-kinase-1“
TBE	Standardpuffer aus Tris-Borat und EDTA
TIR-Domäne	Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TLR9	Toll-like Rezeptor 9
TLR9-D	TLR9 defizient; „knock-out“
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNM	Tumorklassifikation
TRAF6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes-Faktor-6
TRAM	„TRIF related adapter molecule“
TRIF	„Toll/IL-1 receptor containing adapter including interferon β “
UTP	Uraciltriphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Sepsis

Die Sepsis ist ein komplexes, schwerwiegendes und häufiges Krankheitsbild in der Intensivmedizin. Der Begriff wurde bereits in der Antike geprägt und entstammt dem griechischen *σηπω*, was frei übersetzt „faul machen“ bedeutet. Eine erste international anerkannt und bindende Definition des Begriffes Sepsis erfolgte allerdings erst 1991 (s. unten). Angesichts des demographischen Wandels in den modernen Industriegesellschaften mit zunehmender Überalterung der Bevölkerung und einer gleichzeitig zu beobachtenden Zunahme von hochinvasiven Eingriffen an alten, multimorbiden Patienten ist mit einer Zunahme von Sepsiserkrankungen zu rechnen. Die Sepsis stellt bereits heute eine der wesentlichen Herausforderungen für die Intensivmedizin dar. Diese Erkrankung ist die Haupttodesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen (Engel et al., 2007). Auch wenn es zahlreiche Fortschritte in der supportiven und adjunktiven Therapie gibt, konnte die Letalität *bis dato* nicht signifikant gesenkt werden. Die Kosten für die lange Therapiedauer und bleibende Organschäden machen die Sepsis zusätzlich zu einem gesundheitsökonomischen Problem (Burchardi und Schneider, 2004).

Die Forschung auf dem Gebiet der Immunologie und speziell an den Toll-like Rezeptoren (TLR) konnte neue Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Sepsis erbringen. Durch ihre zentrale Stellung im angeborenen Immunsystem bieten TLR möglicherweise ein therapeutisches Ziel für die Behandlung systemisch entzündlicher Erkrankungen wie der Sepsis. Für ihre Arbeiten auf dem Gebiet der TLR-Forschung erhielten Jules Hoffmann und Bruce Beutler 2011 den Nobelpreis für Medizin, was nochmals die Bedeutung dieser Rezeptorfamilie für die immunologische medizinische Wissenschaft unterstreicht.

In Experimenten konnte der Zusammenhang zwischen TLR und Proteinen, die TLR-abhängig induziert werden und dann das klinische Bild der Sepsis vermitteln können, in Teilen bereits aufgeschlüsselt werden. Als Hauptvermittler der Entzündungsreaktion gelten hierbei die Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin- 1β (IL- 1β) und Interleukin-6 (IL-6) (Dinarello, 2000). Hemmi und seine Kollegen beschrieben 2000 erstmalig die Rolle von TLR9 als Sensor für bakterielle DNA im Rahmen der Entzündungsreaktion. Genau wie bakterielle DNA führen auch

synthetische unmethylierte CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) zu einer TLR9-abhängigen inflammatorischen Antwort (Hemmi et al., 2000). Mittlerweile weiß man um die Möglichkeit, den TLR9 sowohl stimulatorisch als auch inhibitorisch mit synthetischen ODN zu beeinflussen (Krieg und Vollmer, 2007). Für Krankheiten wie die Sepsis, dem systemischem *Lupus erythematoses* (SLE) oder rheumatoider Arthritis wird eine TLR9 antagonistische, antiinflammatorische Strategie verfolgt (Broide, 2009; Duramad et al., 2005; Zeuner et al., 2002).

1.1.1 Definition der Sepsis

Wie bereits oben erwähnt, stellt die Sepsis eine große Herausforderung für die moderne Intensivmedizin dar. Die Verbesserung von therapeutischen Strategien verlangt hierbei eine möglichst einheitliche Definition der Erkrankung, die sich auf vergleichbare Parameter stützt. Bereits 1914 definierte Hugo Schottmüller (1867-1936) wesentliche Grundzüge der Sepsis:

"Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden."
(Schottmüller, 1914)

Eine moderne Definition, die der heutigen wissenschaftlichen Ansicht genügt, formulierten Werdan und Kollegen:

„Sepsis ist die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen.“

Hierbei werden die unterschiedlichen Grundprinzipien der Sepsis berücksichtigt:

- Der septische Fokus, also die Infektionsquelle als Ausgangspunkt der systemischen Reaktion
- Das Eindringen pathogener Keime und toxischer Keimprodukte
- Die Bildung und Aktivierung von Mediatoren
- Die Zellfunktionsstörungen
- Die Multiorgandysfunktion/-Insuffizienz im klinischen Aspekt und das Multiorganversagen am Ende des Kontinuums der Sepsis (Werdan et al., 2005)

1991 legte eine Konsensus-Konferenz des „American College of Chest Physicians“ (ACCP) und der „Society of Critical Care Medicine“ (SCCM) einen Diagnosekatalog für die *bis dato* unzureichend geklärte Definition der Sepsis vor (siehe Tabelle 1).

Klinische und biochemische Parameter werden hierbei zur Diagnose einer Sepsis herangezogen. Gleichzeitig wird differenziert zwischen SIRS, Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock. Das „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) ist definiert als eine allgemeine, entzündliche Abwehrreaktion auf unterschiedliche Reize wie Trauma, Verbrennung, Pankreatitis und Hypoxie (Reinhart et al., 2006). Fieber oder Hypothermie, Tachykardie, Tachypnoe oder Hyperventilation und Leukozytose oder Leukopenie, aber auch unreife Granulozyten, sind Merkmale, die zur Diagnose eines SIRS herangezogen werden. Mindestens zwei dieser Kriterien müssen zutreffen, ohne dass eine Bakteriämie oder Infektion im klassischen Sinne vorliegt (Bone et al., 1992).

Von einer Sepsis spricht man, wenn analog zum SIRS mindestens zwei der Kriterien vorliegen und zusätzlich eine bakterielle, fungale oder virale Infektion anzunehmen oder nachgewiesen ist. Die Sepsis ist demnach eine Reaktion auf eine Infektion, die allerdings noch keine Organdysfunktion aufweist.

Bei einer schweren Sepsis liegen zusätzlich Symptome eines Organversagens der Lunge, der Niere, der Leber und/oder des Herzens vor. Ebenfalls einhergehen können Störungen des Gastrointestinaltraktes, des ZNS (Delir), des Knochenmarks sowie des Gerinnungs- und Immunsystems (Engelmann und Schuster, 2006).

Der septische Schock ist gekennzeichnet durch anhaltenden Blutdruckabfall trotz adäquater Volumen- und Vasopressorentherapie. Mit der arteriellen Hypotension kommt es zur Minderperfusion von Organen. Folglich können gravierende Organdysfunktionen auftreten, die im schlimmsten Fall zu einem Versagen mehrerer Organsysteme führen („Multiorgansversagen“, MOV)(Mizock, 2009). Die Letalität ist beim Vorliegen eines MOV und septischen Schocks am höchsten und die Therapiedauer verlängert sich entsprechend der Schwere der Grunderkrankung (Alberti et al., 2003; Angus et al., 2001).

	Definition und Kriterien nach ACCP/SCCM Konsensus Konferenz
Infektion	entzündliche Gewebsreaktion auf Mikroorganismen oder eine Invasion von Mikroorganismen in normalerweise sterilem Gewebe
SIRS	manifestiert sich durch zwei oder mehr der folgenden Befunde ohne Infektion: <ul style="list-style-type: none"> • Temperatur >38° C oder <36° C • Herzfrequenz >90/min • Atemfrequenz >20/min oder PaCO₂ <32 mmHg • Leukozyten >12/nl oder <4/nl • oder Linksverschiebung / unreife Formen >10 %
Sepsis	systemische Reaktion, charakterisiert durch zwei oder mehr der Symptome wie bei SIRS, allerdings als Reaktion auf eine vorliegende/anzunehmende Infektion
Schwere Sepsis	Sepsis mit neu aufgetretenen Zeichen <ul style="list-style-type: none"> • gestörter Organfunktion oder • gestörter Organperfusion • arterielle Hypoxämie: PaO₂ unter kPa (75 mmHg) • Laktatazidose • renale Dysfunktion/ Oligurie: Urinproduktion <30 ml/h oder 0,5 ml/kg/h • akute Enzephalopathie • Sepsis-induzierte Hypotonie
MODS	Funktionsverlust zweier oder mehrerer Organsysteme gleichzeitig oder in Folge
MOV	etabliertes, irreversibles Versagen mehrerer Organe

Tab. 1: Definition der Infektion, SIRS, Sepsis, schweren Sepsis, MODS (Bone et al.,1992)

Eine Abschätzung des Schweregrades der Krankheit kann über Scoring-Systeme wie die „Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II“ (APACHE II) oder das „Sequential Organ Failure Assessment“ (SOFA II) getroffen werden, die auch signifikant mit dem Überleben korrelieren

(Friedman et al., 1998). Seit einigen Jahren wurde, angelehnt an die TNM Klassifikation, ein weiteres Modell zur Schweregradeinteilung einer Sepsis erarbeitet. Das Staging-Modell PIRO besteht aus der Prädisposition (P), die genetische Polymorphismen berücksichtigt, der Infektion (I), der Immunantwort (*Response*, R) und den resultierenden Organdysfunktionen (O). Die Anwendung von PIRO soll das Stadium, in dem sich die Sepsispatienten befinden, besser erfassen und somit zeitkritische Therapieentscheidungen lenken. Bisher hat es jedoch noch keine breite Anwendung in der Klinik gefunden (Opal, 2005).

1.1.2 Epidemiologische Daten zur Sepsis

Die Letalität der Sepsis ist weiterhin hoch (Angus et al., 2001). Steigendes Patientenalter, Polymorbidität, Immunschwäche und hoher Invasivitätsgrad diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen verschärfen die Situation zusätzlich. So muss mit einer Inzidenz-Zunahme der Sepsis auch in der Zukunft gerechnet werden.

In Deutschland erkranken nach einer Beobachtungsstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet) 75.000 Einwohner an einer schweren Sepsis bzw. 79.000 an einer Sepsis pro Jahr. Nach dem Krebsleiden und dem Myokardinfarkt stellen die septischen Erkrankungen mit ca. 60.000 Todesfällen pro Jahr die dritthäufigste Todesursache dar. Auf nicht-kardiologischen Intensivstationen ist die Sepsis sogar die Haupttodesursache (Engel et al., 2007). Je schwerwiegender die Sepsis des Patienten verläuft, umso schlechter ist die Prognose, und umso länger und teurer wird die Behandlung (Alberti et al., 2003; Burchardi und Schneider, 2004). Bei älteren Menschen sind Inzidenz und Mortalität der Sepsis erhöht. Andere Risikofaktoren sind Vorerkrankungen wie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), kardiovaskuläre Erkrankungen, Malignome, Mangelernährung und chronische Leberfunktionsstörungen (Brun-Buisson et al., 2004a).

Die Überlebenschancen von Patienten im septischem Schock sinken mit dem verzögerten Beginn einer antibiotischen Therapie um ca. 7 % pro Stunde (Kumar et al., 2006). Daher ist es imperativ, das Entstehen einer schweren Sepsis durch schnelle und gezielte Antibiotikatherapie zu verhindern. Dieses wünschenswerte Vorgehen ist allerdings häufig in der Praxis durch die komplexe Diagnose der Sepsis im Frühstadium der Erkrankung erschwert. Neben CRP und

Procalcitonin wird ein zusätzliches immunologisches Monitoring zur schnellen Diagnose und gezielten Therapie der Sepsis erforscht. In der jüngeren Vergangenheit hat man versucht, das proinflammatorische Zytokin IL-6 als wesentlichen Marker für den Schweregrad und die Prognose für die Sepsis heranzuziehen (Adamik et al., 1997; Haasper et al., 2010; Tschakowsky et al., 2011). Allerdings kann IL-6 alleine die komplexe Inflammationsreaktion nicht genau abbilden und ist höchstens in Ergänzung mit anderen Biomarkern als diagnostisches Mittel in der Praxis zu erwägen (Brunkhorst, 2006; Dimopoulou et al., 2007; Tsalik et al., 2012).

In Zeiten knapper Gesundheitsbudgets ist auch die finanzielle Belastung durch die Sepsis zu berücksichtigen. Nach Angaben des Kompetenznetzwerks Sepsis (SepNet) macht die Behandlung von Sepsispatienten in Deutschland 30 % des Budgets deutscher Intensivstationen aus (Engel et al., 2007).

Waren in der Zeit von 1970 bis 1980 gram-negative Bakterien die Hauptursache der Sepsis, kommen mittlerweile gram-positive Erreger ebenso häufig vor (Martin et al., 2003). Die häufigsten nachgewiesenen Bakterien sind hierbei *Escherichia coli*, *Staphylokokkus pneumoniae*, koagulasenegative Staphylokokken, Enterokokken, *Klebsiella spp.* und *Pseudomonas spp.* (Werdan et al., 2005).

Als Infektionsort steht der untere Respirationstrakt an erster Stelle, gefolgt vom Abdomen, primären Bakteriämien und urogenitalen Infektionen (Bernard et al., 2001; Brunkhorst, 2006; Marik und Varon, 2001)(siehe auch Tabelle 2). Den entzündlichen Veränderungen in der Lunge kommt somit sowohl für die Entstehung als auch für den Verlauf einer Sepsis eine wichtige Bedeutung zu.

	Angus et al., 2001	Brunkhorst, 2006
Respirationstrakt	44 %	63 %
Intraabdominell	9 %	25 %
Bakteriämie	17 %	unbekannt
Urogenital	9 %	7 %

Tab. 2: Lokalisationen von Infektionsherden bei Sepsis (nach Angus et al., 2001; Brunkhorst, 2006)

1.2 ARDS bei Sepsis

1.2.1 Definition

Auch wenn bereits Anfang des letzten Jahrhunderts der Zusammenhang zwischen Sepsis und dem heutzutage als „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) bekannten Krankheitsbild hergestellt wurde, waren es 1967 Ashbaugh und seine Kollegen, die als erste das akute Lungenversagen im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion als ARDS beschrieben (Ashbaugh et al., 1967). Bei 12 der 272 ateminsuffizienten Patienten in ihrer Studie fand man akut progrediente Symptome wie schwere Dyspnoe, Tachypnoe, Zyanose und schwere Hypoxämie. Die Klinik der Patienten konnte weder nach einer eingeleiteten Sauerstofftherapie noch durch eine intermittierende Positivdruckbeatmung („positive end-expiratory pressure“, PEEP) verbessert werden. Weitere Merkmale waren bilaterale diffuse Lungeninfiltrate auf der Röntgen-Thorax Aufnahme und eine reduzierte Lungencompliance. Aufgrund der kollabierten Alveolenareale und steifen Lungen war ein deutlich erhöhter Spitzendruck zur Beatmung dieser Patienten notwendig. Nach Obduktion von sieben Patienten dieser Gruppe entdeckte man hyaline Membranen an den Alveolen, pulmonale Atelektasen und schwere, nicht kardial bedingte Lungenödeme, die weitere Charakteristika des ARDS darstellen. Darüber hinaus deutete der erhöhte Oberflächendruck der schaumig gefüllten Lungen auf eine Surfactantfunktionsstörung hin (Petty, 2001).

Um das Syndrom vom Atemnotsyndrom des Neugeborenen („infant respiratory distress syndrome“, IRDS) abzugrenzen, präzisierten Ashbaugh und Petty 1971 den Begriff des ARDS als *adult respiratory distress syndrome*.

Direkte pulmonale Schädigung	Indirekte extrapulmonale Ursache
Pneumonie	Sepsis / Multiorganversagen
Aspiration von z.B. Magensaft	Polytrauma
Rauchvergiftung	Massentransfusion
Ventilator-assoziierte Lungenschädigung	Verbrennung
Beinahe-Ertrinken	Peritonitis / Pankreatitis

Tab. 3: Ursachen für ein ARDS (nach Werdan et al., 2005)

Das ARDS kann von unterschiedlichen intrapulmonal und extrapulmonalen Stimuli induziert werden. Allerdings verläuft die Abwehrreaktion der Lungen unabhängig vom Auslöser relativ uniform (Hudson et al., 1995). Bei der *direkten*, also intrapulmonalen Schädigung, können (virale, bakterielle und mykoplasmale) Pneumonien, Magensaftaspirationen, Rauchvergiftungen und Thoraxtraumata ein ARDS verursachen. Interessanterweise kann ein inflammatorisches Lungenversagen auch *indirekt*, also als Folge von extrapulmonalen Ursachen, verursacht werden, wie z.B. während einer Sepsis oder nach Bluttransfusionen, Verbrennungen oder Pankreatitiden (siehe Tabelle 3). Die extrapulmonalen Krankheitsverläufe sind häufig entscheidend für die Letalität, besonders bei septischen Patienten, die ein ARDS entwickeln. So sterben die Patienten meist nicht am ARDS, sondern an anderen Folgen der Sepsis (Piantadosi und Schwartz, 2004). Mit der erweiterten Definition des ARDS von Murray und dessen so genannten „lung injury score“ wurde 1988 im Wesentlichen eine Schweregradeinteilung verschiedener Formen der akuten Lungenschädigung, *acute lung injury* (ALI), möglich. Um Studien über das ARDS besser

vergleichen zu können und eine weltweit übereinstimmende Definition des Syndroms zu erhalten, wurde 1992 eine internationale Konferenz einberufen. Die hier verabschiedete Definition des ARDS ist auch heute noch gültig. Es wird zwischen dem ALI und dem ARDS differenziert.

	ALI	ARDS
Röntgen-Thorax	bilaterale diffuse Infiltrate	bilaterale diffuse Infiltrate
Eintritt	akut	akut
Oxygenierung	$P_aO_2/FiO_2 \leq 300$ mmHg	$P_aO_2/FiO_2 \leq 200$ mmHg
Pulmonaler Kapillardruck (PCWP)	≤ 18 mmHg PCWP; sonst: fehlende Zeichen einer Linksherzinsuffizienz	≤ 18 mmHg PCWP; sonst: fehlende Zeichen einer Linksherzinsuffizienz

Tab. 4: Definition ALI / ARDS nach der „American-European Consensus Conference on ARDS“ (nach Bernard et al., 1994)

Wie aus der Tabelle 4 abzuleiten ist, bleibt das ARDS eine vorwiegend klinische Diagnose. Zu Beginn eines ARDS besteht oft eine Diskrepanz zwischen bereits vorhandener klinischer Symptomatik und noch fehlendem radiologischen Befund (Striebel, 2008). Weiterhin bleibt zu bedenken, dass die röntgenologischen Veränderungen oft nicht spezifisch sind, so dass man differentialdiagnostisch an eine Pneumonie, ein kardiogenes Lungenödem, das Aspirationssyndrom (Mendelson-Syndrom), einen *Status asthmaticus*, eine Lungenkontusion oder eine Lungenembolie denken muss. Fehlende Parameter zur Erschließung der Entzündungssymptomatik und der Kapillarpermeabilitätsstörung der Lunge zeigen weitere Schwächen des Definitionskataloges auf (Schuster, 1997). Wegen enttäuschender Zuverlässigkeit in Hinsicht auf die Prognoseaussage der Überlebenswahrscheinlichkeit beim Murray-Score und der Definition der Amerikanisch-Europäischen Konsensuskonferenz, orientiert man sich wie bei

der Sepsis am APACHE II oder SAPS II *Score* (Ferring und Vincent, 1997). Dies verdeutlicht nochmals die Bedeutung der systemischen inflammatorischen Reaktion für das Überleben und *Outcome* der Patienten.

1.2.2 Epidemiologie des ARDS

In einer großen skandinavischen Studie ergab sich eine Inzidenz von 17,9 für ein ALI und 13,5 pro 100.000 Einwohner für das schwere Krankheitsbild des ARDS (Luhr et al., 1999). Die höchste Inzidenz für das Auftreten eines akuten Lungenversagens liegt hierbei bei septischen Patienten (Hudson et al., 1995). Gleichzeitig ist die Letalität bei Auftreten einer Sepsis mit ARDS am höchsten (Ferring und Vincent, 1997).

Nach Daten der „ALIVE Study Group“ liegt die Inzidenz für das akute Lungenversagen bei 7,1 % und die Sterblichkeit auf Intensivstation für ein ALI bei 22,6 %, für das ARDS bei 49,4 % (Brun-Buisson et al., 2004b).

Einige Autoren haben in Metaanalysen dank der verbesserten supportiven Maßnahmen und verbesserten Beatmungstherapien die Letalität in den letzten Jahren sinken sehen (Zambon und Vincent, 2008). Andere Arbeiten sehen hingegen keine relevante Änderung der Sterblichkeitsrate (Phua et al., 2009). Ursachen für diese unterschiedlichen Interpretationen sind die große Variation der zugrundeliegenden epidemiologischen Daten: so sind unterschiedliche Auslöser eines akuten Lungenversagens z.T. nicht berücksichtigt, und die ARDS Definition wird weiterhin uneinheitlich angewendet (Lewandowski und Lewandowski, 2006). Somit bleiben epidemiologische Daten zum ARDS weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen.

1.2.3 Pathophysiologie der Sepsis und des ARDS

Die Sepsis kann durch eine Vielzahl an verschiedenen Stimuli wie Mikroorganismen, Viren, bakteriellen Toxinen wie Endo- und Exotoxine verursacht werden (Faure et al., 2001). Allerdings ist nicht nur die Pathogenität, Quantität oder Virulenz des Erregers, sondern zu einem großen Teil auch die Immunantwort des Wirtes entscheidend für den Verlauf der Erkrankung (Beutler und Poltorak, 2001). Unter physiologischen Bedingungen ist der menschliche Körper in der Lage,

den oben genannten Mikroorganismen und Pathogenen mit einer gezielten und adäquaten Immunantwort zu begegnen, ohne dass es zu einer fulminanten generalisierten Reaktion kommt. Vielmehr wird die Infektion lokal vor allem durch das angeborene Immunsystem bekämpft, unter Kontrolle gehalten und somit systemische Organschäden weitestgehend vermieden. Bei einer Sepsis hingegen wird das Ausmaß der lokalen physiologischen Abwehrreaktion weit überschritten und amplifiziert sich selbst in eine systemische, pathologische Inflammationsreaktion. Diese Fehl- oder Überaktivierung des angeborenen und auch adaptiven Immunsystems führt hierbei u.a. zu einer unkontrollierten Überproduktion an Zytokinen, die die inflammatorische Reaktion weiter verstärken und aufrechterhalten. Kaskadenartig kommt es auf verschiedenen Ebenen zu systemischen entzündlichen Reaktionsmechanismen und schließlich zur Entgleisung der Homöostase. Dies zeigt sich schließlich in den typischen klinischen Zeichen der Sepsis.

Das ARDS läuft trotz verschiedener Ursachen (siehe Tabelle 3) stereotyp und stadienartig ab. Zu Beginn werden pulmonal und auch systemisch proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 exprimiert. Im Zuge einer schweren Sepsis treten in der Lunge häufig an erster Stelle Dysfunktionen oder ein komplettes Organversagen auf (Werdan et al., 2005). Bei diesem auch als „remote-injury“ bezeichneten, also extrapulmonal induzierten Lungenschaden, gelangen proinflammatorische Mediatoren und Zellen der Immunabwehr schnell und in hoher Konzentration in die Lungenstrombahn. Über Zytokine werden Proteasen und Arachidonsäuremetaboliten (Thromboxan A₂, Prostazyklin und Prostaglandin E₂) freigesetzt. Selektine und ICAM-1 vermitteln die Adhäsion von Leukozyten, v.a. neutrophilen Granulozyten, am Endothel, deren Übertritt nach interstitiell sowie die Aktivierung dieser Immunzellen (Strieter und Kunkel, 1994). Zuerst treten Leukozyten über den Blutfluss mit den Organendothelzellen in Kontakt und rollen verlangsamt am Endothel entlang („rolling“)(Malik, 1993). Diese erste Verbindung zwischen Leukozyt und Endothel wird über Selektine hergestellt (Adhäsion). Anschließend wird über Integrine wie ICAM-1 chemotaktisch eine feste Bindung zwischen Leukozyten und Endothelgewebe geschaffen. So aktivierte, adhärierende Immunzellen treten als nächstes durch Lücken im Endothel hindurch und gelangen ins Interstitium (Diapedese) und akkumulieren dort (Smith, 1993). Die nun im Gewebe freigesetzten reaktiven und zelltoxischen Substanzen wie Sauerstoffradikale schädigen nicht nur die Erreger, sondern

auch die gesunden Zellen des Wirts (Weinacker und Vaszar, 2001). So tragen Endothelzellen in der Lunge, die für die Integrität der Alveolarkapillareinheit sorgen, einen hohen Schaden davon. Durch die erhöhte Permeabilität am Endothel entsteht ein kapilläres Leck („capillary leak syndrome“). In der Lunge kommt es zum pathophysiologischen Einstrom von Plasmaproteinen und somit zum perivasalen, peribronchialen sowie interstitiellen Ödem. Vor allem durch die Zytokinwirkung von in Alveolarmakrophagen gebildetem TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und durch die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen am stimulierten Endothel gelangen neutrophile Granulozyten durch die nun geschädigte Alveolarkapillareinheit zum vermeintlichen Infektionsort in der Lunge und setzen vermehrt gewebsschädigende Stoffe frei (Strieter und Kunkel, 1994).

Ähnlich wie die Endothelzellen werden die *Surfactant*-produzierenden Pneumozyten durch die Zytokinantwort direkt geschädigt und gehen in beträchtlicher Zahl unter. Zusätzlich verliert das Surfactantprotein seine Wirkung, wenn es sich mit zu viel Wasser oder Proteinen vermischt (Petty, 2001). Das Surfactantprotein ist von entscheidender Bedeutung für die Ventilation der Alveolen. Indem es die Oberflächenspannung reduziert, können sich die Alveolen frei entfalten und sauerstoffhaltige Luft zum Gasaustausch aufnehmen. Ein Kollaps der Alveolenbläschen wird somit verhindert. Verheerender Weise bestehen beim ARDS nun also ein quantitativer Surfactantmangel und eine qualitative Surfactantfunktionsstörung. Surfactantproteine bilden zusammen mit dem nekrotischen fibrinreichen Zellmaterial die histopathologisch charakteristischen eosinophilen hyalinen Membranen, die sich an den Alveolarwänden ablagern. Die kollabierten und überfluteten Alveolen sind in ihrer Funktion für den Gasaustausch stark beeinträchtigt. Die Atemarbeit ist durch das interstitielle und alveoläre Ödem und die systemisch wirkende Entzündungsreaktion bedeutend erschwert. Außerdem können Mikrovaskulationsstörungen mit einer paradox ablaufenden Gerinnung auftreten, die zur Ausbildung von Mikrothromben und resultierender pulmonaler Hypertension führen (Chambers, 2008). Als Folge entwickelt sich ein funktioneller Shunt zwischen nicht ventilerten Alveolen mit venös sauerstoffarmem Blut und noch ventilerten Alveolen mit sauerstoffgesättigtem Blut aus. Bei einem hohen intrapulmonalen Shunt resultiert somit eine systemische arterielle Hypoxämie (Ware und Matthay, 2000).

Nach etwa fünf bis sieben Tagen beginnt die proliferativ-fibrosierende Spätphase des ARDS, die durch typische irreversible Umbauprozesse am Lungenparenchym geprägt ist. Interstitiell, aber auch alveolär, findet eine Fibrosierung des Lungengewebes statt, mit der Folge einer Lungenversteifung und irreversibel reduzierten Lungencompliance (Martinet et al., 1996).

1.3 Immunsystem

Obwohl der menschliche Organismus täglich Mikroorganismen und potentiell pathogenen Keimen ausgesetzt ist, kommt es verhältnismäßig selten zu einer Erkrankung. Dieser Schutz vor Fremdpathogenen wird durch das Immunsystem gewährleistet, das sich aus zwei Säulen zusammensetzt.

Die phylogenetisch ältere, angeborene Immunität reagiert sehr schnell aber relativ unspezifisch. Sie ist prinzipiell ab der Geburt vorhanden, relativ konstitutiv und wird weiter vererbt (Janeway und Murphy, 2009). Im Verlauf der Evolution hat der Säugetier-Organismus zusätzlich eine adaptive bzw. erworbene Immunität entwickelt, die zeitverzögert einsetzt und auf einer antigenspezifischen Antwort beruht. Dank der klonalen Selektion von antigenspezifischen Rezeptoren auf T- und B-Lymphozyten während derer Vervielfältigung, reagiert dieses adaptive Immunsystem hochspezifisch. Ein Teil der Lymphozyten bleibt nach der Eliminierung des Antigens als Gedächtniszellen im Organismus erhalten, um bei erneutem Antigenkontakt schneller und verstärkter reagieren zu können. Diese langlebigen, aktivierten Lymphozyten bilden das immunologische Gedächtnis (Alberts, 2009).

1.3.1 Angeborene Immunität

Meist werden Mikroorganismen innerhalb von Minuten vom angeborenen Abwehrsystem erkannt und bekämpft. Diese schnelle Reaktion des menschlichen Organismus fußt wiederum auf einer Reihe von netzwerkartig induzierten Verteidigungsmechanismen. Die Fähigkeit der Abwehrzellen zwischen eigen und fremd zu unterscheiden ist hierbei eine Grundvoraussetzung für eine funktionierende Immunabwehr (Medzhitov und Janeway, 2002).

Dies wird ermöglicht durch sog. Mustererkennungsrezeptoren, die für den Ablauf der Abwehrmechanismen verantwortlich sind, indem sie zwischen körpereigenen und infektiösen bzw. körperfremden Liganden differenzieren. Diese als „pattern recognition receptors“ (PRR) bezeichneten Mustererkennungsrezeptoren sind keimbahncodiert, das bedeutet, dass für einen Rezeptor jeweils ein Gen kodiert (Pasare und Medzhitov, 2005). Sie entstehen nicht durch somatische Rekombination wie die Antigenrezeptoren des erworbenen Immunsystems (Schatz et al., 1992). PRR können entweder aktiv von Zellen sezerniert werden oder liegen gebunden an

der Zelloberfläche, in intrazellulären Kompartimenten oder im Zytoplasma vor (Ballou und Kushner, 1992).

Als membranständige oder intrazelluläre PRR spielen die „Toll-like Rezeptoren“ (TLR) eine bedeutende Rolle für das Immunsystem und sind Gegenstand intensiver Forschungsvorhaben. Die PRR verfügen über ein vorgegebenes Repertoire an konservierten Strukturen, die potentiell pathogene Liganden erkennen. Identifiziert ein Rezeptor einen Ligand als fremd, kann eine spezifische Immunantwort initiiert werden (Takeda et al., 2003). Bei den Liganden handelt es sich um hoch konservierte Molekularstrukturen, die man als „pathogen associated molecular patterns“ (PAMP) bezeichnet. Diese PAMP befinden sich nur auf Mikroben, nicht aber auf körpereigenen gesunden Zellen (Basset et al., 2003; Medzhitov et al., 2001). In die Gruppe der PAMP fallen zum Beispiel bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS) bei gramnegativen Erregern, Peptidoglykan (PGN) bei grampositiven Erregern, Lipoteichonsäure, bakterielle Lipoproteine (Akira et al., 2006; Ozinsky et al., 2000; Schwandner et al., 1999), Flagellin (Hayashi et al., 2001) und virale oder bakterielle DNA und RNA (Tokunaga et al., 1984). An PRR bindet auch die Gruppe der DAMP („damage-associated molecular patterns“), die durch den Untergang von körpereigenem Gewebe freigesetzt werden und ebenfalls eine Abwehrreaktion induzieren (Bianchi und Manfredi, 2007; Vabulas et al., 2002).

1.3.2 Toll-like Rezeptoren

Unter den PRR sind die Toll-like Rezeptoren (TLR) die am besten erforschte Gruppe, und diese nimmt eine entscheidende Rolle in der Entzündungsreaktion ein.

1984 entdeckte Christine Nüsslein-Vollhard in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* das Toll Protein, das bei der dorsoventralen Entwicklung im Fliegenembryo mitwirkt (Belvin und Anderson, 1996).

Später erkannte man die Bedeutung des Toll Proteins auch für die Immunkompetenz der Fruchtfliege (Lemaitre et al., 1996). Für die Entdeckung des Toll Proteins wurde Nüsslein-Vollhard 1995 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Aufgrund der Sequenzhomologien zum Toll Protein wurde eine später entdeckte Gruppe von Erkennungsrezeptoren bei Vertebraten, deshalb als Toll-like Rezeptoren bezeichnet (Medzhitov und Janeway, 1998).

Mit der Entdeckung der TLR konnte man erhebliche Fortschritte im Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen bei Entzündungen und der Sepsis erzielen (Faure et al., 2001; Takeuchi et al., 1999). Im Zuge der intensiven Forschungsbewegung auf dem Gebiet der angeborenen Immunität zählt man gegenwärtig 10 humane TLR und 13 Typen der TLR bei Säugetieren (Kumar et al., 2006). Die TLR sind in Tabelle 5 mit den Liganden und den Funktionen aufgelistet.

1.3.3 Aufbau der TLR

TLR sind Typ I Transmembran-Glykoproteine. Ihr Aufbau ist zum einen gekennzeichnet von einer extrazellulären, N-terminalen, Leucin-reichen Domäne (*leucin rich repeats*, LRR), die für die Erkennung der PAMP verantwortlich ist (Bell et al., 2003). Als zweites Merkmal besitzen TLR eine zytoplasmatische C-terminale Toll/Interleukin-1 Rezeptor Domäne (TIR), deren Bezeichnung auf die Homologie zum IL-1-Rezeptor zurückgeht, der ebenfalls eine Entzündungsreaktion unterhält. Über die TIR-Domäne wird die Signaltransduktion initiiert (Dunne und O'Neill, 2003; Rock et al., 1998).

TLR werden sowohl transmembranär auf der Zelloberfläche, als auch intrazellulär in endosomalen Kompartimenten exprimiert. Die Pathogenerkennung erfolgt somit an der Zelloberfläche oder im Fall von TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 intrazellulär an Endosomen (Heil et al., 2004; Latz et al., 2004; Palm und Medzhitov, 2009).

Für die über bakterielle DNA induzierte Immunantwort scheint TLR9 die wichtigste Rolle einzunehmen (Hemmi et al., 2000). Man findet TLR9 vor allem in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) und in B-Lymphozyten (Hornung et al., 2002). Parenchymzellen des Herzen, der Milz und der Nieren tragen ebenfalls TLR9 (Boyd et al., 2006; Eleftheriadis und Lawson, 2009; Tsujimoto et al., 2006). So spielt TLR9 auch bei der septischen Kardiomyopathie eine wichtige Rolle (Knuefermann et al., 2008). Ebenso werden im Lungengewebe TLR9 konstitutiv exprimiert (Ehrentraut et al., 2011; Nadigel et al., 2011; Yu und Chen, 2008). Aufgrund von der TLR9-abhängigen Aktivierung Typ- I-Interferon produzierender pDC (Yamamoto et al., 1992), geht man ebenfalls von einer antiviralen Reaktionsfähigkeit der TLR9 aus (Lund et al., 2003).

1.3.4 TLR9 Signalweg

Mit Ausnahme von TLR3 verläuft die Signaltransduktion aller TLR über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB. NFκB wiederum reguliert die Transkription inflammatorisch wirksamer Proteine, wie z.B. proinflammatorische Zytokine (Brown und Jones, 2004).

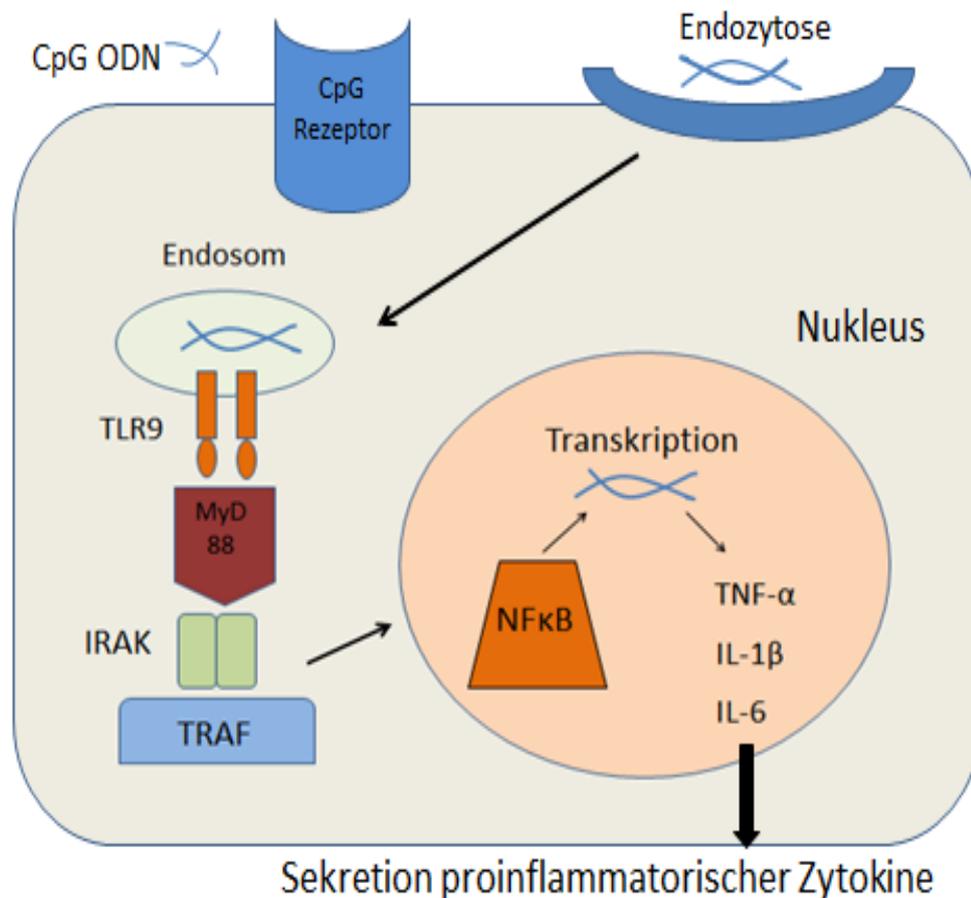


Abb. 1: TLR9 Signalweg (nach Fonseca und Kline, 2009). Über Endozytose wird das CpG-ODN intrazellulär eingebracht und führt zur Aktivierung der TLR9 am endoplasmatischen Retikulum. Über das Adapterprotein MyD88, die Proteinkinasen (IRAK) und TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAF) kommt es schließlich im Zellkern zu einer NFκB-abhängig gesteigerten Transkription der proinflammatorischen Zytokine (TNF-α, IL-1β und IL-6). Der TLR9 Signalweg wird detailliert im Text erläutert (siehe Kapitel 1.3.4).

Im Folgenden wird der Signalweg bei Aktivierung von TLR9 geschildert (siehe Abbildung 1). Nach heutigem Wissensstand wird ein endozytotischer Aufnahmeprozess der PAMP ins Zellinnere angenommen. Hiernach wird der ruhende TLR9 rekrutiert. Dieser befindet sich zunächst im endoplasmatischen Retikulum, wird über den Golgi Apparat und dann mit Hilfe eines Transmembranproteins UNC93b1 (Brinkmann et al., 2007) in die endosomalen Kompartimente transportiert (Hacker et al., 1998).

Hier kommt es zur sog. endosomalen Reifung von TLR9 im sauren pH-Milieu. Die auch als Azidifikation bezeichnete Reifung ist notwendig für die Bindung der Liganden an TLR9 und somit Voraussetzung für die Aktivierung des Rezeptors (Latz et al., 2004). Die Ektodomäne von TLR9 (TLR9ecto) wird über pH-sensitive Proteasen, der Cathepsin- und Asparaginendopeptidase, enzymatisch verändert (Ewald et al., 2011). Die durch diese Enzyme zugeschnittene Ektodomäne ermöglicht anscheinend die Bindung und Interaktion der Liganden mit TLR9 und ist Voraussetzung für die weiteren Schritte der Signalkaskade (Ahmad-Nejad et al., 2002; Rutz et al., 2004).

Im Anschluss kommt es zur Konformationsänderung und Homodimerisierung der zytoplasmatischen TIR-Domänen von TLR9 (Kawai und Akira, 2006; Medzhitov et al., 1998; Ozinsky et al., 2000). Die TIR-Domäne rekrutiert das Adapterprotein „myeloid differentiation marker 88“ (MyD88) und assoziiert mit diesem. MyD88 ist das erste signaltransduzierende Molekül im Signalweg und nimmt eine Schlüsselfunktion ein (Medzhitov und Janeway, 2000). So ergab sich bei MyD88-defizienten Mäusen eine schwache immunologische Reaktion auf LPS Applikation und eine hohe Infektanfälligkeit für *Staphylococcus aureus* (Takeuchi et al., 2000) und Listerien (Edelson und Unanue, 2002).

Als Komplex mit der TIR-Domäne aktiviert MyD88 die Serin-Threonin-Proteinkinase IRAK1 (*IL-1-receptor-associated-kinase*) (Wesche et al., 1997). IRAK1 aktiviert wiederum TRAF6 (*TNF-receptor-associated-factor 6*). Dieser Komplex phosphoryliert die „TGF β activated kinase-1“ (TAK-1). Die nun aktivierte TAK-1 phosphoryliert die I κ B-Kinasen, die im unphosphorylierten Zustand den Transkriptionsfaktor NF κ B gebunden und inaktiv im Zytosol halten (Kawai und Akira, 2006). Nach proteolytischer Freisetzung durch die Ubiquitin Konjugations Enzyme kann NF κ B in den Zellkern dislozieren und als Transkriptionsfaktor proinflammatorische Proteine hochregulieren (Chen, 2005).

TLR9 zeichnet sich, wie TLR7 und TLR8, als PRR für bakterielle und virale DNA durch einen zusätzlichen Zweig der Signalkaskade aus. So wird über MyD88-abhängige Aktivierung von TRAF6 und TRAF3 der Interferon Regulation Faktor 7 (*interferon regulatory factor 7, IRF7*) aktiviert. IRF7 ist ein Transkriptionsfaktor für Interferon- α Typ I, das eine antivirale Reaktion vermittelt. Für die Induktion von Interferon- α Typ I scheint das Adapterprotein AP3 entscheidend zu sein (Honda und Taniguchi, 2006; Sasai et al., 2010).

Name	Lokalisation	Ligand	Funktion
TLR 1	Zelloberfläche	Lipoproteine (als Co-Rezeptor von TLR 2)	assoziiert und reguliert TLR 2
TLR 2	Zelloberfläche	bakterielle Bestandteile, wie Lipoproteine, Peptidoglykane	inflammatorische Antwort u.a. über NFκB
TLR 3	Endosomen	dsRNA	antivirale Antwort über IRF abhängige Interferon I Bildung
TLR 4	Zelloberfläche	LPS	breite Immunreaktion
TLR 5	Zelloberfläche	Flagellin	
TLR 6	Zelloberfläche	siehe TLR 2	Co-Rezeptor für TLR 2
TLR 7	Endosomen	virale ssRNA(Influenza Virus)	speziell intrazelluläre Infektionsantwort
TLR 8	Endosomen	virale ssRNA	speziell intrazelluläre Infektionsantwort
TLR9	Endosomen	virale und bakterielle dsDNA ; CpG; Hemozin	Initiierung einer antimikrobiellen Reaktion mit Zytokinausschüttung
TLR 10	unbekannt	unbekannt	unbekannt
TLR 11	unbekannt	Profilin auf Escherichia coli	unbekannt
TLR 12	unbekannt	unbekannt	unbekannt

Tab. 5: Übersicht über Toll-like Rezeptoren, ihre Liganden und Funktion (nach Takeda und Akira, 2005)

1.3.5 CPG-DNA und TLR9

Neben den oben genannten natürlich vorkommenden PAMP, kann man immunstimulierende Effekte auch mit synthetisch hergestellten Cytosin-Phosphatidyl-Guanin-Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN) induzieren (Klinman et al., 1996; Krieg et al., 1995).

Im Gegensatz zu humaner DNA enthält bakterielle DNA deutlich mehr CpG-Motive, bestehend aus unmethylierten Dinukleotiden CpG. Diese werden von zwei 5' Purinresten und zwei 3' Pyridinresten eingefasst. Die Paarung von Cytosin und Guanin wirkt besonders immunstimulatorisch, da sie in eukaryonten Zellen deutlich seltener vorkommt und somit faktisch als fremd erkannt wird (Yamamoto et al., 1992). In prokaryonter DNA befindet sich die 20fache Anzahl von kurzen CpG-Sequenzen im Vergleich zu eukaryonter DNA (Schwartz et al., 1997). Im Säuger genom kommen CpG-Dinukleotide nur ein Viertel so häufig vor, wie man bei zufällig angeordneter Basenabfolge erwarten würde (Bird, 1986). Diese Unterschiede in der DNA erklären, weshalb das Immunsystem von Säugetieren CpG-reiche Motive als fremd bzw. bakteriell erkennt und entsprechend bekämpft.

Das menschliche Abwehrsystem bzw. TLR9 erkennt synthetische CpG-ODN als pathogene Erregerstrukturen (Krieg et al. 1995). Daher können synthetische CpG-ODN mit ihren ausgeprägten immunstimulatorischen Effekten genutzt werden, um modellhaft systemische Entzündungen und einen sepsisähnlichen Zustand zu induzieren. Im Organismus führen CpG-ODN innerhalb von Minuten zu einer Induktion von mRNA und innerhalb von Stunden zu einer kurzfristigen Steigerung von Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Klinman et al., 1996; Krieg et al., 1995; Sparwasser et al., 1998). Dabei können die ODN intraperitoneal, intravenös, *per inhalationem* oder *per os* verabreicht werden.

Da Nukleasen die ODN schnell abbauen, verwendet man modifizierte CpG-ODN (Krieg, 2002; Krieg et al., 1995; Vollmer, 2005) mit einem Rückgrat aus Phosphorthioatbrücken anstelle der natürlich vorkommenden Phosphodiesterbrücken. Mit diesem eingebauten Phosphorothioatrückgrat im Molekül des ODN wird der Abbau durch Nukleasen deutlich verringert und die CpG-ODN bleiben länger und nach Einsatz einer geringeren Dosis immunmodulatorisch wirksam (Marshak-Rothstein et al., 2004; Mutwiri et al., 2004; Sands et al., 1995).

Inzwischen teilt man die unterschiedlichen ODN in Gruppen ein. CpG-ODN der Klasse A (auch unter Klasse D aufgeführt) zeichnen sich durch ihr palindromisches Zentrum aus, das ein oder mehrere CpG Motive enthält und über Phosphodiester verbunden ist. Außerdem besitzen die ODN ein poly-G Motiv, das sich zu einer sog. G-Tetrade zusammenlagern kann (Hartmann et al., 2003). Die Sekretion von Interferon- α aus pDC wird stark, die B-Zell Proliferation jedoch nur schwach durch CpG-ODN der Klasse A induziert.

Die Klasse B der CpG-ODN (auch Klasse K) zeichnen sich durch ihren linearen Aufbau und ihr durchgehendes Phosphorthioatrückgrat aus. Sie induzieren, im Gegensatz zu den CpG-ODN Klasse A, nur schwach die Interferon- α Produktion aus den pDC, aber bewirken eine starke B-Zell Proliferation und damit eine Produktion proinflammatorischer Zytokine (Krieg, 2002).

Die Klasse C der CpG-ODN wurde erst später entwickelt und vereint beide Funktionen der Klassen A und B. CpG-ODN der Klasse C beeinflusst sowohl pDC mit der verbundenen IFN- α Sekretion, als auch die Aktivierung von B-Zellen. Darüber hinaus werden indirekt natürliche Killerzellen (NK) rekrutiert (Vollmer et al., 2004a).

Im Zuge der Erforschung von verschiedenen ODN am TLR9 wurden auch inhibierend wirkende ODN, sog. INH ODN, entwickelt (Dong et al., 2004; Shirota et al., 2005; Zeuner et al., 2002). Mittlerweile sind einige Muster bzw. Basenabfolgen in den ODN bekannt, die eine inhibierende Wirkung bedingen. Die Abfolge der Base Guanin in Form eines Triplets (GGG), vor allem wenn am 5'Ende gelegen, und das Motiv CC(T) führen *in vitro* zur Inhibition einer durch stimulatorische ODN (ST-ODN) induzierten TLR9 Reaktion (Lenert et al., 2006).

Eine weitere Eigenschaft, über die ein INH-ODN für TLR9 verfügen sollte, ist, dass der Abstand zwischen dem CC(T) Motiv und dem nächsten GGG Triplet in 3'-Richtung optimalerweise 3 bis 5 Nukleotide lang ist. Am 3'Ende ist die Länge für die inhibierende Potenz des ODN entscheidend (Lenert, 2010). Des Weiteren gibt es drei wichtige Areale in der ODN Sequenz, die ausschlaggebend für inhibitorische Eigenschaften sind. An diesen drei Stellen, die auch als „kritische Gebiete“ genannt werden, führt ein Basenaustausch zu einer deutlichen Reduktion der B-Zellaktivität (Ashman et al., 2005; Stunz et al., 2002). Diese Positionen der Bindungsstelle für CpG-ODN werden in vielen Bereichen der Medizin intensiv erforscht. So erhofft man sich durch die Anwendung von ODN verschiedene Infektionskrankheiten und Entzündungsreaktionen, wie die Sepsis, in Zukunft besser behandeln zu können (Krieg, 2007).

Ebenso sucht man nach Therapieoptionen bei neoplastischen Erkrankungen (Li et al., 2007), bei allergisch bedingten Krankheiten (Broide, 2009) und bei Autoimmunreaktionen (Barrat und Coffman, 2008) mit Hilfe von immunmodulierenden ODN.

ST-ODN erwiesen sich bereits als Adjuvanz zur Anregung des Immunsystems bei Vakzinen als erfolgreich, so zum Beispiel zur erfolgreichen Hepatitis B Impfung bei Hyporespondern (Davis et al., 2000; Klinman et al., 2004). In der Krebstherapie werden verschiedene ODN bereits in der Phase der klinischen Forschung eingesetzt (Holtick et al., 2011).

Gerade nach der ernüchternden Evaluierung der Studienergebnisse bezüglich rekombinant aktivierten Proteins C, des *bis dato* vermeintlich einzigen in der Sepsis überlebensverbessernden Pharmakons, ist es von großem Interesse, alternative Substanzen zu testen.

1.4 Zytokine in der Sepsis

Zytokine sind kleine Proteine, die normalerweise als Reaktion auf einen Stimulus freigesetzt werden.

Für den Verlauf von Entzündungsreaktion wie SIRS und Sepsis spielen besonders die Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 eine wichtige Rolle. Sie gelten als Mediatoren der natürlichen Immunabwehr. Durch Bindung an spezifische Rezeptoren lösen sie spezielle Reaktionen aus (Dinarello, 1991). Ihre Wirkspektren überschneiden sich häufig, so dass Zytokine synergistisch bzw. redundant agieren können. Einzeln betrachtet weist jedes der Zytokine jedoch pleiotrope Aktivitäten auf. Dies bedeutet, dass es auf unterschiedliche Zelltypen wirkt und verschiedene Zellfunktionen beeinflusst. Die Wirkung der Zytokine kann außerdem autokrin erfolgen (Dinarello, 2000). Gerade zu Beginn einer Abwehrreaktion führen diese klassischen Mediatoren zu Fieber, Vasodilatation, einem kapillären Leck sowie einer Aktivierung der Gerinnung und Synthese von Akutphaseproteinen (Matsuda und Hattori, 2006; Oberholzer et al., 2001).

1.4.1 Tumornekrosefaktor- α , IL-1 β und IL-6

TNF- α und IL-1 β sind potente proinflammatorische Zytokine, die eine zentrale Rolle in der Entwicklung eines septischen Schocks und im ARDS spielen (Armstrong et al., 2000; Matsuda und Hattori, 2006).

Sie interagieren mit allen somatischen Zellen bis auf ruhende Lymphozyten und Erythrozyten und werden vorwiegend in Makrophagen gebildet. TNF- α kann sowohl eine Apoptose, also den kontrolliert eingeleiteten Zelluntergang, als auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B über die Rezeptoren aus der TNF Familie (TNFL) vermitteln. Neutrophile Granulozyten werden durch TNF- α und IL-1 β zur gesteigerten Phagozytose und Produktion bakterizider Substanzen, wie Sauerstoffradikalen, aktiviert. Die Freisetzung dieser reaktiven Substanzen kann zu einem Endotoxinschock führen (Dofferhoff et al., 1992). Eine entscheidende Wirkung haben TNF- α und IL-1 β auf das Gefäßendothel, indem sie die prokoagulatorische Aktivität und die Permeabilität der Gefäßwände erhöhen. Hierdurch entwickeln sich Permeabilitätsstörungen (Patel et al., 2011). Die transendotheliale Migration der Granulozyten zum Infektionslokal wird durch vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 und Selektinen, an Endothelzellen

und Granulozyten zusätzlich erleichtert (Patel et al., 2011). Sowohl *in vivo* tierexperimentell, als auch *in vitro*, führte TNF- α zu sepsisähnlichen Organdysfunktionen und zeigte zusätzlich kardiodepressive Wirkungen (Kumar et al., 1996; Leeper-Woodford et al., 1991). Der Anstieg von NO über die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) führt zu einer Inhibierung der β -adrenergen Stimulation und zum anderen hemmt NO cGMP-abhängig den Einstrom von Calcium in die Zelle. Beide Vorgänge münden in einer verminderten Inotropie am Myokard (Gealekman et al., 2002; Hare und Colucci, 1995; Parrillo, 1993).

Die wesentliche Aufgabe von IL-6 liegt in der Regulation der Synthese von Akutphaseproteinen in der Leber. Außerdem rekrutiert IL-6 den *Tissue factor*, der für die Initiierung der Gerinnungskaskade notwendig ist und somit prokoagulatorisch wirkt (Neumann et al., 1997). Wie IL-1 β und IL-6 wirkt auch TNF- α pyrogen auf den Hypothalamus im ZNS, wodurch es zentralreguliert zur Körpertemperaturerhöhung kommt (Meduri et al., 1995a). Hohe Blutspiegel von IL-6 korrelieren beim septischen Schock, wie bereits oben erwähnt, mit einer schlechteren Prognose der Patienten (Meduri et al., 1995b). IL-6 wirkt allerdings auch antiinflammatorisch, was nochmals die pleiotrope Wirkung der Zytokine unterstreicht (Xing et al., 1998).

1.5 Arbeitshypothese

Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass im *in vitro* Modell einer polymikrobiellen Sepsis durch pharmakologische Blockade von TLR9 mit H154-Thioat, IRS954-Thioat und Chloroquin die proinflammatorische Zytokinproduktion von TNF- α , IL-1 β und IL-6 an isolierten Makrophagen antagonisiert werden kann (Boehm et al., 2013).

Weiterhin ist bekannt, dass die systemische Gabe von CpG-ODN 1668-Thioat eine TLR9-spezifische pulmonale Inflammation bzw. ein „remote injury“ in der Lunge *in vivo* in Mäusen initiiert, die maßgeblich von den NF κ B-induzierten proinflammatorischen Zytokinen getragen wird (eigene bisher unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem murinen *in vivo* Sepsismodell die 1668-Thioat-induzierte und somit TLR9-abhängige pulmonale Inflammationsreaktion mit Hilfe der INH-ODN H154-Thioat und IRS954-Thioat sowie des unspezifischen TLR9 Antagonisten Chloroquin zu beeinflussen.

Hierzu wurde im Einzelnen untersucht,

- 1) ob ein „remote injury“ der Lunge durch systemische Gabe des TLR9 Agonisten 1668-Thioat induzierbar ist und
- 2) ob durch die zusätzliche Gabe von TLR9-spezifischen INH-ODN (H154-Thioat, IRS954-Thioat) und des unspezifischen TLR9 Antagonisten Chloroquin die pulmonale Inflammation modulierbar ist.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren in der vorliegenden Studie handelte es sich um 12-14 Wochen alte männliche C57BL/6N Mäuse (bezogen von Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 25-30 Gramm. Außerdem wurden TLR9-defiziente (TLR9-D) Mäuse gleichen Alters verwendet, die freundlicherweise von Professor Shizuo Akira (*Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan*) zur Verfügung gestellt wurden. Durch homologe Rekombination an embryonalen Stammzellen von C57BL/6 Mäusen wurden diese TLR9-defizienten Mäuse hergestellt (Hemmi et al., 2000) und hatten somit den gleichen genetischen Hintergrund wie die Wildtypen. Anhand der DNA, die man aus den Schwanzvenen der Mäuse gewonnen hat, wurde jeweils die Homozygotie für TLR9 Defizienz überprüft. Der Nachweis der Homozygotie erfolgte mittels spezifischer PCR Primer: So ist der Primer „wild-type“ mit der Sequenz 5'- GAA GGT TCT GGG CTC AAT GGT CAT GTG-3' spezifisch für das unveränderte Gen für TLR9, wohingegen der Primer „neo1500“ mit der Sequenz 5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3' spezifisch für das TLR9 Gen ist.

Die Tiere wurden in transparenten Polykarbonkäfigen, in separaten Tierställen des Hauses für Experimentelle Therapie (HET) des Universitätsklinikums Bonn, untergebracht. Die Tierhaltung erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen hinter Infektionsbarrieren. In den vollklimatisierten Räumen betrug die Luftfeuchtigkeit 50 %, die Temperatur (20-22° Celsius) und die Beleuchtung waren auf einen zwölfstündigen Tag-Nachtrhythmus abgestimmt. Altromin-Tiereinstreu-Granulat wurde zur Käfigausstattung verwendet und sowohl Wasser als auch Futter waren frei verfügbar.

Alle Versuche entsprachen den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes und der Leitlinien für Tierversuche des „National Institutes of Health“ (NIH). Der Tierversuchsantrag wurde durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) genehmigt (Aktenzeichen 8.87-51.04.20.09.392).

2.2 Versuchsgruppeneinteilung

Abhängig vom verwendeten Oligonukleotid und der Dauer bis zur Organprobengewinnung wurden 14 Gruppen gebildet (7 Gruppen für jeweils 2 Messzeitpunkte). Die Fallzahl lag pro Gruppe bei 8 (n=8) und es wurden insgesamt 144 Tiere randomisiert für die Versuche verwendet. Davon waren 128 männliche Wildtypmäuse sowie sechs männliche und zehn weibliche TLR9-defiziente Mäuse.

Initial waren weitere molekularbiologische Messungen der Inflammationsreaktion im pulmonalen Gewebe zu einem späteren Zeitpunkt, nach der Injektion von stimulierenden CpG-ODN, vorgesehen. Orientiert an vergleichbaren Sepsismodellen unserer Arbeitsgruppe sollte die zweite Messung der proinflammatorischen Zytokine 18 h *post stimulationem* erfolgen. Im Rahmen der entsprechenden Versuchsreihen wurde allerdings bereits einige Stunden *post stimulationem* ein verschlechterter Allgemeinzustand der Tiere beobachtet, so dass man bei der veranschlagten Konzentration des stimulierenden CpG-ODN 1668-Thioat den Untersuchungsfokus unseres Versuches auf die Frühphase der Sepsis bzw. auf den Zeitpunkt 6 h *post stimulationem* ausrichtete.

Die Wildtypmäuse wurden mit D-Galaktosamin (D-GalN) intraperitoneal (i.p.) vorbehandelt und nach 30 min mit dem CpG-ODN 1668-Thioat i.p. stimuliert. Daraufhin wurde, je nach Gruppe, PBS, H154-Thioat, IRS954-Thioat oder Chloroquin intravenös in die Schwanzvene der Tiere appliziert. Alle verwendeten ODN waren mit einem Phosphorthioatrückgrat modifiziert (PS-ODN), wodurch die Wirkungsstärke und Wirkungsdauer der ODN im Vergleich zur normalen Phosphodiestern (PD-ODN) erhöht ist. Im Folgenden werden diese ODN ohne den Zusatz PS aufgeführt (siehe Tabelle 6).

Gruppe A	D-GalN + ODN 1668 + PBS
Gruppe B	D-GalN + ODN 1668 + ODN H154
Gruppe C	D-GalN + ODN 1668 + ODN IRS954
Gruppe D	D-GalN + ODN 1668 + Chloroquin
Kontrollgruppe	D-GalN + PBS

Tab. 6: Versuchsgruppeneinteilung

2.3 Stimulation der Mäuse und i.v. Behandlung mit ODN

Im folgenden Abschnitt wird der Ablauf des *in vivo* Stimulationsversuches mit nachfolgender ODN Behandlung erläutert (Abbildung 2):

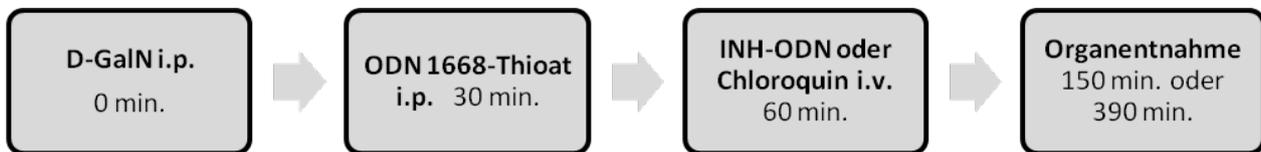


Abb. 2: Versuchsaufbau

Zunächst wurde den Mäusen 25 mg (entsprechend 1 mg/g Körpergewicht) D-GalN (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelöst in *aqua ad injectabilia* in einem Volumen von 250 µl intraperitoneal (i.p.) injiziert.

D-GalN verlängert die Wirkung der nachfolgend injizierten ODN, indem es die Leberpassage („First-Pass Effekt“) und somit auch den Abbau der injizierten ODN verzögert. Hierdurch können die ODN ihre Wirkung länger und effizienter entfalten. Durch diese Sensitivierung der Mäuse kann man durch eine verhältnismäßig geringe Dosis des stimulierend wirkenden ODN 1668-Thioat eine schwere Sepsis mit konsekutiver Multiorgandysfunktionen auslösen. D-GalN allein induziert hierbei keine inflammatorischen Antwort.

Diese Injektion von CpG-ODN 1668-Thioat (TibMolBiol, Berlin, Deutschland) wurde allen Mäusen, außer den „Phosphate-buffered saline“(PBS) -Gruppen (Gruppe 1 und 8), 30 min nach D-GalN i.p. injiziert. Die Gruppen 1 und 8 erhielten stattdessen lediglich PBS und dienten neben den TLR9-defizienten Gruppen 7 und 14 als Kontrollgruppen in der Studienreihe (siehe Tabelle 8). Das synthetische 1668-Thioat ist ein Oligonukleotid mit einer Fragmentlänge von 20 Basenpaaren und folgender Sequenz: 5' – TCCAT**GACGTT**CCTGATGCT – 3' (Krieg et al., 1995). In Fettschrift ist die entscheidende Sequenz für die TLR9 Aktivierung hervorgehoben. Die Sequenz GACGT und allgemein das Desoxynukleotid CG beinhalten die stimulatorische Potenz von 1668-Thioat (Lenert et al., 2009). Es enthält ein stabilisierendes Phosphorthioatrückgrat, das den Abbau durch Nukleasen nochmals verzögert. Diese modifizierten ODN werden wie bereits oben erwähnt in der Literatur als PS-ODN bezeichnet. In der vorliegenden Untersuchungsreihe

wurden alle ODN als Phosphorthioat-modifizierte ODN, PS-ODN, verwendet. Es wurde eine Konzentration von 50 nmol 1668-Thioat ad 400 µl PBS zur Stimulation gewählt. Diese Dosierung liegt im letalen Bereich und daher entspricht das Modell einer letalen schweren Sepsis bzw. einem septischen Schock (Cornelie et al., 2002).

Weitere 30 min später wurde jeweils die inhibierende bzw. modulierende Substanz in eine Schwanzvene der Maus (i.v.) verabreicht. Die verwendeten ODN wurden zuerst als Lyophilisat auf eine Konzentration von 500 nmol/ml in *Aqua ad injectabilia* gelöst und verdünnt. Anschließend wurden die Oligodesoxynukleotide aliquotiert und jeweils mit 200 µl PBS angesetzt und standen in dieser Form zur i.v. Applikation bereit.

Tabelle 7 listet folgende Substanzen aus der Gruppe ODN mit jeweiliger Sequenz auf. Bei allen ODN handelt es sich um mit Phosphorthioat modifizierte PS-ODN.

ODN	Sequenz (5'-3')	Eigenschaften
1668-Thioat	5'-TCCATGACGTTCCCTGATGCT-3'	stimulatorisch
1612-Thioat	5'-GCTAGATGTTAGCGT-3'	neutral
H154-Thioat	5'-CCTCAAGCTTGAGGGG-3'	inhibitorisch
IRS954-Thioat	5'-TGCTCCTGGAGGGTTGT-3'	inhibitorisch

Tab. 7: Liste der Phosphorthioat modifizierten ODN (PS-ODN)

Injektionsprotokoll nach Gruppen					
Tiere	Gruppen		Zeitpunkt (min)		
	2 Std.	6 Std.	0	30	60
Wild- Typ	1	8	D-GalN	PBS	PBS
	2	9	D-GalN	1668-Thioat	PBS
	3	10	D-GalN	1668-Thioat	1612-Thioat
	4	11	D-GalN	1668-Thioat	H154-Thioat
	5	12	D-GalN	1668-Thioat	IRS954-Thioat
	6	13	D-GalN	1668-Thioat	Chloroquin
TLR9-D	7	14	D-GalN	1668-Thioat	PBS
Organentnahmen jeweils zu den Zeitpunkten 150 min und 390 min					

Tab. 8: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

2.4 Organentnahme und Gewinnung der Gewebeproben

Der nächste Schritt erfolgte je nach Versuchsreihe zwei oder sechs Stunden nach Stimulation mit 1668-Thioat. Die Maus wurde in eine Narkosekammer gesetzt, in die kontinuierlich über ein Schlauchsystem Isofluran (Forene 2 Vol %, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und Sauerstoff mit einem Fluss von 2,5 l/min zugeführt wurden. Nach 30-45 Sekunden unter Narkoseeinwirkung wurde die Maus aus der Narkosekammer genommen und gewogen. Anschließend wurde die Maus auf den auf 37° C beheizten Operationsplatz auf den Rücken gelegt und an den oberen und unteren Extremitäten fixiert. Über einen Schlauch am Mund erhielten die spontan atmenden Mäuse weiterhin ein Isofluran/Sauerstoffgemisch zur

Aufrechterhaltung der Narkose. Anhand der verlangsamten Atembewegung des Thorax und eines Schmerzreiztests wurde die Narkosetiefe überprüft. Mit chirurgischer Pinzette und Schere wurde die Thoraxwand am knöchernen Sternalrand beginnend eröffnet. Die beiden Thoraxhälften wurden kranialwärts in Richtung Axilla verschoben, um einen Zugang zum Herzen und den Lungen zu erhalten. Nun wurde mit einer 18G-Kanüle (Braun, Melsungen, Deutschland) das schlagende Herz *in situ* punktiert und mit einer 2 ml Spritze Blut aus der linken Kammer aufgezogen. Das Blut wurde in einem sterilen Eppendorf Cup (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 10 min bei 10.000 Umdrehungen pro Minute und 4° C zentrifugiert und schließlich der Serumüberstand in Flüssigstickstoff (Linde, Köln, Deutschland) zwischengelagert. Als Nächstes wurden das Herz und die Lunge nacheinander entnommen und das jeweilige Organ in eine mit 4° C kalten PBS Lösung (0,58 M Na₂HPO₄, 0,17 M NaH₂PO₄, 0,68 M NaCl, pH 7,3; Merck, Darmstadt, Deutschland) gefüllten Petrischale verbracht. Das verbliebene Blut aus dem jeweiligen Organgewebe wurde in der PBS-Lösung gründlich ausgewaschen. Hiernach wurde die Lunge in drei gleichgroße Teile geschnitten, wobei kein Organteil mehr als 30 mg wiegen durfte. Um die unmittelbar einsetzenden spezifischen sowie unspezifischen Abbauprozesse und folglich ein verändertes Genexpressionsmuster der Organproben zu vermeiden, wurde der erste Teil des Organs in *RNAlater RNA Stabilization Reagent* (RNAlater, Quiagen) überführt. Die zelluläre RNA wird durch die Wirkung der *RNAlater* Substanz auch bei Raumtemperatur stabilisiert. Die zwei anderen Lungenstücke wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren, bevor sie für weitere Untersuchungen bei -80° C konserviert wurden und somit für eventuelle Nachuntersuchungen zur Verfügung standen.

2.5 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus dem gewonnenen Organmaterial wurde mit dem RNeasy Kit der Firma Quiagen (Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers bzw. wie in anderen Arbeiten beschrieben verwendet (Chomczynski und Sacchi, 1987). Alle Materialien wurden, wenn nicht anders angegeben, aus dem Kit verwendet.

Das Grundprinzip der RNeasy Methode besteht in der initialen Inaktivierung von RNasen und DNasen sowie in der anschließenden spezifischen Bindung der Gesamt-RNA an einer

Silicagelmembran in Spezialsäulen. Die gebundene Gesamt-RNA kann dann in mehreren Waschschritten von den zellulären Komponenten befreit werden. Abschließend wird die Gesamt-RNA von der Säule gelöst und gilt damit als isoliert.

Um die Bindungskapazität der Säulenmembran von 100 µg nicht zu überschreiten, betrug das Gewicht der Organproben maximal 30 mg. Das Gewicht wurde über eine Feinwaage überprüft und bei Bedarf mit chirurgischer Schere verringert.

Das Gewebematerial wurde nun in 600 µl Guanidinisothiocyanat (GITC)-haltigen RLT Puffer aufgeschlossen, den man zuvor mit β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) vermischt hatte. Guanidinisothiocyanatlösung ist ein chaotropes Salz, das effektiv Proteine und sogar RNasen denaturiert und inaktiviert. Mit Hilfe des Rotor-Stator-Homogenisators Ultra-Turrax (Polytron PT2100, Kineamtica Ag, Luzern, Schweiz) wurde das Material homogenisiert. Zwischen der Bearbeitung zweier Gewebeproben wurde der Ultra-Turrax zweimal für 15 Sekunden durch das Spülen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) gereinigtem Wasser und abschließender Spülung mit GITC von Gewebsresten und RNasen befreit. DEPC ist ein potenter Inaktivator von RNasen und allen Enzymen, da es kovalent an primäre und sekundäre Amine bindet und somit die Aktivität der Enzyme aufhebt.

Als nächsten Schritt gab man 10 µl Proteinase K zum Lysat hinzu, um die Isolierung der Gesamt-RNA sicher zu stellen, da die störenden Proteine in den Organproben mit Proteinase K verdaut werden. Der Proteinverdauungsschritt fand im Wasserbad (Eppendorf Thermomixer, Hamburg, Deutschland) bei 55° C Inkubationstemperatur über 10 min statt.

Das entstandene Gewebelysat wurde bei 10.000 g für 3 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415R, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurde der Lysatüberstand vorsichtig mit einer Pipette umgefüllt und mit 96-100 %igem Ethanol in einem neuen Reaktionsgefäß vermischt, wodurch bessere Bindungsbedingungen geschaffen wurden. Als Nächstes platzierte man eine RNeasy Mini-Säule (Quiagen) in ein 2 ml *Collection Tube* und trug 700 µl des Gewebelysats auf die Säule auf, die eine RNA spezifisch bindende Silicagelmembran besaß. Das gefüllte *Collection Tube* wurde für 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert. Hierbei adsorbierte die Silicagelmembran die Gesamt-RNA und ließ die übrigen Substanzen durchfließen. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Aufreinigungsschritt wurde dreimal wiederholt.

Um möglichst reine RNA ohne DNA-Rückstände zu erhalten, wurde ein zusätzlicher DNase-Verdauschritt eingeführt. Hierzu wurde die DNase direkt auf die RNA Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur zur Inkubation stehen gelassen. Nach erfolgtem DNA-Verdau wurden die DNase und eventuell noch vorhandene Kontaminationen durch Auswaschen mit RW1 Puffer, RPE Puffer und durch Zentrifugation entfernt bzw. als Durchfluss verworfen. Abschließend wurde die gebrauchsfertige RNA in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und in einem neuen Collection Tube bei -80° C aufbewahrt.

2.6 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der gewonnenen Gesamt-RNA bediente man sich einer spektrophotometrischen Analyse. Das Spektrophotometer *Nano-Drop* (ND 1000, Biotechnologie GmbH) wurde auf eine Wellenlänge von 260 nm (OD260) kalibriert und kann nach dem Prinzip des hängenden Tropfens (2 µl) die enthaltene RNA-Konzentration bestimmen, da bei 260 nm das Absorptionsmaximum der RNA liegt. Die Absorption des gemessenen Lichtes im Spektrophotometer ist abhängig von der gelösten Substanz, ihrer Konzentration und der Dicke der absorbierenden Schicht. Das Gerät rechnet die photometrisch bestimmte RNA Konzentration automatisch aus. Im Bereich von 280 nm absorbieren vor allem Proteine und andere Verbindungen, die den Reinheitsgrad der RNA Probe senken. Daher dient auch das Absorptionsverhältnis OD 260 zu OD 280 als wichtiger Indikator für die RNA-Reinheit der jeweiligen Probe. Dieser Wert sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Vor der Messung der Proben wurde der Sensorknopf mit 2 µl DEPC gereinigtem Wasser benetzt und trocken abgewischt. Es wurde eine Wasserprobe als Eichkurve gemessen und für die nachfolgenden Messungen der Proben benutzt. Zwischen der Messung zweier Proben wurde der Sensorknopf mit jeweils 2 µl DEPC gereinigtem Wasser von eventuellen Restbeständen befreit.

2.7 cDNA-Transkription

Im Hinblick darauf, dass man aus dem entnommenen Lungengewebe Genanalysemuster mit der quantitativen „Real Time Polymerase Chain Reaction“ (RT-qPCR) erhalten möchte, ist es notwendig die isolierte RNA zuerst noch in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Zu dieser Reversen Transkription benötigt man eine RNA-abhängige DNA Polymerase. Diese schreibt, die RNA als Matrize benutzend, einen komplementären DNA-Strang. Der synthetisierte DNA-Strang lagert sich an den vorhandenen RNA-Strang, sodass ein RNA-DNA-Hybrid entsteht. Eine Exoribonuklease (RNase H) verdaut nun den RNA-Strang des Hybrids, so dass ein einsträngiger DNA-Strang übrig bleibt.

Für die Durchführung der Reversen Transkription wurde das *Omniscript-Reverse-Transkriptase-Kit* (Quiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Während dieses Versuches wurden die Arbeitsflächen, Geräte sowie Pipetten mit RNase AWAY gegen Kontamination behandelt. Um eine vorzeitige cDNA Synthese zu vermeiden, wurden alle Versuchsschritte auf Eis pipettiert. Nach Auftauen bei Raumtemperatur auf Eis von RNA-Proben sowie der Primer, der dNTP, des RNase Inhibitors und RNase-freien Wassers wurde nach folgendem Pipettierschema ein Mastermix zur cDNA-Transkription hergestellt (siehe Tabelle 9).

Komponente	Volumen
10x reverse Transkriptase Puffer	5 µl
25x dNTP	2 µl
10x random Primer	10 µl
<i>MultiScribe</i> reverse Transkriptase (50 U/µl)	2,5 µl
RNase freies Wasser 10,5µl	10,5 µl
insgesamt pro Probe	25 µl

Tab. 9: Mastermix für Reverse Transkription pro RNA-Probe

Nach Zentrifugation und Vortexen wurden die mit dem Mastermix vermischten RNA Proben in den „Thermal Cycler“ (T-Gradient Thermoblock, Biometra, Göttingen, Deutschland) gestellt, in dem die Reverse Transkription in vorprogrammierten Schritten vollzogen wurde.

Als erstes fand über 10 min bei 25° C eine Bindung der Primer an die RNA-Matrize statt. Im zweiten Schritt wurde innerhalb einer 120-minütigen Inkubation die RNA in cDNA mittels Reverse Transkriptase umgeschrieben. Dann erfolgte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase durch sehr kurzes Erhitzen auf 85° C. Schließlich wurden die Proben auf 4° C heruntergekühlt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C gelagert. Abhängig von der vorher photometrisch gemessenen RNA-Konzentration wurden die hergestellten cDNA-Proben in RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 500 µl gebracht.

2.8 Real Time Reverse-Transkriptase quantitative PCR (RT-qPCR)

Mit der PCR wurde ein Verfahren entwickelt, das die annähernd exponentielle Vervielfältigung einer definierten DNA-Sequenz ermöglicht. Diese Methode funktioniert mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerase, die Oligodesoxynukleotid-Primer benötigt. An dem 3'-Ende der sog. Oligodesoxynukleotid-Primer beginnt die Synthese des neuen Strangs. Da die Primer am Einzelstrang binden sollen, muss zu Beginn der PCR die doppelsträngig vorliegende DNA in zwei Einzelstränge überführt werden. Dies gelingt durch Erhitzen der DNA, die dadurch denaturiert und sich in zwei Einzelstränge löst. Da die Denaturierung bei 95° C geschieht, verwendet man eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) für die PCR. Die Taq-Polymerase stammt aus dem thermostabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* und bleibt bei Temperaturen von 95° C noch stabil, wobei ihr Temperaturoptimum bei 72° C liegt (Tindall und Kunkel, 1988). Eine Zugabe des Enzyms nach jedem abgelaufenen Zyklus bleibt dadurch erspart. Die Oligodesoxynukleotid-Primer müssen zu einem Sequenzbereich auf dem jeweiligen Strang komplementär sein und damit die DNA-Region umrahmen. So kann eine Synthese an beiden Strängen gegenläufig beginnen und aufeinander zulaufen.

Die PCR ist eine in Zyklen verlaufende Methode. Jeder Zyklus beruht auf den folgenden drei Reaktionsschritten:

- Denaturierung („melting“)
- Primerhybridisierung („primer annealing“)
- Elongation (Verlängerung oder Amplifikation)

Kurzzeitig wird der Reaktionsansatz mit der zu amplifizierenden DNA-Matrize („Template“) zur Trennung der beiden DNA-Stränge auf 95° C erhitzt und denaturiert. Nun können sich die im Überschuss vorhandenen Primer an die Einzelstrang-DNA anlagern. Die Primer hybridisieren mit den komplementären Bereichen der Matrizen-DNA. Die Anlagerungstemperatur liegt etwa 5° C unter der eigentlichen Schmelztemperatur von 55-62° C.

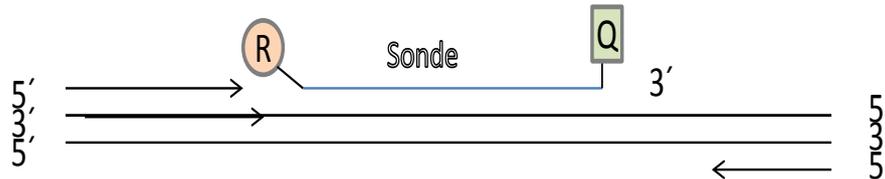
Beim letzten Schritt wird vom 3'-OH-Ende der Primer mit Hilfe der DNA-Polymerase und unter Verbrauch der vier Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP = dATP, dCTP, dGTP, dTTP) der zur Matrize komplementäre Strang synthetisiert. Die Verlängerung an den Primern verläuft in 5'-3'-Richtung und bei einem Temperaturoptimum von 72° C für die Polymerase.

Je länger der zu amplifizierende DNA-Abschnitt ist, desto länger dauert auch der Zyklus. Die neu synthetisierten DNA-Stränge dienen ebenfalls als Matrize. Somit kommt es nach jedem Zyklus zu einer Verdopplung der DNA und insgesamt über den Verlauf zu einer annähernd exponentiellen Zunahme der ursprünglichen Sequenz.

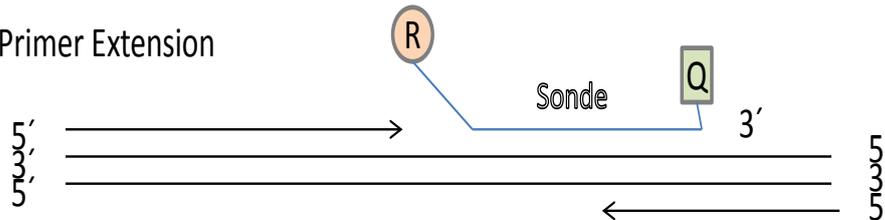
Die modernere Methode der RT-qPCR beruht auf der oben beschriebenen herkömmlichen PCR-Methode. Bei der RT-qPCR besteht die Möglichkeit neben der üblichen Vervielfältigung der Nucleinsäuren auch eine quantitative Aussage über die Probe zu machen (Higuchi et al., 1992). Dies geschieht während des PCR-Laufs, also in Echtzeit („real time“), mit Hilfe von durchgeführten Fluoreszenz-Messungen, deren Emissionen die Syntheseaktivität der PCR widerspiegeln. Die neu synthetisierten PCR-Produkte stehen im proportionalen Verhältnis zur Zunahme der Fluoreszenz. Neben den auch in der herkömmlichen PCR verwendeten genspezifischen Primern bedient man sich bei der RT-qPCR zusätzlich sogenannter TaqMan-Sonden (Lee et al., 1993). Die Sonden sind zu einem Abschnitt der zu analysierenden cDNA komplementär und besitzen an ihrem 5' Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff, wie z.B. FAM oder TAMRA und an ihrem 3'-Ende einen *Quencher* („Löcher“) Farbstoff. Solange die TaqMan-Sonde unverändert bleibt, wird die Emission des Reporter-Fluoreszenzfarbstoffs

unterdrückt, da die Energie strahlungsfrei zwischen den sehr dicht nebeneinander platzierten *Reporter* und *Quencher* überspringen kann. Das Prinzip nennt sich „Fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) und besagt, dass der Donor-Farbstoff, in diesem Fall der Reporter-Farbstoff der TaqMan-Sonde, seine Energie direkt auf den Akzeptor-Farbstoff übertragen kann, solange diese beiden sich in ausreichender Nähe zueinander befinden. Hierbei kommt es zu keiner Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes und keinem detektierbaren Signal. Beim PCR-Durchlauf wird durch die zusätzliche 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase die TaqMan-Sonde hydrolisiert, wodurch der Reporter und der Quencher-Fluoreszenzfarbstoff sich voneinander entfernen und lösen. An diesem Punkt wird die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr vom Quencher gelöscht bzw. auf diesen übertragen und freigesetzt (siehe Abbildung 3). Mit jedem PCR-Zyklus und der Vervielfältigung der DNA-Sequenz steigt die abgegebene Fluoreszenz der TaqMan-Sonde, die man mit Hilfe des *Abi Prism 7900 Sequence Detectors* (Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland) während der RT-qPCR misst.

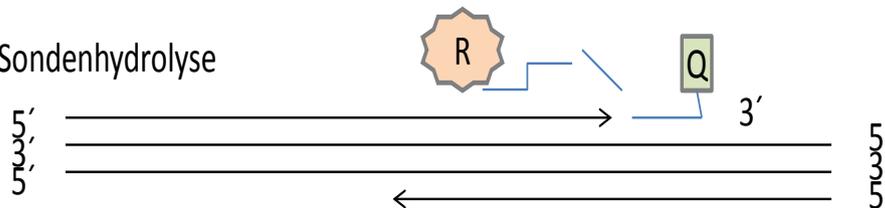
1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer



2. Primer Extension



3. Sondenhydrolyse



4. Synthese des PCR-Produktes und Trennung der Farbstoffe

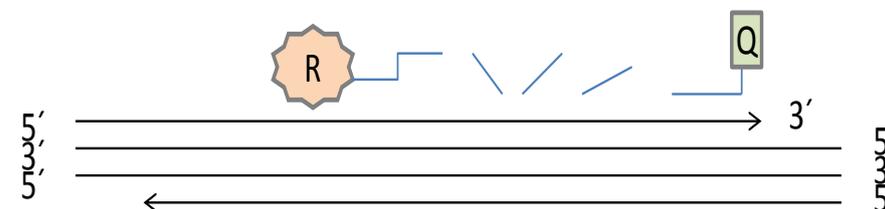


Abb. 3: Prinzip der TaqMan-Sonde bei der RT-qPCR (nach Schütt und Bröker, 2011)

Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge dient der Software-gesteuert berechnete Fluoreszenz-Schwellenwerte, auch „threshold Cycle“ oder C_T -Wert genannt. Der C_T -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz deutlich übersteigt. In den PCR-Zyklen vor dem C_T -Wert wird nämlich nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen *Template*-Konzentration im Reaktionsgefäß während der ersten Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist.

Die Quantifizierung des C_T -Wertes erfolgt am Anfang der exponentiellen Phase. In dieser Phase der PCR gibt es keine limitierenden Faktoren wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibitoren der Reaktion durch Generation störender Produkte.

Die DNA-Menge wird nicht aus den absoluten Startmengen oder Konzentrationen bestimmt, sondern bezieht sich auf ein parallel im Lauf mitgeführten Standard mit bekannter Genexpression. Als ein solcher Standard gilt z.B. Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), den man als *Housekeeping*-Gen bezeichnet. GAPDH wird in jeder Zelle exprimiert und nicht bedeutend transkriptionell reguliert, so dass man ein konstantes Expressionsniveau erwarten kann (Barber et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden von jeder Probe die DNA-Konzentration und die GAPDH Expression bestimmt.

Das Verhältnis der Konzentrationen der Zielnukleinsäuren (DNA), in diesem Fall der Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL6 zum *Housekeeping*-Gen, ergibt die relative Quantifizierung der Zytokinexpression.

Unter Verwendung des *ABsolute™ QPCR SYBR® Green Rox Mix* (ABgene) wurden die PCR zur Bestimmung der Zytokinexpression durchgeführt.

2x TaqMan Universal Master Mix	5,61 μ l
<i>Assays-on-Demand</i>	0,56 μ l
Nuklease-freies Wasser	2,82 μ l
<i>cDNA-Template</i> (wurde in einem zweiten Schritt hinzugegeben)	2,22 μ l

Tab. 10: Mastermix für die RT-qPCR pro Probe

Zu den 9 μ l Mastermix fügte man 1 μ l cDNA-Probe hinzu, um ein Endvolumen von 10 μ l als Reaktionsansatz zu erhalten. Als zusätzliche Negativkontrolle wurden 9 μ l H₂O mit 1 μ l der cDNA Probe vermischt (siehe Tabelle 10). Diese mitgelaufenen Proben dienen als Kontaminationskontrollen. Alle Proben, Standards und auch die Negativkontrollen wurden in 3-fach Bestimmung auf die 384-*Well*-Platte (Thermo Fast®, ABgene) pipettiert.

Nach dem Auftragen der Proben wurde die Platte mit Hilfe einer speziellen Folie versiegelt, um das Abdampfen der Flüssigkeiten und Kontaminationen zu vermeiden. Anschließend wurde die

Platte in einer Universalzentrifuge bei 2500 Upm zentrifugiert und für die PCR schließlich in das TaqMan-Gerät (7900HT Sequence Detection System, Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) gestellt. In Tabelle 11 sind die PCR Prozessschritte aufgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit/Zyklen
Aktivierung	50°C	2 min
	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	15 s
Annealing/ Extension	60°C	1 min

Tab. 11: PCR Prozessschritte

Nach Ablauf der PCR erfolgte die Auswertung über das Software Programm *Sequencing Detection System* (SDS) 2.2 des TaqMan-Geräts.

2.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Messung wurden mit dem Programm *GraphPad Prism 5.0.3* (GraphPad Software®, San Diego, USA) statistisch ausgewertet und graphisch als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels einer Varianzanalyse (*One-Way-ANOVA*) und anschließender *Dunnett-post-hoc*-Analyse. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet und in der graphischen Darstellung entsprechend über der jeweiligen Säule markiert.

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Beobachtung

Wildtyp (WT) Mäusen und TLR9-defizienten (TLR9-D) Mäusen wurde zu Beginn D-Galactosamin (D-GalN) 25 mg (1 mg/g KG) intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Nach 30 min erfolgte die Stimulation der Mäuse durch i.p. Applikation von 50 nmol CpG-ODN 1668-Thioat (TibMolBiol, Berlin, Deutschland). Weitere 30 min später wurde den Mäusen ebenfalls 50 nmol der Testsubstanzen bzw. 0,25 mg Chloroquin i.v. gespritzt. Bei allen verwendeten ODN handelt es sich um Phosphorthioat modifizierte PS-ODN.

Während des Versuchsablaufs und im Zeitraum bis zur Organentnahme, die 2 h oder 6 h nach Injektion der stimulierenden 1668-Thioats erfolgte, wurden alle Mäuse auf klinische Auffälligkeiten hin beobachtet. Mit Ausnahme der Kontrollgruppen (PBS, D-GalN und TLR9-D) entwickelten alle stimulierten Mäuse Zeichen einer Entzündungsreaktion. Die TLR9-defizienten Mäuse blieben sowohl 2 h, als auch 6 h während der Untersuchungsreihe klinisch unauffällig. Ebenso zeigten die Mäuse aus der PBS Gruppe zu keinem Zeitpunkt Anzeichen einer ablaufenden Entzündungsreaktion.

Die restlichen Versuchsgruppen hingegen entwickelten verschiedene klinische Symptome, die von einer inflammatorischen Reaktion zeugten. Diese manifestierten sich bereits 1 h nach der Injektion von 1668-Thioat und wurden im zeitlichen Verlauf graduell deutlicher. Zunächst machte sich nach 2 h ein struppiges Fell bei den Mäusen bemerkbar. Die Augen wurden trüb und begannen zu tränen, zusätzlich trat Ausfluss aus der Nase ein. 3 bis 4 h nach der Stimulation wurde eine Erschöpfung der Tiere und eine reduzierte Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme erkennbar.

In der Gruppe der Mäuse, die mit H154-Thioat behandelt worden waren, kam es erst nach 2 bis 3 h zu klinischen Zeichen einer systemischen Entzündung, die langsamer und milder verlief als in den anderen Gruppen (1668-Thioat, IRS954-Thioat, Chloroquin).

3.2 Pulmonale TNF- α -Expression

3.2.1 Pulmonale TNF- α -Expression 2 h nach Stimulation

Am Ende des kaskadenartigen TLR9 Signalweges kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B. NF κ B führt zur Hochregulation proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-12. Aus dem Lungengewebe von Wildtyp und TLR9-defizienten Mäusen wurde die mRNA-Expression der Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 mittels RT-qPCR bestimmt und Mittelwerte \pm SEM ermittelt. Anschließend wurden Varianzanalysen mittels *one-way-ANOVA* und zusätzlicher *Dunnett-post-hoc*-Analyse durchgeführt. In Abbildung 4 ist die mRNA-Expression von TNF- α für alle angelegten Gruppen aus der Zweistundenreihe dargestellt. Wie an den Säulendiagrammen zu erkennen ist, lag die mRNA-Expression für das Zytokin TNF- α in allen Gruppen über der TNF- α -Expression der Kontrollgruppen PBS und TLR9-D (Negativkontrolle). Der Höchstwert des relativen Quotienten (RQ Wert) der TNF- α -Expression wurde 2 h nach Stimulation in der 1668-Thioat Gruppe erreicht und lag bei $87,37 \pm 8,53$.

Die Behandlung mit H154-Thioat senkte die mRNA-Expression für TNF- α im Vergleich zur alleinigen Stimulation in der Gruppe 1668-Thioat zum Zeitpunkt 2 h nach Stimulation signifikant ($37,10 \pm 3,94$ vs. $87,37 \pm 8,53$; $p < 0,01$).

In den Gruppen, die 1612-Thioat ($75,79 \pm 4,33$ vs. $87,37 \pm 8,53$), IRS954-Thioat ($82,36 \pm 10,54$ vs. $87,37 \pm 8,53$) oder Chloroquin ($68,83 \pm 8,76$ vs. $87,37 \pm 8,53$) appliziert bekamen, ergab sich zum Zeitpunkt 2 h *post stimulationem* keine signifikante Reduktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α im Vergleich zu der rein stimulierten Gruppe 1668-Thioat.

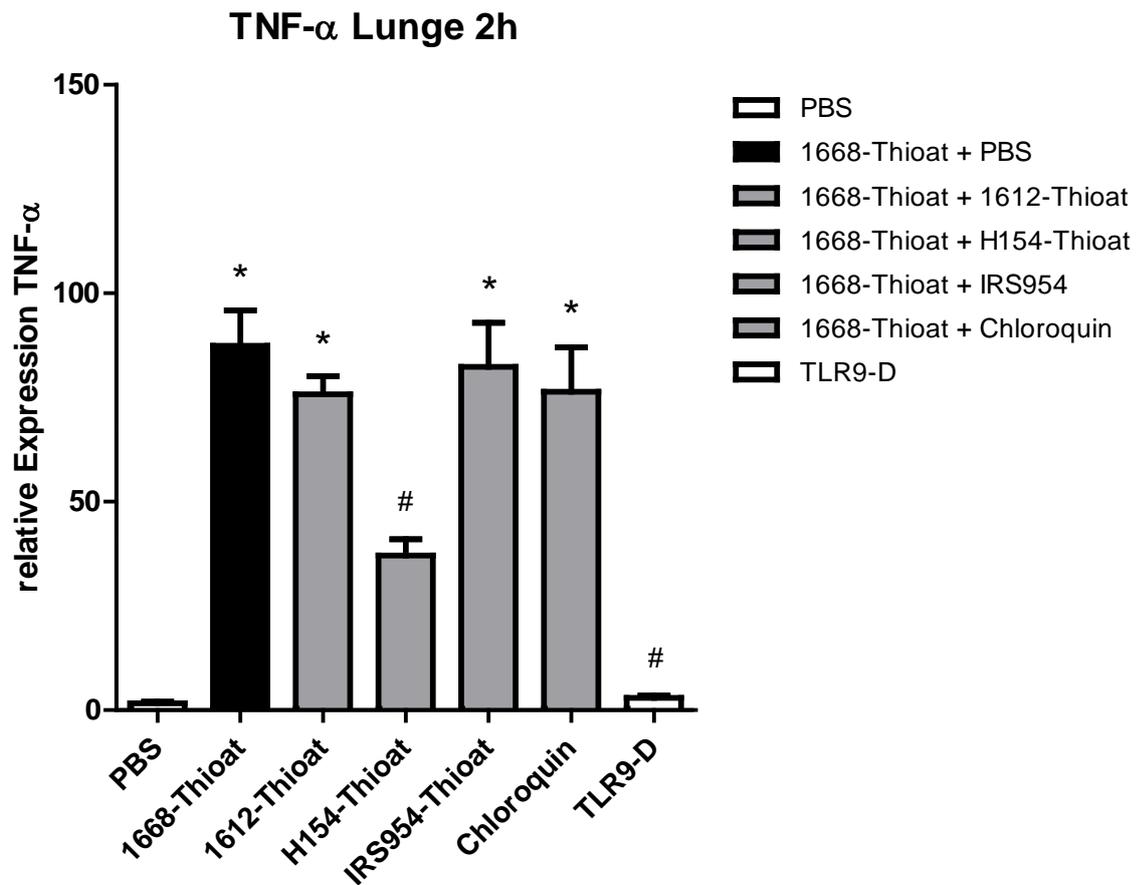


Abbildung 4: Relative mRNA-Expression von TNF- α im Lungengewebe der behandelten Mäuse 2 h nach Stimulation mit 1668-Thioat und anschließender Antagonisierungsstrategie. Auf der X-Achse befinden sich die jeweiligen Kontroll- und Testgruppen aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die relative Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α an. Die Anzahl der Versuchstiere liegt bei n=8/Gruppe. Statistisch signifikante Werte sind wie folgt markiert: *: p < 0,05 vs. PBS Kontrolle; #: p < 0,05 vs. 1668-Thioat (n=8/Gruppe).

3.2.2 Pulmonale TNF- α -Expression 6 h nach Stimulation

Die mRNA Expression für TNF- α 6 h nach Stimulation war in der 1668-Thioat Gruppe am höchsten (siehe Abbildung 5). Dies bedeutet, dass die alleinige Stimulation mit CpG-ODN 1668-Thioat für die Höchste einen RQ-Wert von $5,36 \pm 2,72$ betrug.

Die Behandlung mit H154-Thioat führte zu einer signifikanten Reduktion der TNF- α -Expression in der Lunge im Vergleich zu der 1668-Thioat Stimulation ($0,79 \pm 0,26$ vs. $5,36 \pm 2,72$; $p < 0,01$).

Nach einer Behandlung mit IRS954-Thioat sank im Vergleich zu der Gruppe 1668-Thioat ebenfalls signifikant die pulmonale TNF- α -Expression ($0,95 \pm 0,18$ vs. $5,36 \pm 2,72$; $p < 0,01$).

Auch die Gabe von 1612-Thioat reduzierte signifikant im Vergleich zu 1668-Thioat die pulmonale Expression von TNF- α 6 h nach Stimulation ($1,33 \pm 0,38$ vs. $5,36 \pm 2,72$; $p < 0,05$).

Die i.v. Gabe von Chloroquin reduzierte die mRNA-Expression von TNF- α 6 h nach Stimulation im Vergleich zu der rein stimulierten Gruppe 1668-Thioat, dieser Effekt war jedoch nicht statistisch signifikant ($1,93 \pm 0,47$ vs. $5,36 \pm 2,72$).

Die Kontrollgruppe TLR9-D wies eine signifikant verringerte TNF- α mRNA-Expression im Vergleich zu den allein mit 1668-Thioat stimulierten Tieren auf ($0,13 \pm 0,05$ vs. $5,36 \pm 2,72$; $p < 0,01$).

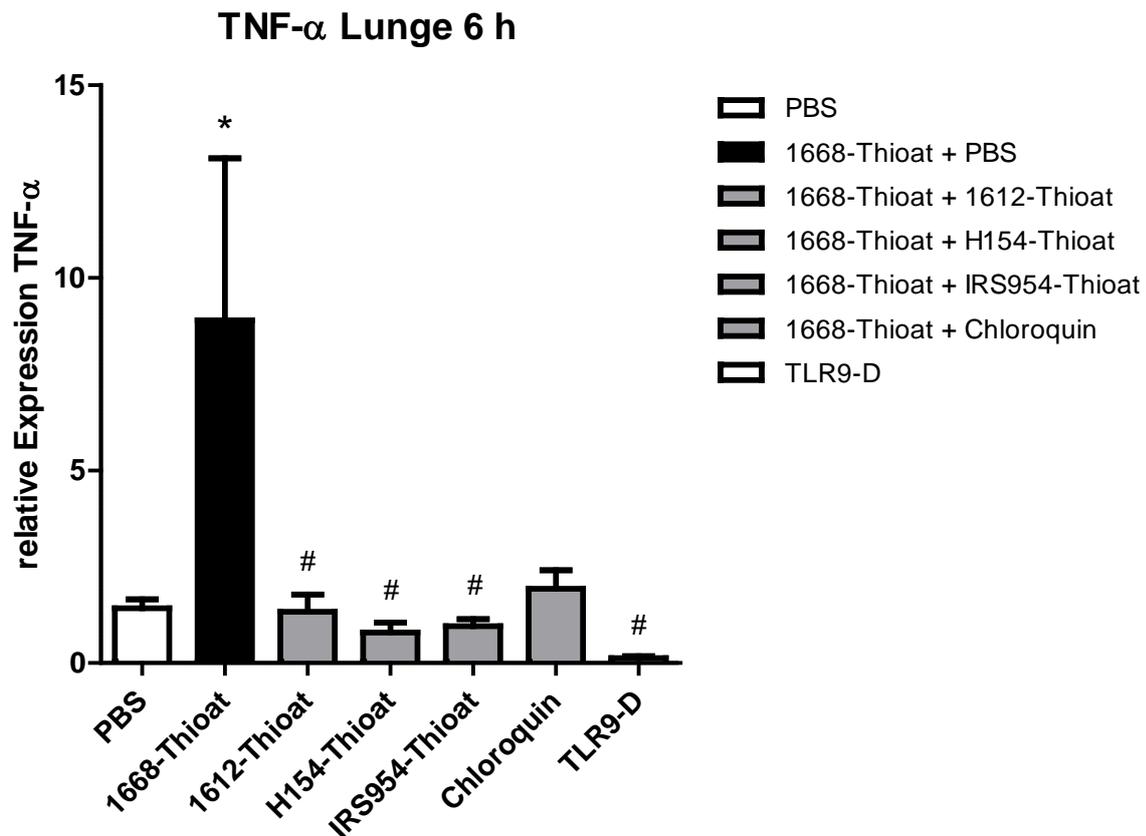


Abb. 5: Relative mRNA-Expression von TNF- α im Lungengewebe der behandelten Mäuse 6 h nach Stimulation mit 1668-Thioat und anschließender Antagonisierungsstrategie. Auf der X-Achse befinden sich die jeweiligen Kontroll- und Testgruppen aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die relative Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α an. Die Anzahl der Versuchstiere liegt bei n=8/Gruppe. Statistisch signifikante Werte sind wie folgt markiert: *: p < 0,05 vs. PBS Kontrolle; #: p < 0,05 vs. 1668-Thioat (n=8/Gruppe).

3.3 Pulmonale IL-1 β -Expression

3.3.1 Pulmonale IL-1 β -Expression 2 h nach Stimulation

Die vorliegenden Daten zu IL-1 β decken sich tendenziell mit den oben genannten Werten zu TNF- α . Auch IL-1 β gilt als verantwortliches Zytokin für eine inflammatorische Reaktion.

In den Kontrollgruppen PBS und TLR9-D lagen die Expressionswerte für IL-1 β am niedrigsten (PBS $2,16 \pm 0,48$; TLR9-D $0,83 \pm 0,12$).

Die Expression von IL-1 β sank mit H154-Thioat Behandlung, allerdings nicht signifikant im Vergleich zur alleinigen Stimulation in der Gruppe 1668-Thioat ($6,86 \pm 1,47$ vs. $9,37 \pm 0,88$).

Die Werte aus den Gruppen ODN 1612 ($13,20 \pm 2,99$), IRS954-Thioat ($12,48 \pm 2,47$) und Chloroquin ($9,77 \pm 1,29$) lagen signifikant über den der Kontrollgruppe PBS ($p < 0,001$). Die Ergebnisse werden in der Abbildung 6 dargestellt.

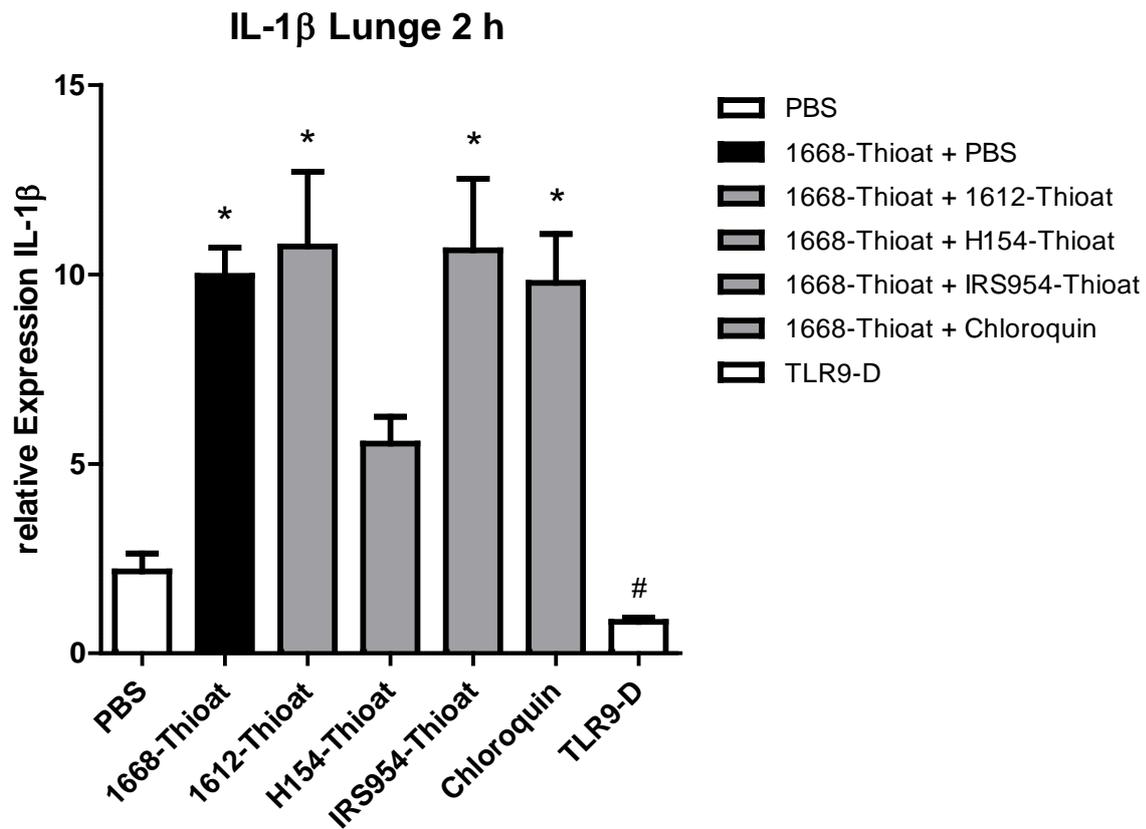


Abb. 6: Relative mRNA-Expression von IL-1 β im Lungengewebe der behandelten Mäuse 2 h nach Stimulation mit 1668-Thioat und anschließender Antagonisierungsstrategie. Auf der X-Achse befinden sich die jeweiligen Kontroll- und Testgruppen aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die relative Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β an. Die Anzahl der Versuchstiere liegt bei n=8/Gruppe. Statistisch signifikante Werte sind wie folgt markiert: *: p < 0,05 vs. PBS Kontrolle; #: p < 0,05 vs. 1668-Thioat (n=8/Gruppe).

3.3.2 Pulmonale IL-1 β -Expression 6 h nach Stimulation

Zum Zeitpunkt 6 h nach Stimulation lagen die Zytokinwerte von IL-1 β auf mRNA Ebene aus den Gruppen H154-Thioat ($0,56 \pm 0,18$), IRS954-Thioat ($1,00 \pm 0,37$) und Chloroquin ($2,03 \pm 1,48$) signifikant ($p < 0,01$) niedriger als die der rein stimulierten Gruppe 1668-Thioat ($8,39 \pm 3,75$) (siehe Abbildung 7).

Die i.v. Gabe des 1612-Thioats verringerte die IL-1 β Expression in der Lunge im Vergleich zu der rein stimulierten Gruppe 1668-Thioat ($1,54 \pm 0,28$ vs. $8,39 \pm 3,76$; $p < 0,01$).

Die Kontrollgruppe TLR9-D wies die geringste IL-1 β Expression auf ($0,035 \pm 0,009$). Der RQ-Wert der Gruppe PBS war mit $3,52 \pm 1,53$ deutlich reduziert gegenüber 1668-Thioat, allerdings nicht signifikant.

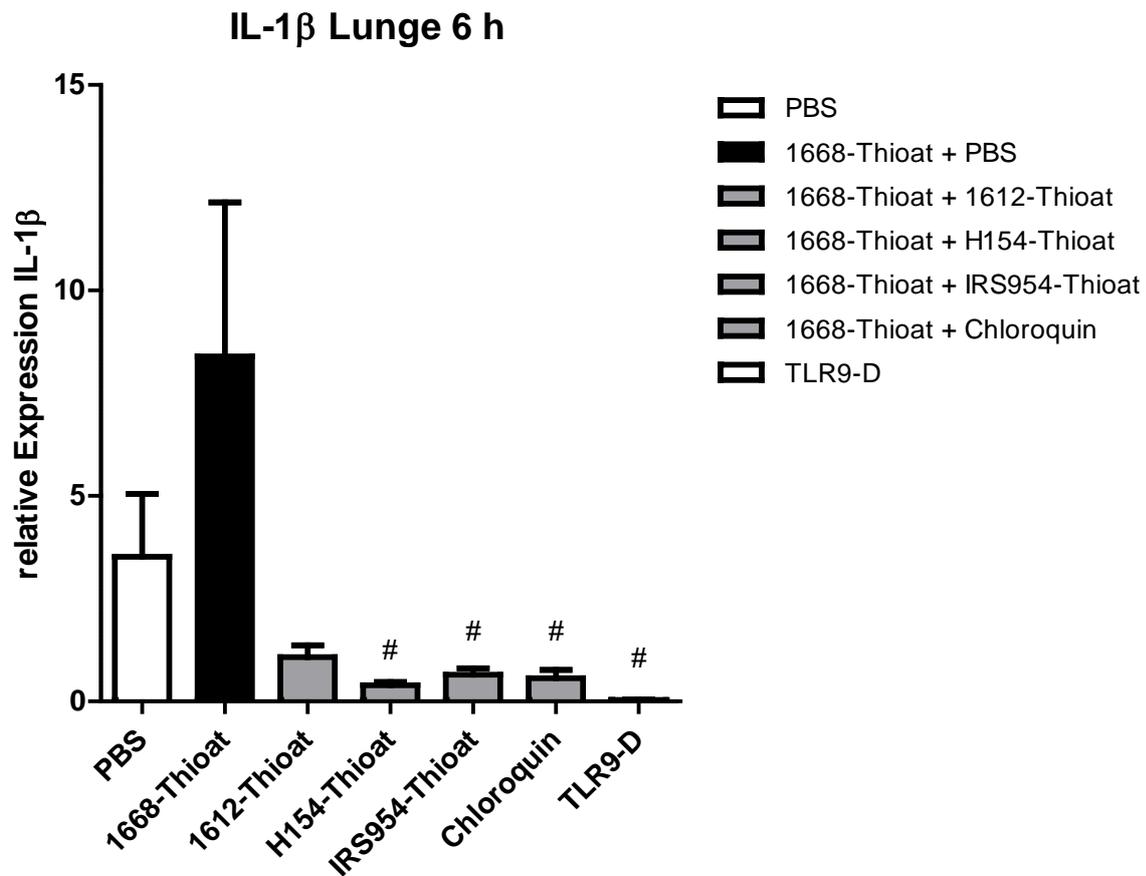


Abb. 7: Relative mRNA-Expression von IL-1 β im Lungengewebe der behandelten Mäuse 6 h nach Stimulation mit 1668-Thioat und anschließender Antagonisierungsstrategie. Auf der X-Achse befinden sich die jeweiligen Kontroll- und Testgruppen aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die relative Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β an. Die Anzahl der Versuchstiere liegt bei n=8/Gruppe. Statistisch signifikante Werte sind wie folgt markiert: *: p < 0,05 vs. PBS Kontrolle; #: p < 0,05 vs. 1668-Thioat (n=8/Gruppe).

3.4 Pulmonale IL-6-Expression

3.4.1 Pulmonale IL-6-Expression 2 h nach Stimulation

In Abbildung 8 ist die mRNA-Expression von IL-6 für alle angelegten Gruppen aus der Zweistundenreihe dargestellt. Den größten inhibitorischen Effekt auf die Expression von IL-6 mRNA 2 h nach Stimulation im Vergleich zu der Gruppe 1668-Thioat war nach der Behandlung mit H154-Thioat nachweisbar ($33,37 \pm 7,21$ vs. $181,74 \pm 21,38$; $p < 0,001$). Das in der Literatur als inhibierend beschriebene IRS954-Thioat zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion der IL-6 Expression 2 h nach Stimulation im Vergleich zu der rein stimulierten Gruppe 1668-Thioat ($56,92 \pm 6,74$ vs. $181,74 \pm 21,38$; $p < 0,001$). Die Gruppe, die Chloroquin i.v. verabreicht bekam, wies niedrigere Expressionswerte von IL-6 auf, allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ($108,71 \pm 13,71$ vs. $181,74 \pm 21,38$).

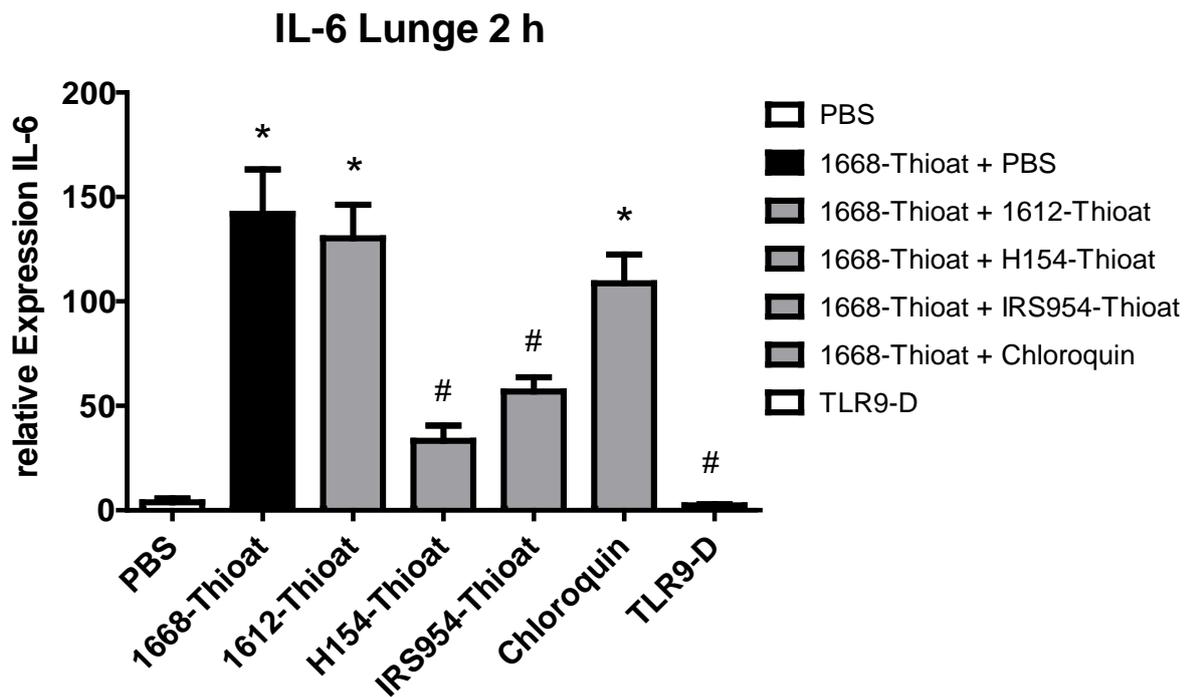


Abb. 8: Relative mRNA-Expression von IL-6 im Lungengewebe der behandelten Mäuse 2 h nach Stimulation mit 1668-Thioat und anschließender Antagonisierungsstrategie. Auf der X-Achse befinden sich die jeweiligen Kontroll- und Testgruppen aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die relative Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 an. Die Anzahl der Versuchstiere liegt bei $n=8$ /Gruppe. Statistisch signifikante Werte sind wie folgt markiert: *: $p < 0,05$ vs. PBS Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. 1668-Thioat ($n=8$ /Gruppe).

3.4.2 Pulmonale IL-6-Expression 6 h nach Stimulation

In Abbildung 9 ist die mRNA-Expression von IL-6 für alle angelegten Gruppen aus der Sechsstundenreihe dargestellt. Die alleinige Stimulation mit 1668-Thioat führte zur höchsten Expression von IL-6 6 h nach Stimulation (RQ-Wert $92,87 \pm 17,16$). Die potentiellen Inhibitoren der TLR9 abhängigen Inflammationsreaktion H154-Thioat, IRS954-Thioat und Chloroquin zeigten im Vergleich zu der stimulierten Gruppe signifikant reduzierte IL-6 Expressionswerte (IRS954-Thioat $26,90 \pm 9,26$ vs. $92,87 \pm 17,16$; $p < 0,001$; Chloroquin $23,17 \pm 2,59$ vs. $92,87 \pm 17,16$; $p < 0,001$ und für H154-Thioat $33,37 \pm 6,95$ vs. $92,87 \pm 17,16$; $p < 0,01$).

TLR9-defiziente Mäuse wiesen, wie in allen anderen Gruppen, die geringste Expression auf mRNA-Ebene auf ($3,26 \pm 1,09$), genau wie die PBS-Kontrollgruppe ($5,70 \pm 1,89$). So war die IL-6 mRNA-Expression 6 h nach Stimulation in den Gruppen 1668-Thioat sowie 1612-Thioat im Vergleich zur PBS-Kontrolle signifikant erhöht (1612-Thioat $59,39 \pm 19,58$ vs. PBS $5,70 \pm 1,89$; $p < 0,01$; 1668-Thioat $92,87 \pm 17,16$ vs. PBS $5,70 \pm 1,89$; $p < 0,001$).

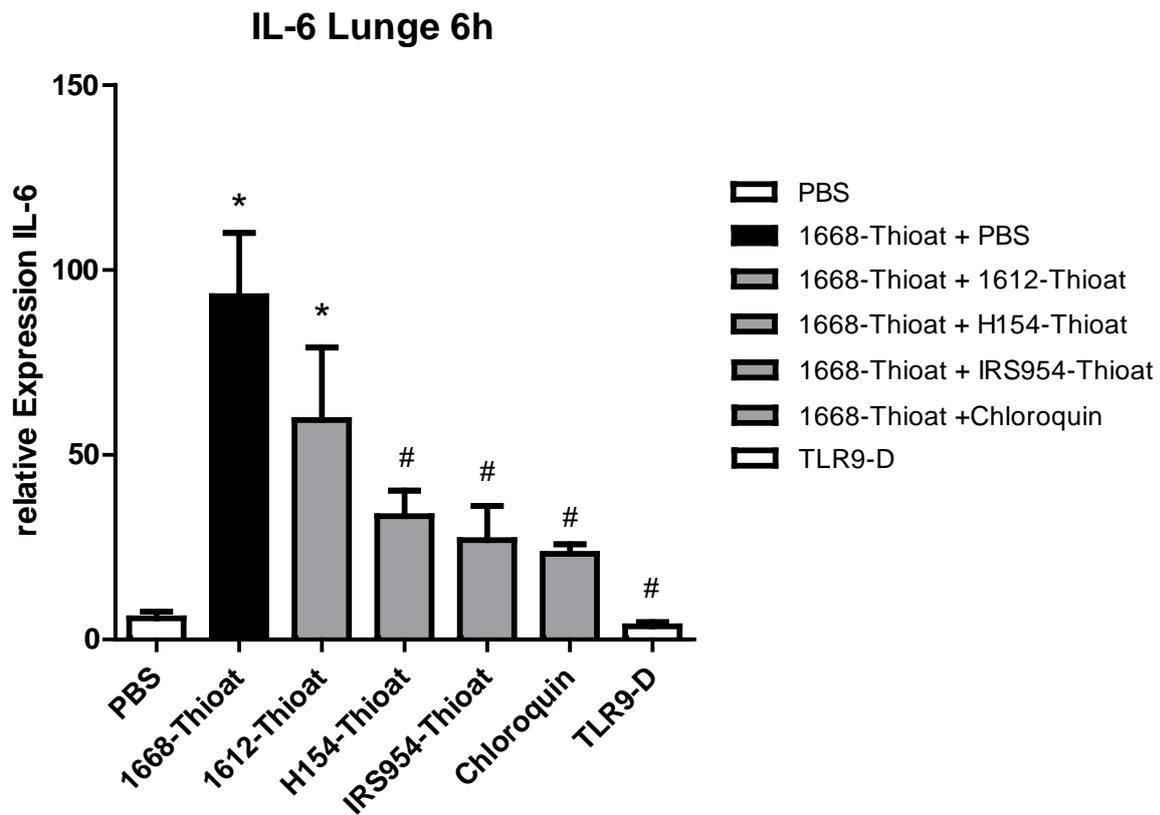
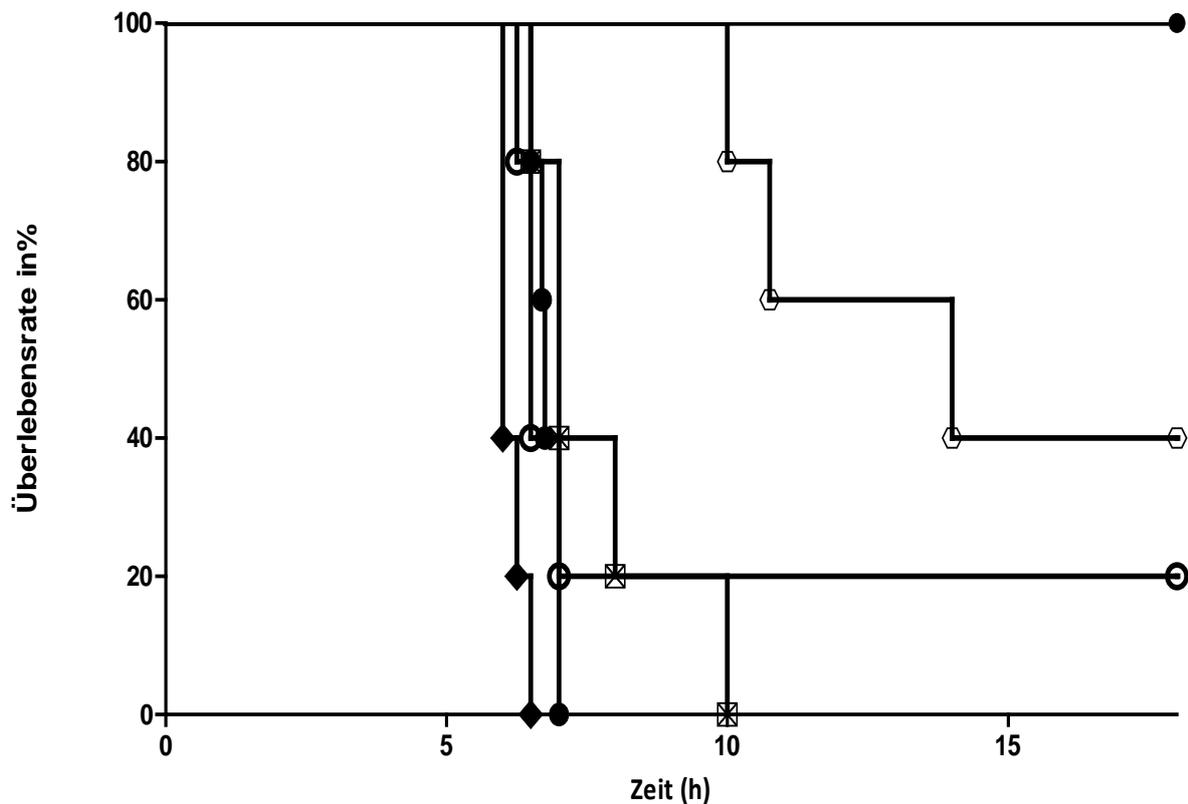


Abb. 9: Relative mRNA-Expression von IL-6 im Lungengewebe der behandelten Mäuse 6 h nach Stimulation mit 1668-Thioat und anschließender Antagonisierungsstrategie. Auf der X-Achse befinden sich die jeweiligen Kontroll- und Testgruppen aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die relative Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 an. Die Anzahl der Versuchstiere liegt bei $n=8$ /Gruppe. Statistisch signifikante Werte sind wie folgt markiert: *: $p < 0,05$ vs. PBS Kontrolle; #: $p < 0,05$ vs. 1668-Thioat ($n=8$ /Gruppe).

3.5 Überleben

Initial wurde in unserem Versuch eine weitere molekularbiologische Untersuchung der proinflammatorischen Zytokine im Lungengewebe zu einem späteren Zeitpunkt der Sepsisreaktion vorgesehen. Dies sollte angelehnt an ähnliche Sepsismodelle unserer Arbeitsgruppe zum Zeitpunkt 18 h *post stimulationem* erfolgen. Im Verlauf der Versuche und der Beobachtung der behandelten Mäuse wurde ein verschlechterter Allgemeinzustand der Tiere bereits einige Stunden nach i.p. Injektion des stimulierenden CpG-ODN 1668-Thioats beobachtet. Nebenbefundlich ergab sich, dass in den 6 Gruppen (n=5) das Überleben und der eventuelle Todeszeitpunkt, je nach verabreichten TLR9-Modulator, verändert werden konnte. In der Kontrollgruppe, die lediglich PBS gespritzt bekam, traten weder klinische Symptome einer Entzündung auf, noch kam es nach PBS Gabe zu Todesfällen. Bei den Mäusen, die 1668-Thioat verabreicht bekamen, kam es zu einer schweren Entzündungsreaktion. In der Gruppe, die H154-Thioat i.v. zusätzlich injiziert bekam, überlebten die Tiere länger als in den restlichen Interventionsgruppen. Die Mäuse, die mit IRS954-Thioat i.v. oder auch mit Chloroquin i.v. behandelt wurden, überlebten ebenfalls länger als die 1668-Thioat + PBS Gruppe oder die 1668-Thioat + 1612-Thioat Gruppe. Am kürzesten überlebte die 1668-Thioat + PBS Gruppe, d.h. die Tiere, die eine alleinige Stimulation mit 1668-Thioat erhielten (siehe Abbildung 10).



- PBS
- ◆ ODN 1668
- ODN 1668 + ODN 1612
- ⊖ ODN 1668 + ODN H154
- ⊠ ODN 1668 + ODN IRS954
- ⊖ ODN 1668 + Chloroquin

Abb. 10: Letalität der mit 1668-Thioat stimulierten Mäuse nach unterschiedlichen Inhibitionsstrategien mit Phosphorthioat modifizierten PS-ODN oder Chloroquin. Vor allem die Intervention mit H154-Thioat verbesserte das Überleben der Tiere (n=5/Gruppe).

Zusammenfassend konnten wir nebenbefundlich feststellen, dass aus der Gruppe mit H154-Thioat behandelten Mäusen 40 % der Tiere überlebten. Die klinischen Symptome traten bei den Gruppen, die mit H154-Thioat, IRS954-Thioat und Chloroquin behandelt worden waren, verspätet und milder auf als in der Gruppe an Mäusen, die allein 1668-Thioat und PBS appliziert bekamen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die TLR9-abhängige Antagonisierung der pulmonalen Inflammation durch INH-ODN und Chloroquin in einem murinen CpG-induzierten Sepsismodell untersucht.

Dass TLR9 eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Sepsis spielt, konnte in unterschiedlichen Versuchen bereits gezeigt werden und begründet die intensive Forschung an TLR9 (Beutler und Poltorak, 2001; Knuefermann et al., 2007; Weighardt und Holzmann, 2007). Weiterhin konnten in verschiedenen Arbeiten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* TLR9 im Lungengewebe detektiert werden. Lungenepithelzellen (Droemann et al., 2005; Platz et al., 2004), alveoläre Makrophagen (Juarez et al. 2010; Suzuki et al., 2005) und Bronchialepithelzellen (Li et al., 2004; Mayer et al., 2007; Sha et al., 2004) exprimieren TLR9. Es konnte *in vivo* an C57BL/6 Mäusen gezeigt werden, dass es sowohl durch intratracheale Applikation („local lung injury“), als auch durch systemische, intraperitoneale Gabe („remote lung injury“) von 1668-Thioat zu einer TLR9-abhängigen pulmonalen Inflammation kommt. Die CpG-ODN-induzierte pulmonale Inflammation kann demnach, analog zu der Ätiologie des ALI und ARDS, sowohl durch *direkte*, lokale, als auch *indirekte* systemische Reize hervorgerufen werden (Hoque et al., 2011; Knuefermann et al., 2007; Schwartz et al., 1997; Tasaka et al., 2009). Unabhängig von der CpG Stimulation besteht eine konstante konstitutive Expression von TLR9 im Lungengewebe (Ehrentraut et al., 2011). Analog zu der vorliegenden Versuchsreihe wurden verschiedene Entzündungsmarker auch zum Zeitpunkt 2 h und 6 h *post stimulationem* bestimmt und zeigten auf mRNA Ebene 2 h nach Stimulation den Höhepunkt der TLR9-abhängigen pulmonalen Inflammation. Sowohl humane pulmonale interstitielle Makrophagen (IM), als auch alveoläre Makrophagen (AM) reagieren beide auf TLR9 Stimulation mit einer erhöhten Zytokinproduktion von IL-1 β , IL-6 und Interferon- γ (Hoppstadter et al., 2010).

Neben der Produktion der proinflammatorischen Zytokine wurde dokumentiert, dass der Transkriptionsfaktor NF κ B im Lungengewebe über TLR9 (Signalwege) aktiviert wird (Knuefermann et al., 2007; Vollmer, 2006). Der Versuchsaufbau und das Injektionsprotokoll von Knuefermann et al. decken sich mit der Vorgehensweise in der vorliegenden Arbeit. Der translozierte Transkriptionsfaktor NF κ B ist als Induktor der proinflammatorischen Zytokinproduktion von größter Bedeutung für die Inflammation (Kawai und Akira, 2006).

Zu unterstreichen gilt die zentrale Rolle von NF κ B mitsamt der nachgeschalteten Zytokine für eine pulmonale Inflammation (Cheng et al., 2007; Lentsch und Ward, 2001).

In mehreren monovirulenten *in vivo* Sepsismodellen konnte eine CpG-ODN-induzierte Entzündungsreaktion festgestellt werden, die NF κ B-abhängig über den TLR9 Signalweg ablief (Hemmi et al., 2000; Sparwasser et al., 1997). Im Hinblick auf die pulmonale Inflammation konnten weitere monovirulente *in vivo* Modelle TLR9-spezifische Entzündungsreaktionen durch systemische oder direkt intratracheale CpG-ODN Gabe dokumentieren (Knuefermann et al., 2007; Li et al., 2004; Tasaka et al., 2009). Darüber hinaus konnten Yamada et al. eine monovirulente CpG-ODN-induzierte pulmonale Inflammation durch Gabe von suppressiven ODN eindämmen (Yamada et al., 2004).

Über die monovirulente, TLR9-spezifische Entzündungsreaktion hinaus scheint TLR9 auch für den komplexen Verlauf einer polymikrobiellen Sepsis eine entscheidende Rolle zu spielen. So sank bei TLR9-defizienten Mäusen die Mortalität in einem durch CLP („cecal ligation and puncture“)-induzierten polymikrobiellen Sepsismodell (Plitas et al., 2008).

In einem *in vivo* Modell der polymikrobiellen Peritonitis bzw. Sepsis, „colon ascendens stent peritonitis“ (CASP), fielen MyD88-defiziente Mäuse durch erniedrigte Entzündungswerte und eine reduzierte Mortalität auf (Reim et al., 2011; Victoni et al., 2010; Weighardt et al., 2002). MyD88 nimmt eine zentrale Position als Adaptermolekül in der TLR9 Signalkaskade ein und unterstreicht damit die Bedeutung von TLR9 für die polymikrobielle Sepsis (Kaisho und Akira, 2001). Auch die Defizienz von TLR9 selbst führte in der CASP Gruppe zur niedrigeren Sterblichkeit und zum verbesserten Erhalt der kardialen Funktion (Lohner et al., 2013). Weitere Untersuchungen von Weighardt et al. zeigten, dass TLR2-defiziente und TLR4-defiziente Mäuse keine signifikante Verbesserung des Überlebens im CASP Modell aufwiesen (Weighardt et al., 2002).

Mit der Kenntnis dieser Eigenschaften und Funktionen von TLR9 stellt sich die Frage, ob und in wie weit man die TLR9-abhängige pulmonale Entzündungsreaktion modulieren kann. In der vorliegenden Arbeit wurde ein monopathogenes Modell verwendet, um die TLR9-spezifischen Mechanismen im Inflammationsgeschehen zuerst im einfachen monovirulenten *in vivo* Modell zu erschließen und in zukünftigen Untersuchungen auf ein polymikrobielles *in vivo* Modell übertragen zu können. Somit wurden in unserem Modell die Inflammation und konsekutive

pulmonale Inflammation der Mäuse durch einen singulären Reiz mit 1668-Thioat, einem selektiven TLR9 Agonisten, erzeugt. Zur Kontrolle und Bestätigung der TLR9-Spezifität wurden TLR9-defiziente Mäuse ebenfalls mit 1668-Thioat behandelt und dienten somit als Negativkontrolle.

Diese Negativkontrollen zeigten im Gegensatz zu der Positivkontrollgruppe (1668-Thioat + PBS) keine klinischen Zeichen einer systemischen Inflammation und auch die in der Lunge gemessene Zytokin mRNA-Expression war hier nicht erhöht. Dies lässt sich durch das bereits demonstrierte Ausbleiben der TLR9-abhängigen NF κ B-Induktion in TLR9-D Mäusen nach Stimulation mit CpG-ODN erklären (Li et al., 2004; Yi et al., 2001).

So konnten wir in der vorgelegten Arbeit zeigen, dass zum einen eine pulmonale, monovirulent-induzierte inflammatorische Reaktion ausgelöst werden konnte und dass die beobachtete Entzündungsreaktion der Mäuse TLR9-spezifisch war.

Um eine effektive und langdauernde systemische Entzündungsreaktion hervorzurufen, die zu einem „remote-injury“ der Lunge führt, wurden zum einen die behandelten Tiere alle einer i.p. Vorbehandlung mit D-GalN unterzogen und zum anderen mit einem Thioat-Rücken stabilisierte ODN verwendet. Den Tieren wurde D-GalN verabreicht, da sonst durch den *First-Pass*-Effekt die i.p. und i.v. applizierten ODN frühzeitig inaktivieren würden. Mäuse die 1668-Thioat ohne vorherige D-GalN Gabe gespritzt bekamen, zeigten weder klinisch noch molekularbiologisch erkennbare Zeichen einer Sepsis (Heeg et al., 1998; Silverstein, 2004; Sparwasser et al., 1997; Sun et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit zeigten die nur mit D-GalN behandelten Mäuse weder eine klinische Manifestation einer systemischen Entzündungsreaktion, noch konnte auf molekularbiologischer Ebene eine erhöhte mRNA-Zytokinexpression festgestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit der Auffassung, dass D-GalN zu keiner systemischen Entzündung, sondern lediglich eine auf die Leber beschränkte akute Hepatitis induziert (Lehmann et al., 1987). D-GalN wirkt auf die Leber und erhöht die Sensitivität bei Mäusen für das proinflammatorische Zytokin TNF- α (Galanos et al., 1988; Galanos et al., 1979). Der Sensitivierung liegen biochemische Effekte zu Grunde (Decker und Keppler, 1974). Hierdurch kann eine Einflussnahme auf die gesammelten Ergebnisse der Zytokinexpression weitestgehend ausgeschlossen werden. Bezüglich der Dosierung und Applikationsform konnten wir uns in dem

hier vorgelegten Modell einer Sepsis-induzierten „remote lung injury“ an Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe richten (Knuefermann et al., 2007).

Einen weiteren Modifikationspunkt im Versuchsaufbau stellen die mit Phosphorthioatrückgrat veränderten ODN dar. Die so veränderten PS-ODN sind vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt und ihre Wirkungsdauer somit verlängert (Krug et al., 2001a). Im Gegensatz zu „natürlichen“ (unmodifizierten) Phosphodiestern (PD-ODN) entsteht mit Hilfe der Phosphorthioat modifizierten PS-ODN eine ausreichende Stimulation der Tiere mit einer konsekutiven systemischen Entzündung und darauffolgenden indirekten akuten pulmonalen Inflammation (Hoque et al., 2011; Trieu et al., 2006).

Zu berücksichtigen ist, dass PS-ODN viel potenter wirken und im höheren Maße endozytotisch intrazellulär aufgenommen werden als PD-ODN (Rutz et al., 2004; Sester et al., 2000). Darüber hinaus könnte das Phosphorthioat Rückgrat an die TLR bzw. deren Bindungsstellen an der Ektodomäne binden und die TLR9 Funktion modulieren (Haas et al., 2008). Somit könnten zu einem gewissen Teil die Ergebnisse beeinflusst werden (Velten et al., 2012). Es ist somit weiterhin Gegenstand der Diskussion, ob ein Thioat-Rückgrat wirklich die Eigenschaften bakterieller DNA realistisch nachahmen kann (Pisetsky und Reich, 1999). Vereinzelt wird mittlerweile gefordert, hinsichtlich der starken Wirkung und Nebenwirkungen bei Gebrauch von PS-ODN, PD-ODN in den Versuchsmodellen einzusetzen (Meng et al., 2011). Andererseits sprechen neue veröffentlichte Ergebnisse für eine Thioat-unabhängige und sequenzspezifische Reaktion (Avalos und Ploegh, 2011). Die vorliegenden Ergebnisse beruhen ausschließlich auf Versuchen mit PS-ODN und bieten keine Klärung der Frage nach einer möglichen rückgratspezifischen Wirkung. Allerdings konnte zumindest in unserer Arbeit in der TLR9-defizienten Gruppe eine Thioat-abhängige TLR7 Aktivierung oder andere Nebenreaktion nicht nachgewiesen werden. Daher ist von keinem Rückgrat-spezifischen Effekt in der vorliegenden Arbeit auszugehen.

Bei den durch D-GalN sensitivierten Mäusen bewirkte die i.p. Applikation von 50 nmol des CpG-ODN 1668-Thioat eine innerhalb von 6 bis 7 h tödlich verlaufende schwere Sepsis. Ähnliche letale Sepsismodelle wurden an Mäusen bereits etabliert (Peter et al., 2008; Sparwasser et al., 1997). Der Zeitpunkt für die i.v. verabreichten inhibitorischen ODN wurde so gewählt, dass sich das 1668-Thioat innerhalb von 30 min über die Bauchhöhle systemisch verbreiten konnte.

Klaschik et al. konnten bei Mäusen *in vivo* 30 min nach i.p. Gabe von CpG-ODN eine erste Hochregulierung der proinflammatorischen Mediatoren in Splenocyten der Tiere messen, die ihr Maximum 3 h nach CpG Stimulation erreichte (Klaschik et al., 2009). Da die i.v. verabreichten inhibitorischen ODN über das venöse System schnell systemisch wirken können (Wang et al., 2007), kann man davon ausgehen, dass beide ODN Gruppen im Lungengewebe wirken. Um eine kompetitive Situation am TLR9 zwischen stimulierendem 1668-Thioat und inhibitorischen ODN herzustellen, wurde die Konzentration der i.v. verabreichten Modulatoren und die von 1668-Thioat äquimolar (jeweils 50 nmol) eingesetzt. Die Zeitpunkte und Konzentrationen für die Gabe der jeweiligen Liganden und der Untersuchung leiteten wir von Ergebnissen aus Publikationen und eigenen Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ab (Fernandez et al., 2004; Knuefermann et al., 2007; Sparwasser et al., 1997). Dass die Zytokinexpression zum Zeitpunkt 2 h am höchsten liegt, wurde auch in anderen Arbeiten gezeigt, die ein vergleichbares Stimulationsmodell verwendeten (Fernandez et al., 2004; Hong et al., 2004; Knuefermann et al., 2007). Zum Zeitpunkt 6 h waren besonders die Spiegel von TNF- α und IL-1 β bereits wieder stark abgefallen, da beide Zytokine in der frühen Phase des Entzündungsgeschehens hochreguliert werden bzw. nach 2 h bereits das Maximum ihrer Expression überschritten haben. Ähnliche Daten lieferten andere Arbeitsgruppen aus *in vitro* und *in vivo* Versuchen (Klaschik et al., 2009; Yi et al., 2006; Zhang et al., 2010).

Um zu untersuchen inwieweit die TLR9-abhängige Entzündungsreaktion durch Antagonisten moduliert werden kann, wurde der Einfluss von potentiellen TLR9 Antagonisten anhand der mRNA-Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-6 aus dem Lungengewebe der Mäuse, 2 h und 6 h nach der Stimulation per 1668-Thioat mit Hilfe der RT-qPCR gemessen.

Diese Zytokine entstehen und wirken in einem komplexen Netzwerk aus Fibroblasten, Epithelzellen, Makrophagen und Monozyten. Somit lenken sie auch die stadienhaft ablaufende Pathophysiologie einer pulmonalen Inflammation bzw. des ARDS (Belperio et al., 2006; Mukhopadhyay et al., 2006; Niederman und Fein, 1990).

So gilt TNF- α als einer der Hauptmediatoren für die Entzündungsreaktion und ist auch relevant bei Sepsis-induziertem ARDS (Leeper-Woodford et al., 1991). TNF- α schädigt u.a. die *Surfactant* Proteine und schränkt somit die Lungenfunktion erheblich ein (Berhane et al., 2000; Miakotina und Snyder, 2002). Besonders zu Beginn einer schweren Entzündung steigt das Zytokin stark an

und übersteigt bereits nach wenigen Stunden sein Maximum (Klaschik et al., 2009; Sheridan et al., 1997; Zhang et al., 2010). Dies deckt sich mit der gemessenen Kinetik von TNF- α in unserem Versuch. Nach CpG-Stimulation konnten wir erhöhte TNF- α , genauso wie IL-1 β und IL-6 Werte messen. Vergleichbare Ergebnisse erhoben Zou et al. und Lipford et al. (Lipford et al., 1997; Zou et al., 2002). Dies gilt auch für die mRNA-Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-6 im Lungengewebe nach systemischer CpG-ODN Gabe in dem vorliegenden Versuch genauso wie bei Knuefermann et al. (Knuefermann et al., 2007).

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β zeigte eine ähnliche Kinetik wie TNF- α . Zwar stieg IL-1 β in unseren Versuchen etwas verzögert an, war aber bereits beim Zeitpunkt 6 h *post stimulationem* wieder deutlich abgefallen. Eine ähnliche Zeitkinetik konnten auch Yi et al. in einem *in vivo* Modell feststellen. An D-GalN sensitivierten Mäusen konnte durch i.p. CpG-ODN Gabe eine inflammatorische Reaktion hervorgerufen werden, wobei mittels ELISA die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-12 im Serum gemessen wurden und diese zeigten, dass die TNF- α Konzentration bereits nach 1 h abfiel, genauso wie von IL-1 β . Die IL-6 Konzentration hingegen stieg noch bis zu 4 h *post stimulationem* und fällt erst später und langsamer als die von TNF- α und IL-1 β ab (Yi et al., 2006). Analog zu TNF- α übernimmt IL-1 β eine wichtige Position als Vermittler in der Entzündungsreaktion. Beide Zytokine werden daher auch als „major inducer“ bezeichnet und wirken synergistisch im Entzündungsgeschehen (Klaschik et al., 2009). TNF- α und IL-1 β wirken lokal an Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten und führen auch zu einer erhöhten IL-8 Konzentration. IL-8 als proinflammatorisches Zytokin und chemotaktischer Faktor wird vermehrt bei ALI/ARDS Patienten gefunden (Miller et al., 1996). Die Expression des Zytokins IL-6 steigt später als IL-1 β und TNF- α an (Yi et al., 2001). Der Verlauf und letztendlich die Prognose bei Sepsispatienten korreliert unter anderem mit dem Zytokin IL-6 (Meisner, 2005; Osuchowski et al., 2006). Mäuse, die ein niedrigeres IL-6-Profil aufwiesen, überlebten auch länger. Für TNF- α wurde gezeigt, dass keine solche Korrelation besteht (Bozza et al., 2007). Allerdings wird kontrovers diskutiert wie verlässlich IL-6 als immunologischer Biomarker ist. Nach anfänglichem Optimismus scheint IL-6 alleinstehend keine zufriedenstellende Prognose über den Verlauf der Patienten abgeben zu können (Brunkhorst, 2006; Dimopoulou et al., 2007; Vaschetto und Protti, 2010).

Die Erkenntnisse zu TNF- α , IL-1 β und IL-6 verdeutlichen die Bedeutung dieser Zytokine für die Entzündungsreaktion und das Sepsis-induzierte ARDS. In den meisten *in vitro* und *in vivo* Sepsismodellen wurden die Zytokinexpression und Zytokinproduktion ebenfalls als molekularbiologische Indikatoren einer Sepsisreaktion verwendet (Hong et al., 2004; Sparwasser et al., 1997). Sie wurden auch in experimentellen Lungeninflammationsmodellen als Marker für den Schweregrad und den Verlauf bestimmt (Hoque et al., 2011; Yamada et al., 2004; Zhang et al., 2010).

Erstmals konnte in der vorliegenden Arbeit *in vivo* gezeigt werden, dass die Substanzen H154-Thioat, IRS954-Thioat und Chloroquin, i.v. verabreicht, signifikant die mRNA-Expression der Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 im Lungengewebe 6 h nach TLR9-spezifischer Stimulation mit 1668-Thioat i.p. Gabe reduzieren können. Die TLR9-Spezifität wurde anhand der Negativkontrollen an TLR9-defizienten Mäusen bewiesen.

Darüber hinaus konnte das inhibierend wirkende H154-Thioat bereits zum Zeitpunkt 2 h *post stimulationem* die Expression des gemessenen Zytokinprofils signifikant verringern. Mäuse, die mit H154-Thioat behandelt wurden, überlebten außerdem länger und wiesen deutlich mildere Entzündungssymptome auf. Verglichen mit den Kontrollgruppen PBS und TLR9-D zeigte sich allerdings, dass die Behandlung mit H154-Thioat die 1668-Thioat-induzierte Inflammation nicht vollständig blockieren konnte. Dies bedeutet, dass H154-Thioat die schwere und letale Entzündungsreaktion im Organismus der Mäuse nicht vollständig aufheben konnte. Sowohl in der Literatur als auch in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe stellt H154-Thioat einen potenten Inhibitor der TLR9-abhängigen Entzündungsreaktion dar. In *in vitro* Untersuchungen gelang es an RAW 264.7 Makrophagenzellkulturen eine über 1668-Thioat initiierte Zytokinproduktion signifikant zu unterdrücken. Die Reduktion der proinflammatorischen Zytokine funktionierte noch bis 6 h nach 1668-Thioat Stimulation (Gielen, 2011). Die Arbeitsgruppe von Yamada dokumentierte ebenfalls eine potente inhibitorische Wirkung von H154-Thioat sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Versuchen, die im Einklang mit unseren Ergebnissen stehen. *In vitro* konnte die H154-Thioat Applikation an Splenozyten aus BALB/c Mäusen die CpG-induzierte Zytokinproduktion reduzieren. Eine signifikante Inhibition durch ODN H154 war möglich bis zu 3 h nach CpG-induzierter Stimulation (Yamada et al., 2002). Des Weiteren wurde *in vivo* H154 im Modell eines CpG-initiierten akuten Lungenversagens an BALB/c Mäuse getestet. Sowohl die in

der Bronchiallavage (BAL) gemessene totale Zellzahl, als auch die Anzahl der Neutrophilen war nach H154-Thioat Behandlung im Vergleich zu den CpG-ODN stimulierten Mäusen reduziert, genauso wurde das CpG-abhängige Zytokinprofil der Mäuse nach H154 Gabe signifikant verringert (Yamada et al., 2004).

In einem CLP-Sepsismodell an C57BL/6 Mäusen verringerte die Gabe von H154-Thioat die gemessenen Zytokinwerte und senkte die Mortalität im Vergleich zu der ohne ODN behandelten CLP-Gruppe (Yasuda et al., 2008).

IRS954-Thioat wirkt neben TLR9 auch an TLR7 antagonistisch (Barrat et al., 2007). In einem *in vivo* Lupusmodell konnte hierbei erfolgreich die antagonisierende Wirkung von IRS954 nach intraperitonealer Gabe an Mäusen dokumentiert werden. Dabei wurde neben der renalen auch die pulmonale Inflammation untersucht, die beide reduziert werden konnten (Barrat und Coffman, 2008).

Pawar et al. belegten *in vitro* an murinen Monozyten, dass IRS954 die CpG-ODN-induzierte Zytokinproduktion und die Interferon- α Produktion blockiert. Hierbei wurde mit einem CpG-ODN ein TLR9 Agonist und mit Imiquimod ein TLR7 Agonist eingesetzt. Beide Signalwege konnten durch IRS954 Gabe blockiert werden, was IRS954 als dualen TLR7- und TLR9-Antagonisten bestätigt. Des Weiteren konnten Pawar et al. *in vivo* durch IRS954 Behandlung von MRL^{IPR/IPR} Mäusen, sowohl an Nieren, als auch an Lungengewebe, im Vergleich zu der rein CpG-stimulierten Gruppe eine reduzierte Inflammation dokumentieren. Dabei wurde den Mäusen über einen Zeitraum von 14 Wochen IRS954 i.p. verabreicht, was eher einen chronischen Inflamationsprozess widerspiegelt und im Gegensatz zu unseren akuten Sepsismodellen steht (Pawar et al., 2007).

Hoque et al. demonstrierten *in vivo* die Reduktion einer systemisch-induzierten pulmonalen Inflammation per IRS954 Vorbehandlung. Die C57BL/6 Mäuse erhielten IRS954 1 h bevor sie durch Caerulein Gabe eine systemische Pankreatitis und in Folge eine pulmonale Inflammation bzw. „remote lung injury“ entwickelten. Durch die Vorbehandlung mit IRS954 zeigten die Mäuse einen mildereren Verlauf und eine gesenkte Mortalität (Hoque et al., 2011). Unter Einsatz von TLR9-defizienten Mäusen wurde die TLR9-abhängige Art der Entzündung und die spezifische Inhibition durch IRS954 bewiesen (Hoque et al., 2011). Es ist darauf hinzuweisen, dass IRS954-Thioat auch als TLR7- und TLR9-Antagonist fungiert und, dass das in dieser Arbeit

vorgelegte Sepsismodell einzig über TLR9-spezifisches 1668-Thioat erzeugt wurde. Diese neue Unterklasse von INH-ODN inhibiert vor allem die IFN Produktion aus pDC und wurde vorwiegend in SLE-Modellen verwendet (Barrat und Coffman, 2008). In unserem *in vivo* Sepsismodell bewies IRS954-Thioat ebenfalls eine signifikante Hemmung des konsekutiven pulmonalen Entzündungsgeschehens.

Der Wirkstoff Chloroquin nimmt in gewisser Weise eine Sonderstellung unter den hier untersuchten Substanzen ein. Es ist kein Oligodesoxynukleotid und als Therapiemittel bei Malaria, SLE und Rheumatoider Arthritis bekannt (Marshak-Rothstein et al., 2004; Wallace, 2001). In unseren Versuchen konnte Chloroquin *in vitro* (Gielen, 2011) und *in vivo* eine TLR9-spezifische Reaktion signifikant reduzieren. Dieses Wirkungsbild deckt sich mit Ergebnissen aus Arbeiten an *in vitro* und *in vivo* Modellen (Hong et al., 2004; Yamada et al., 2004; Yasuda et al., 2008). Der Wirkmechanismus, des seit Jahrzehnten verwendeten Pharmakons, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Ein Erklärungsversuch für die Wirkung des Chloroquins am TLR9 ist, dass es den Reifungs- und Aktivierungsprozess des TLR9 im Endolysosom stört (Delhaes et al., 2003; Hacker et al., 1998; Yi et al., 1998). So werden TLR9 zwar endosomal aufgefunden, allerdings verhindert Chloroquin als schwache Base die Azidifikation im Endosom und blockiert damit die Aktivierung der TLR9. Folglich unterbleibt die Signalweiterleitung über MyD88 und die inflammatorische Reaktion (Ahmad-Nejad et al., 2002). Weiterhin bleibt fraglich, ob der Einfluss auf die endosomale Reifung und Aktivierung ausschlaggebend für die inhibierende Wirkung von Chloroquin ist oder ob z.B. die Bindung an den TLR9 entscheidend ist. So wird argumentiert, dass die verwendeten Konzentrationen von Chloroquin nicht zur entscheidenden Veränderung des pH-Milieus der intrazellulären Kompartimente ausreichen, aber trotzdem eine signifikante Inhibition bewirken (Macfarlane und Manzel, 1998; Rutz et al., 2004). Es werden auch Hemmungen von TNF- α auf posttranslationeller Ebene beschrieben. Außerdem hemmt Chloroquin die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 nach LPS Gabe durch jeweils unterschiedliche Mechanismen (Ertel et al., 1992; Jang et al., 2006; Picot et al., 1993).

In vitro Untersuchungen an Makrophagen konnten die Annahmen einer Reduktion des Zytokinprofils in einem polymikrobiellen Sepsismodell bestätigen (Gielen, 2011; Yasuda et al., 2008). In den hier durchgeführten *in vivo* Versuchen konnte nach Chloroquingabe eine

signifikante Reduktion der systemischen Reaktion im Vergleich zur reinen Stimulationsgruppe (1668-Thioat + PBS) 6 h *post stimulationem* festgestellt werden. Andererseits wirkt Chloroquin im Vergleich zu H154-Thioat und IRS954-Thioat schwächer inhibierend. Grund hierfür könnte die Applikationsform des Wirkstoffs sein. Bis auf Hong et al. verwendeten andere Arbeitsgruppen Chloroquin meist in der oralen (Yasuda et al., 2008) oder intraperitonealen (Lewis et al., 2011) Dargreichungsform. In unseren Versuchen führte die i.v. Injektion von Chloroquin bei den Mäusen zu kurzanhaltenden schockähnlichen Symptomen, die spontan vollständig regredient waren. Auch wenn es sich um eine nur kurzfristige, innerhalb von 5 min komplett regrediente Reaktion während bzw. direkt nach der i.v. Applikation gehandelt hat, kann eine Auswirkung auf die Ergebnisse nicht auszugeschlossen werden. Des Weiteren bleibt zu berücksichtigen, dass Chloroquin höchstwahrscheinlich auch einen Einfluss auf TLR3, TLR7 und TLR8 ausübt (Krieg, 2007; Matsumoto et al., 2004). Diese befinden sich ebenfalls im Endosom und sind genau wie TLR9 abhängig von pH-Veränderungen in den Vesikeln (Kuznik et al., 2011). Womöglich könnte eine per os, intratracheal oder auch i.p. Gabe des Chloroquin in Folgeuntersuchungen andere Ergebnisse liefern. Ebenso wäre eine i.v. Infusion oder eine p.o. Gabe über einen längeren Zeitraum zu erwägen. So setzt in der Behandlung der chronischen Entzündungsreaktion bei rheumatoider Arthritis die Wirkung des Pharmakons Chloroquin erst nach Wochen ein. Hierbei wird der Wirkstoff Chloroquin p.o. verabreicht (Delhaes et al., 2003).

In dem gewählten Versuchsmodell einer schweren Sepsis, die ohne Behandlung letal endet, könnte die Chloroquin Gabe nicht mehr ausreichend gewirkt haben. Yasuda et al. stellten in ihrer Versuchsreihe bessere Ergebnisse bei Tieren fest, die mit Chloroquin vorbehandelt wurden sind. So könnte Chloroquin möglicherweise als adjunktives Therapeutikum bei einer schweren Sepsis eingesetzt werden, aber nicht als Monotherapie ausreichen (Yasuda et al., 2008).

Das in der Literatur als neutral wirkend beschriebene 1612-Thioat (Klaschik et al., 2009; Shimosato et al., 2009; Yamada et al., 2004) zeigte in den vorliegenden Versuchen ein nicht eindeutiges Bild seiner Wirkung. Weitestgehend führte die 1612-Thioat Gabe zu keiner signifikanten Beeinflussung am 1668-Thioat-induzierten Sepsismodell und bestätigt hiermit seine neutrale Wirkung am TLR9. Als Ausnahme muss erwähnt werden, dass nach 1612-Thioat Gabe 6 h *post stimulationem* die Zytokinexpression von TNF- α signifikant sank. In *in vitro* Untersuchungen an Makrophagen fiel dieses heterogene Wirkungsprofil von 1612-Thioat bereits

auf (Gielen, 2011). Eine Erklärung könnte sein, dass zwar im Nano-Bereich bei Gebrauch von PS-ODN von einer sequenzspezifischen Wirkungsbeziehung auszugehen ist, aber bei über 25 μM verwendetem PS-ODN auch eine Wirkung des Phosphorthioatrückgrats nicht ausgeschlossen ist (Lenert et al., 2009; Vollmer et al., 2004b). So sprechen Haas et al. von einer partiell aktivierenden Funktion der mit Thioatrückgrat modifizierten ODN (Haas et al., 2008). Die konnte in Versuchen unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden (Velten et al., 2012). Eventuell könnte 1612-Thioat die Bindestellen am TLR9 besetzen und somit für andere ODN blockieren oder die ODN an der Bindung am TLR9 hindern und so zum Ergebnis bei TNF- α 6 h nach Stimulation geführt haben.

Bis heute ist nicht geklärt, durch welchen Mechanismus die INH-ODN an TLR9 inhibierend wirken. Als eine Möglichkeit wird eine kompetitive Hemmung am TLR9 in der Literatur angeführt (Lenert, 2010). Dafür spricht, dass ST-ODN und INH-ODN ans C-terminale Ende der TLR-Ektodomäne binden und darüber die jeweilige Wirkung am TLR9 aktivieren (Avalos und Ploegh, 2011). Da in unserer Arbeit das Verhältnis zwischen ST-ODN und INH-ODN 1:1 betrug könnte man erwarten, dass INH-ODN die Wirkung der ST-ODN aufheben. Allerdings müssten dafür die TLR9 beide Sequenzen von ST- und INH-ODN gleichermaßen aufnehmen und binden, und es gilt zu berücksichtigen, dass die Stimulation i.p. und 30 min früher als die i.v. Gabe der Modulatoren erfolgte. Mit Bindungsstudien konnten Avalos und Kollegen widerlegen, dass verschiedene ODN identisch an TLR9 binden. So binden ODN sequenzabhängig an TLR9 und INH-ODN je nach Gruppe bzw. Sequenz stärker oder schwächer am TLR (Avalos und Ploegh, 2011).

Eine andere Möglichkeit ist, dass INH-ODN an TLR9 binden und die Konformationsänderung, die für die Aktivierung notwendig ist, verhindern. Allerdings weisen die Ergebnisse der Gruppe um Avalos darauf hin, dass die für diese Konformationsänderung notwendigen Proteasen durch INH-ODN Gabe nicht beeinflusst werden (Avalos und Ploegh, 2011). Für eine abschließende Erklärung fehlen zurzeit noch beweisende Versuche. Aufnahmen von TLR9 in gebundenem und ungebundenem Zustand könnten auf der Suche nach einer Erklärung für die TLR9 Modulation entscheidend sein (Chen et al., 2011).

Mit der gewählten 1668-Thioat Dosis bei den mit D-GalN sensitivierten Mäusen gelten die obengenannten Aussagen für ein letales Sepsismodell (Cornelie et al., 2002; Knuefermann et al.,

2007). Die bisherigen Ergebnisse einer inhibierenden Modulation an TLR9 entstammten meist monovirulenten bzw. monopathogenen *in vitro* Versuchen. In *in vivo* Versuchen zur Beeinflussung von TLR9 durch Substanzen auf das Lungengewebe bezogen sich die gemessenen Parameter meist auf andere Zeitpunkte der Expressionsbestimmung oder es wurden andere oder keine inhibierenden Modulatoren getestet (Hong et al., 2004; Yasuda et al., 2008).

Es muss angemerkt werden, dass unsere vorliegenden Ergebnisse und darauf beruhende Aussagen zur pulmonalen Inflammation hauptsächlich durch molekularbiologische Marker, d.h. proinflammatorische Zytokinen begründet sind. Diese bilden nicht die klinisch-laborchemischen Definitionskriterien eines ARDS ab, sondern sind pathognomonisch für die inflammatorische Frühphase beim ARDS. Zur klaren Erfassung eines ARDS bei unseren Mäusen wären zusätzlich Werte aus umfangreichen Funktionsmessungen wie Bodyplethysmographien, Sauerstoffsättigungskurven und Lungenkapillarverschlussdruckmessungen (PCWP, *Wedge*-Druck) per Rechtsherzkatheter notwendig (Bernard et al., 1994; Striebel, 2008).

Trotzdem untermauern unsere Ergebnisse wie oben erwähnt die zentrale Rolle von TLR9 für die Vermittlung einer Inflammation. So konnte unsere Gruppe im gleichen Versuchsprotokoll wie in dieser Arbeit vorgestellt zeigen, dass über eine Modulation von TLR9 auch die kardiale Inflammation und Dysfunktion positiv beeinflusst werden kann (Boehm et al., 2013).

Insgesamt aber bleibt bei den vorliegenden Ergebnissen zu berücksichtigen, dass die Entzündungsreaktion monovirulent über TLR9 initiiert wurde und somit keine Reaktion auf einen klinisch relevanten polymikrobiellen Reiz darstellt. Hierzu konnte unsere Arbeitsgruppe ebenfalls die zentrale Rolle von TLR9 für die Vermittlung der kardiovaskulären Inflammation und Dysfunktion herausarbeiten (Ehrentraut et al., 2012; Lohner et al., 2013). Im Gefäßsystem wirkte H154-Thioat bei polymikrobiellem Stimulus protektiv (Ehrentraut et al., 2012). Der Effekt von TLR9-spezifischen Modulatoren wie ODN auf die septische Kardiomyopathie ist zurzeit Gegenstand aktueller Untersuchungen. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass H154-Thioat auch beim Sepsis-induzierten „remote lung injury“ eine mögliche therapeutische Option darstellen könnte.

In der Evolution haben sich Unterschiede in den potenten Motivmerkmalen bei verschiedenen Spezies ergeben, so auch zwischen Maus und Mensch (Klinman et al., 2008; Krug et al., 2001b; Rankin et al., 2001). Es ist zurzeit also nicht abschließend geklärt, ob H154-Thioat auch im

humanen System ähnliche Effekte erzielt wie im murinen Modell. Weiterhin bleibt offen, ob im Hinblick auf unerwünschte Wirkungen der Einsatz von PD-ODN anstelle von PS-ODN sinnvoller sein könnte (Brown et al., 1994; Crooke, 1991; Lipford et al., 2000; Meng et al., 2011).

Zusammenfassend konnte in der hier vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass im murinen monovirulenten Sepsismodell eine TLR9-abhängige Modulation der pulmonalen Inflammation und nebenbefundlich eine Verbesserung des Überlebens der mit H154-Thioat, IRS954-Thioat und Chloroquin behandelten Mäuse möglich ist. Präparat-abhängige Unterschiede in der Protektions-Qualität zeigten sich hierbei bereits nach 2 h, besonders H154-Thioat konnte als besonders potentes inhibitorisches ODN herausgearbeitet werden. Untersuchungen zur septischen Kardiomyopathie lieferten hierzu ähnliche Ergebnisse (Boehm et al., 2013), und auch erste Daten aus polymikrobiellen Sepsismodellen zeigen hierbei ähnliche protektive Eigenschaften einer Immun-Modulation mit H154-Thioat (Ehrentraut et al., 2012). Die TLR9-vermittelte Modulation der Inflammation könnte in Zukunft eine alternative Therapiestrategie auch gegen das Sepsis-induzierte „remote lung injury“ darstellen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand eines monovirulenten, TLR9-abhängig induzierten *in vivo* Sepsismodells in der Maus untersucht, ob die pulmonale Inflammation durch die Gabe von TLR9-spezifischen INH-ODN (H154-Thioat, IRS954-Thioat, 1612-Thioat) und dem Antimalariamittel Chloroquin moduliert werden kann.

12 Wochen alte, männliche C57BL/6 Mäuse wurden mit D-GalN (25 mg) i.p. vorbehandelt und somit für die folgende ODN Wirkung sensitiviert. Nach 30 min erfolgte die Stimulation der Tiere durch i.p. Injektion vom TLR9-spezifischen Agonisten CpG-ODN 1668-Thioat (50 nmol), wodurch eine systemische Inflammation mit konsekutivem „remote lung injury“ initiiert wurde. Nach weiteren 30 min wurde jeweils einer der zu testenden Substanzen (H154-Thioat, IRS954-Thioat, 1612-Thioat, Chloroquin) i.v. appliziert. Zum Zeitpunkt 2 h und 6 h *post stimulationem* erfolgte die Entnahme des Lungengewebes mit anschließender Messung der pulmonalen mRNA-Expression von NFκB-induzierten proinflammatorischen Zytokinen TNF-α, IL-1β und IL-6 per quantitativer Real-time PCR. In der Zeit zwischen CpG Stimulation bis zur Organentnahme wurden die Mäuse auf klinische Anzeichen einer Entzündung beobachtet. Zur Kontrolle und Bestätigung der TLR9-Spezifität wurden TLR9-defiziente Mäuse ebenfalls mit 1668-Thioat behandelt.

Die i.v. Gabe von H154-Thioat, IRS954-Thioat und Chloroquin reduzierte statistisch signifikant zum Messzeitpunkt 6 h *post stimulationem* das pulmonale proinflammatorische Zytokinprofil im Vergleich zu der rein stimulierten Gruppe 1668-Thioat. H154-Thioat inhibierte bereits 2 h *post stimulationem* signifikant die TLR9-abhängige Zytokinexpression auf mRNA Ebene. Außerdem wurden nebenbefundlich im Vergleich zur reinen Stimulationsgruppe bei den mit H154-Thioat, IRS954-Thioat und Chloroquin behandelten Mäusen mildere Krankheitsverläufe beobachtet und die Mortalität bis zu 40 % gesenkt.

Zusammenfassend belegen unsere Ergebnisse, dass die TLR9-abhängige Inhibition im monovirulenten *in vivo* Sepsismausmodell durch H154-Thioat, IRS954-Thioat und Chloroquin zu einem signifikant reduzierten Zytokinprofil eines „remote injury“ der Lunge führt.

Zum besseren Verständnis der TLR9 Inhibition durch H154-Thioat, IRS954-Thioat und Chloroquin sollen weitere Versuche in einem polyvirulenten Sepsis-induzierten „remote lung injury“ *in vivo* Modell dienen.

6. Literaturverzeichnis

Adamik B, Zimecki M, Wlaszczyk A, Kübler A. Immunological status of septic and trauma patients. I. High tumor necrosis factor α serum levels in septic and trauma patients are not responsible for increased mortality; a prognostic value of serum interleukin 6. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1997; 45: 169–175

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, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783–801

Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, Guidici D, Granton J, Moreno R, Smithies M, Thomas O, Artigas A, Le Gall JR. Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 77–84

Alberts B. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Weinheim: Wiley-VCH, 2009

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303–1310

Armstrong L, Thickett DR, Christie SJ, Kendall H, Millar AB. Increased expression of functionally active membrane-associated tumor necrosis factor in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 68–74

Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; 2: 319–323

Ashman RF, Goeken JA, Drahos J, Lenert P. Sequence requirements for oligodeoxyribonucleotide inhibitory activity. *Int Immunol* 2005; 17: 411–420

Avalos AM, Ploegh HL. Competition by inhibitory oligonucleotides prevents binding of CpG to C-terminal TLR9. *Eur J Immunol* 2011; 41: 2820–2827

Ballou SP, Kushner I. C-reactive protein and the acute phase response. *Adv Intern Med* 1992; 37: 313–336

Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 2005; 21: 389–395

Barrat FJ, Meeker T, Chan JH, Guiducci C, Coffman RL. Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9 leads to reduction of autoantibody production and amelioration of disease symptoms. *Eur J Immunol* 2007; 37: 3582–3586

Barrat FJ, Coffman RL. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol Rev* 2008; 223: 271–283

Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* 2003; 21: 12-23

Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzone A, Davies DR, Segal DM. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 2003; 24: 528–533

Belperio JA, Keane MP, Lynch JP, Strieter RM. The role of cytokines during the pathogenesis of ventilator-associated and ventilator-induced lung injury. *Semin Respir Crit Care Med* 2006; 27: 350–364

Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12: 393-416

Berhane K, Margana RK, Boggaram V. Characterization of rabbit SP-B promoter region responsive to downregulation by tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L806-814

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A, Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 818–824

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344: 699–709

Beutler B, Poltorak A. Sepsis and evolution of the innate immune response. *Crit Care Med* 2001; 29: 2-6

Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007; 220: 35–46

Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321: 209–213

Boehm O, Markowski P, van der Giet M, Gielen V, Kokalova A, Brill C, Hoeft A, Baumgarten G, Meyer R, Knuefermann P. In vivo TLR9 inhibition attenuates CpG-induced myocardial dysfunction. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 217297

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101: 1644–1655

Boyd JH, Mathur S, Wang Y, Bateman RM, Walley KR. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF- κ B dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res* 2006; 72: 384–393

Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 2007; 11: R49

Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim YM. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol* 2007; 177: 265–275

Broide DH. Immunomodulation of allergic disease. *Annu Rev Med* 2009; 60: 279–291

Brown DA, Kang SH, Gryaznov SM, DeDionisio L, Heidenreich O, Sullivan S, Xu X, Nerenberg MI. Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. *J Biol Chem* 1994; 269: 26801–26805

Brown MA, Jones WK. NF- κ B action in sepsis: the innate immune system and the heart. *Front Biosci* 2004; 9: 1201–1217

Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 2004a; 30: 580–588

Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, Bion J, Romand JA, Villar J, Thorsteinsson A, Damas P, Armaganidis A, Lemaire F. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med* 2004b; 30: 51–6

Brunkhorst FM. Epidemiologie, Ökonomie und Praxis – Ergebnisse der deutschen Prävalenzstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet). *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2006; 41: 43–44

Burchardi H, Schneider H. Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics* 2004; 22: 793–813

Chambers RC. Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention? *Br J Pharmacol* 2008; 153: 367–378

Chen J, Nag S, Vidi PA, Irudayaraj J. Single molecule in vivo analysis of toll-like receptor 9 and CpG DNA interaction. *PLoS One* 2011; 6: 179-191

Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nat.Cell Biol* 2005; 7: 758-765

Cheng DS, Han W, Chen SM, Sherrill TP, Chont M, Park GY, Sheller JR, Polosukhin VV, Christman JW, Yull FE, Blackwell TS. Airway epithelium controls lung inflammation and injury through the NF- κ B pathway. *J Immunol* 2007; 178: 6504-6513

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159

Cornelie S, Wiel E, Lund N, Lebuffe G, Vendeville C, Riveau G, Vallet B, Ban E. Cytosine-phosphate-guanine (CpG) motifs are sensitizing agents for lipopolysaccharide in toxic shock model. *Intensive Care Med* 2002; 28: 1340-1347

Crooke RM. In vitro toxicology and pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Anticancer Drug Des* 1991; 6: 609-646

Davis HL, Suparto II, Weeratna RR, Jumintarto, Iskandriati DD, Chamzah SS, Ma'ruf AA, Nente CC, Pawitri DD, Krieg AM, Heriyanto, Smits W, Sajuthi DD. CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* 2000; 18: 1920-1924

Decker K, Keppler D. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev.Physiol Biochem. Pharmacol* 1974: 77-106

Delhaes L, Benoit-Vical F, Camus D, Capron M, Meunier B. Chloroquine and artemisinin: six decades of research--what next? *IDrugs* 2003; 6: 674-680

Dimopoulou I, Armaganidis A, Douka E, Mavrou I, Augustatou C, Kopterides P, Lyberopoulos P, Tzanela M, Orfanos SE, Pelekanou E, Kostopanagiotou G, Macheras A, Giamarellos-Bourboulis EJ. Tumour necrosis factor- α (TNF α) and interleukin-10 are crucial mediators in post-operative systemic inflammatory response and determine the occurrence of complications after major abdominal surgery. *Cytokine* 2007; 37: 55-61

Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-508

Dinarello CA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis* 1991; 163: 1177-1184

Dofferhoff AS, Bom VJ, de Vries-Hospers HG, van Ingen J, vd Meer J, Hazenberg BP, Mulder PO, Weits J. Patterns of cytokines, plasma endotoxin, plasminogen activator inhibitor, and acute-phase proteins during the treatment of severe sepsis in humans. *Crit Care Med* 1992; 20: 185-192

Dong L, Ito S, Ishii KJ, Klinman DM. Suppressive oligonucleotides protect against collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1686–1689

Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, Ulmer AJ, Branscheid D, Vollmer E, Dalhoff K, Zabel P, Goldmann T. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res* 2005; 6: 1

Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003; 2003: re3

Duramad O, Fearon KL, Chang B, Chan JH, Gregorio J, Coffman RL, Barrat FJ. Inhibitors of TLR-9 act on multiple cell subsets in mouse and man in vitro and prevent death in vivo from systemic inflammation. *J Immunol* 2005; 174: 5193–5200

Edelson BT, Unanue ER. MyD88-dependent but Toll-like receptor 2-independent innate immunity to *Listeria*: no role for either in macrophage listericidal activity. *J Immunol* 2002; 169: 3869–3875

Ehrentraut SF, Dorr A, Ehrentraut H, Lohner R, Lee S, Hoeft A, Baumgarten G, Knuefermann P, Boehm O, Meyer R. Vascular dysfunction following polymicrobial sepsis: role of pattern recognition receptors. *PLoS One* 2012; 9: e44531

Ehrentraut H, Meyer R, Schwederski M, Ehrentraut S, Velten M, Grohe C, Knuefermann P, Baumgarten G, Boehm O. Systemically administered ligands of Toll-like receptor 2, -4, and -9 induce distinct inflammatory responses in the murine lung. *Mediators Inflamm* 2011; 2011: 746-753

Eleftheriadis T, Lawson BR. Toll-like receptors and kidney diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009; 8: 191–201

Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; 33: 606–618

Engelmann L, Schuster HP. Diagnostik und Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen. Darmstadt: Steinkopff; 2006

Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH. Chloroquine attenuates hemorrhagic shock-induced immunosuppression and decreases susceptibility to sepsis. *Arch Surg* 1992; 127: 70-75

Ewald SE, Engel A, Lee J, Wang M, Bogyo M, Barton GM. Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med* 2011; 208: 643–651

Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide and IFN- γ induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF- κ B activation. *J Immunol* 2001; 166: 2018–2024

Fernandez S, Jose P, Avdiushko MG, Kaplan AM, Cohen DA. Inhibition of IL-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists. *J Immunol* 2004; 172: 2613–2620

Ferring M, Vincent JL. Is outcome from ARDS related to the severity of respiratory failure? *Eur Respir J* 1997; 10: 1297–1300

Fonseca DE, Kline JN. Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 256–262

Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med* 1998; 26: 2078–2086

Galanos C, Freudenberg MA, Matsuura M, Coumbos A. Hypersensitivity to endotoxin and mechanisms of host-response. *Prog Clin Biol Res* 1988; 272:295–308

Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1979; 76: 5939–5943

Gealekman O, Abassi Z, Rubinstein I, Winaver J, Binah O. Role of myocardial inducible nitric oxide synthase in contractile dysfunction and β -adrenergic hyporesponsiveness in rats with experimental volume-overload heart failure. *Circulation* 2002; 105: 236–243

Gielen V. Auswirkungen der pharmakologischen Inhibition des Toll-like Rezeptors 9 auf die inflammatorische Zytokinproduktion in vitro im Modell einer polymikrobiellen Sepsis. Online-Publikationen an deutschen Hochschulen Bonn, Univ., Diss., 2011; <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:hbz:5N-26566>

Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Müller T, Latz E, Wagner H. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 2008; 28: 315–323

Haasper C, Kalmbach M, Dikos GD, Meller R, Muller C, Krettek C, Hildebrand F, Frink M. Prognostic value of procalcitonin (PCT) and/or interleukin-6 (IL-6) plasma levels after multiple trauma for the development of multi organ dysfunction syndrome (MODS) or sepsis. *Technol Health Care* 2010; 18: 89–100

Hacker 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

Hare JM, Colucci WS. Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38: 155–166

Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, Endres S. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1633–1641

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

Heeg K, Sparwasser T, Lipford GB, Hacker H, Zimmermann S, Wagner H. Bacterial DNA as an evolutionary conserved ligand signalling danger of infection to immune cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 464–469

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303: 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

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992; 10: 413–417

Holtick U, Scheulen ME, von Bergwelt-Baildon MS, Weihrauch MR. Toll-like receptor 9 agonists as cancer therapeutics. *Expert Opin Investig Drugs* 2011; 20: 361–372

Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 644–658

Hong Z, Jiang Z, Liangxi W, Guofu D, Ping L, Yongling L, Wendong P, Minghai W. Chloroquine protects mice from challenge with CpG ODN and LPS by decreasing proinflammatory cytokine release. *Int Immunopharmacol* 2004; 4: 223–234

Hoppstadter J, Diesel B, Zarbock R, Breinig T, Monz D, Koch M, Meyerhans A, Gortner L, Lehr CM, Huwer H, Kiemer AK. Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Respir Res* 2010; 11: 124

Hoque R, Sohail M, Malik A, Sarwar S, Luo Y, Shah A, Barrat F, Flavell R, Gorelick F, Husain S, Mehal W. TLR9 and the NLRP3 inflammasome link acinar cell death with inflammation in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2011; 141: 358–369

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

Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 293–301

Janeway CA Jr, Murphy KP. *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum, Akad Verl, 2009

Jang C, Choi J, Byun M, Jue D. Chloroquine inhibits production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 703–710

Juarez E, Nunez C, Sada E, Ellner J, Schwander S, Torres M. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respir Res* 2010; 11: 2

Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 124–130

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006; 13: 816–825

Klaschik S, Tross D, Klinman DM. Inductive and suppressive networks regulate TLR9-dependent gene expression in vivo. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 788–795

Klinman D, Shirota H, Tross D, Sato T, Klaschik S. Synthetic oligonucleotides as modulators of inflammation. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 958–964

Klinman DM, Currie D, Gursel I, Verthelyi D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* 2004; 199: 201–216

Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon γ . *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1996; 93: 2879–2883

Knuefermann P, Baumgarten G, Koch A, Schwederski M, Velten M, Ehrentraut H, Mersmann J, Meyer R, Hoeft A, Zacharowski K, Grohe C. CpG oligonucleotide activates Toll-like receptor 9 and causes lung inflammation in vivo. *Respir Res* 2007; 8: 72

Knuefermann P, Schwederski M, Velten M, Krings P, Ehrentraut H, Rudiger M, Boehm O, Fink K, Dreiner U, Grohe C, Hoeft A, Baumgarten G, Koch A, Zacharowski K, Meyer R. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 26–35

Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709–760

Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev* 2007; 220: 251–269

Krieg AM. Antiinfective applications of toll-like receptor 9 agonists. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 289–294

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

Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α/β in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001a; 31: 2154–2163

Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001b; 31: 3026–3037

Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Cheang M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34: 1589–1596

Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor α and interleukin 1 β are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183: 949–958

Kuznik A, Bencina M, Svajger U, Jeras M, Rozman B, Jerala R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J Immunol* 2011; 186: 4794–4804

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; 5: 190–198

Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3761–3766

Leeper-Woodford SK, Carey PD, Byrne K, Jenkins JK, Fisher BJ, Blocher C, Sugerman HJ, Fowler AA. Tumor necrosis factor. α and β subtypes appear in circulation during onset of sepsis-induced lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 1076–1082

Lehmann V, Freudenberg MA, Galanos C. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. *J Exp Med* 1987; 165: 657–663

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

Lenert PS. Classification, mechanisms of action, and therapeutic applications of inhibitory oligonucleotides for Toll-like receptors (TLR) 7 and 9. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 986-996

Lenert P, Goeken AJ, Ashman RF. Extended sequence preferences for oligodeoxyribonucleotide activity. *Immunology* 2006; 117: 474–481

Lenert P, Yasuda K, Busconi L, Nelson P, Fleenor C, Ratnabalasuriar RS, Nagy PL, Ashman RF, Rifkin IR, Marshak-Rothstein A. DNA-like class R inhibitory oligonucleotides (INH-ODNs) preferentially block autoantigen-induced B-cell and dendritic cell activation in vitro and autoantibody production in lupus-prone MRL-Fas(lpr/lpr)mice in vivo. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R79

Lentsch AB, Ward PA. Regulation of experimental lung inflammation. *Respir Physiol* 2001; 128: 17–22

Lewandowski K, Lewandowski M. Epidemiology of ARDS. *Minerva Anestesiol* 2006; 72: 473–477

Lewis MD, Pfeil J, Mueller AK. Continuous oral chloroquine as a novel route for Plasmodium prophylaxis and cure in experimental murine models. *BMC Res Notes* 2011; 4: 262

Li J, Ma Z, Tang ZL, Stevens T, Pitt B, Li S. CpG DNA-mediated immune response in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: L552-558

Li J, Song W, Czerwinski DK, Varghese B, Uematsu S, Akira S, Krieg AM, Levy R. Lymphoma immunotherapy with CpG oligodeoxynucleotides requires TLR9 either in the host or in the tumor itself. *J Immunol* 2007; 179: 2493–2500

Lipford GB, Sparwasser T, Bauer M, Zimmermann S, Koch E, Heeg K, Wagner H. Immunostimulatory DNA: Sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3420–3426

Lipford GB, Sparwasser T, Zimmermann S, Heeg K, Wagner H. CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses. *J Immunol* 2000; 165: 1228–1235

Lohner R, Schwederski M, Narath C, Klein J, Duerr GD, Torno A, Knuefermann P, Hoeft A, Baumgarten G, Meyer R, Boehm O. Toll-like receptor 9 promotes cardiac inflammation and heart failure during polymicrobial sepsis. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 261049

Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, Aardal S, Thorsteinsson A, Frostell CG, Bonde J. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1849–1861

Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 198: 513–520

Macfarlane DE, Manzel L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol* 1998; 160: 1122–1131

Malik AB. Endothelial cell interactions and integrins. *New Horiz* 1993; 1: 37–51

Marik PE, Varon J. Sepsis: state of the art. *Dis Mon* 2001; 47: 465–532

Marshak-Rothstein A, Busconi L, Lau CM, Tabor AS, Leadbetter EA, Akira S, Krieg AM, Lipford GB, Viglianti GA, Rifkin IR. Comparison of CpG s-ODNs, chromatin immune complexes, and dsDNA fragment immune complexes in the TLR9-dependent activation of rheumatoid factor B cells. *J Endotoxin Res* 2004; 10: 247–251

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546–1554

Martinet Y, Menard O, Vaillant P, Vignaud JM, Martinet N. Cytokines in human lung fibrosis. *Arch Toxicol Suppl* 1996; 18: 127–139

Matsuda N, Hattori Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci* 2006; 101: 189–198

Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T. Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 147–154

Mayer AK, Muehmer M, Mages J, Gueinzus K, Hess C, Heeg K, Bals R, Lang R, Dalpke AH. Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 2007; 178: 3134–3142

Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R, Leeper K. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 β and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest* 1995a; 107: 1062–1073

Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest* 1995b; 108: 1303–1314

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA Jr. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998; 2: 253–258

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

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Self-defense: the fruit fly style. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 429–430

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343: 338–344

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296: 298–300

Meisner M. Biomarkers of sepsis: clinically useful? *Curr Opin Crit Care* 2005; 11: 473–480

Meng W, Yamazaki T, Nishida Y, Hanagata N. Nuclease-resistant immunostimulatory phosphodiester CpG oligodeoxynucleotides as human Toll-like receptor 9 agonists. *BMC Biotechnol* 2011; 11: 88

Miakotina OL, Snyder JM. TNF- α inhibits SP-A gene expression in lung epithelial cells via p38 MAPK. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L418-427

Miller EJ, Cohen AB, Matthay MA. Increased interleukin-8 concentrations in the pulmonary edema fluid of patients with acute respiratory distress syndrome from sepsis. *Crit Care Med* 1996; 24: 1448–1454

Mizock BA. The multiple organ dysfunction syndrome. *Dis Mon* 2009; 55: 476–526

Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF α in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* 2006; 7: 125

Mutwiri GK, Nichani AK, Babiuk S, Babiuk LA. Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *J Control Release* 2004; 97: 1–17

Nadigel J, Prefontaine D, Baglolle CJ, Bourbeau J, Maltais F, Eidelman DH, Hamid Q. Cigarette smoke increases TLR4 and TLR9 expression and induces cytokine production from CD8+ T cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2011; 12: 149

Neumann FJ, Ott I, Marx N, Luther T, Kenngott S, Gawaz M, Kotzsch M, Schomig A. Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3399–3405

Niederman MS, Fein AM. Sepsis syndrome, the adult respiratory distress syndrome, and nosocomial pneumonia. A common clinical sequence. *Clin Chest Med* 1990; 11: 633–656

Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 2001; 16: 83–96

Opal SM. Concept of PIRO as a new conceptual framework to understand sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6: 55

Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol* 2006; 177: 1967–1974

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder 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 U.S.A* 2000; 97: 13766–13771

Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009; 227: 221–233

Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993; 328: 1471–1477

Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005; 560: 11–18

Patel SJ, Jindal R, King KR, Tilles AW, Yarmush ML. The inflammatory response to double stranded DNA in endothelial cells is mediated by NF κ B and TNF α . *PLoS One* 2011; 6: e19910

Pawar RD, Ramanjaneyulu A, Kulkarni OP, Lech M, Segerer S, Anders HJ. Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1721–1731

Peter M, Bode K, Lipford GB, Eberle F, Heeg K, Dalpke AH. Characterization of suppressive oligodeoxynucleotides that inhibit Toll-like receptor-9-mediated activation of innate immunity. *Immunology* 2008; 123: 118–128

Petty TL. In the cards was ARDS: how we discovered the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 602–603

Phua J, Badia JR, Adhikari NK, Friedrich JO, Fowler RA, Singh JM, Scales DC, Stather DR, Li A, Jones A, Gattas DJ, Hallett D, Tomlinson G, Stewart TE, Ferguson ND. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 220–227

Piantadosi CA, Schwartz DA. The acute respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 2004; 141: 460–470

Picot S, Peyron F, Donadille A, Vuillez JP, Barbe G, Ambroise-Thomas P. Chloroquine-induced inhibition of the production of TNF, but not of IL-6, is affected by disruption of iron metabolism. *Immunology* 1993; 80: 127–133

Pisetsky DS, Reich C. Influence of backbone chemistry on immune activation by synthetic oligonucleotides. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 1981–1988

Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, Bals R. Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 2004; 173: 1219–1223

Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, Bamboat ZM, DeMatteo RP. Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 2008; 205: 1277–1283

Rankin R, Pontarollo R, Ioannou X, Krieg AM, Hecker R, Babiuk LA, van D. CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2001; 11: 333–340

Reim D, Rossmann-Bloeck T, Jusek G, Prazeres da Costa O, Holzmann B. Improved host defense against septic peritonitis in mice lacking MyD88 and TRIF is linked to a normal interferon response. *J Leukoc Biol* 2011; 90: 613–620

Reinhart K, Brunkhorst F, Bone H, Gerlach H, Grundling M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A, Peckelsen C, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Werdan K. Diagnose und Therapie der Sepsis: S2-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). *Der Internist* 2006; 4: 356-373

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

Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lippa P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2541–2550

Sands H, Gorey-Feret LJ, Ho SP, Bao Y, Cocuzza AJ, Chidester D, Hobbs FW. Biodistribution and metabolism of internally 3H-labeled oligonucleotides. II. 3',5'-blocked oligonucleotides. *Mol Pharmacol* 1995; 47: 636–646

Sasai M, Linehan MM, Iwasaki A. Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science* 2010; 329: 1530–1534

Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS. V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 359–383

Schottmüller W. Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verhandl dt Kongress Inn Med* 1914; 31: 257-280

Schuster DP. Identifying patients with ARDS: time for a different approach. *Intensive Care Med* 1997; 23: 1197–1203

Schütt C, Bröker B. Grundwissen Immunologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274: 17406–17409

Schwartz DA, Quinn TJ, Thorne PS, Sayeed S, Yi AK, Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *J Clin Invest* 1997; 100: 68–73

Sester DP, Naik S, Beasley SJ, Hume DA, Stacey KJ. Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. *J Immunol* 2000; 165: 4165–4173

Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 358–364

Sheridan BC, McIntyre RC, Meldrum DR, Fullerton DA. Pentoxifylline treatment attenuates pulmonary vasomotor dysfunction in acute lung injury. *J Surg Res* 1997; 71: 150–154

Shimosato T, Tohno M, Sato T, Nishimura J, Kawai Y, Saito T, Kitazawa H. Identification of a potent immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Streptococcus thermophilus* lacZ. *Anim Sci J* 2009; 80: 597–604

Shirota H, Gursel I, Gursel M, Klinman DM. Suppressible oligodeoxynucleotides protect mice from lethal endotoxic shock. *J Immunol* 2005; 174: 4579–4583

Silverstein R. D-galactosamine lethality model: scope and limitations. *J Endotoxin Res* 2004; 10: 147–162

Smith CW. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 1993; 71: 76–87

Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2045–2054

Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Borschert K, Hacker H, Heeg K, Wagner H. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature* 1997; 386: 336–337

Striebel HW. Operative Intensivmedizin: Sicherheit in der klinischen Praxis. Stuttgart: Schattauer, 2008

Strieter RM, Kunkel SL. Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils. *J Investig Med* 1994; 42: 640–651

Stunz L, Lenert P, Peckham DW, Yi AK, Haxhinasto S, Chang M, Krieg AM, Ashman RF. Inhibitory oligonucleotides specifically block effects of stimulatory CpG oligonucleotides in B cells. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1212–1222

Sun R, Sun L, Bao M, Zhang Y, Wang L, Wu X, Hu D, Liu Y, Yu Y, Wang L. A human microsatellite DNA-mimicking oligodeoxynucleotide with CCT repeats negatively regulates TLR7/9-mediated innate immune responses via selected TLR pathways. *Clin Immunol* 2010; 134: 262–276

Suzuki K, Suda T, Naito T, Ide K, Chida K, Nakamura H. Impaired toll-like receptor 9 expression in alveolar macrophages with no sensitivity to CpG DNA. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 707–713

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

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14

Takeuchi O., Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11: 443–451

Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 2000; 165: 5392–5396

Tasaka S, Kamata H, Miyamoto K, Nakano Y, Shinoda H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Hasegawa N, Fujishima S, Miyasho T, Ishizaka A. Intratracheal synthetic CpG oligodeoxynucleotide causes acute lung injury with systemic inflammatory response. *Respir Res* 2009; 10: 84

Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1988; 27: 6008–6013

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

Trieu A, Roberts TL, Dunn JA, Sweet MJ, Stacey KJ. DNA motifs suppressing TLR9 responses. *Crit Rev Immunol* 2006; 26: 527–544

Tsalik EL, Jagers LB, Glickman SW, Langley RJ, van V, Park LP, Fowler VG, Cairns CB, Kingsmore SF, Woods CW. Discriminative value of inflammatory biomarkers for suspected sepsis. *J Emerg Med* 2012; 43: 97-106

Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Braun GG, Radespiel-Troeger M. Predictive value of procalcitonin, interleukin-6, and C-reactive protein for survival in postoperative patients with severe sepsis. *J Crit Care* 2011; 26: 54–64

Tsujimoto H, Ono S, Matsumoto A, Kawabata T, Kinoshita M, Majima T, Hiraki S, Seki S, Moldawer LL, Mochizuki H. A critical role of CpG motifs in a murine peritonitis model by their binding to highly expressed toll-like receptor-9 on liver NKT cells. *J Hepatol* 2006; 45: 836–843

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 15107–15112

Vaschetto R, Protti A. Biomarkers of sepsis in long-term critically ill patients. *Minerva Anestesiol* 2010; 76: 771–772

Velten M, Duerr GD, Pessies T, Schild J, Lohner R, Mersmann J, Dewald O, Zacharowski K, Klaschik S, Hilbert T, Hoeft A, Baumgarten G, Meyer R, Boehm O, Knuefermann P. Priming with synthetic oligonucleotides attenuates pressure overload-induced inflammation and cardiac hypertrophy in mice. *Cardiovasc Res* 2012; 3: 422–432

Victoni T, Coelho FR, Soares AL, de Freitas A, Secher T, Guabiraba R, Erard F, de Oliveira-Filho RM, Vargaftig BB, Lauvaux G, Kamal MA, Ryffel B, Moser R, Tavares-de-Lima W. Local and remote tissue injury upon intestinal ischemia and reperfusion depends on the TLR/MyD88 signaling pathway. *Med Microbiol Immunol* 2010; 199: 35–42

Vollmer J. Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5: 673–682

Vollmer J. TLR9 in health and disease. *Int Rev Immunol* 2006; 25: 155–181

Vollmer J, Jurk M, Samulowicz U, Lipford G, Forsbach A, Wullner M, Tluk S, Hartmann H, Kritzler A, Muller C, Schetter C, Krieg AM. CpG oligodeoxynucleotides stimulate IFN- γ -inducible protein-10 production in human B cells. *J Endotoxin Res* 2004a; 10: 431–438

Vollmer J, Weeratna RD, Jurk M, Samulowicz U, McCluskie MJ, Payette P, Davis HL, Schetter C, Krieg AM. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology* 2004b; 113: 212–223

Wallace DJ. Antimalarials-the 'real' advance in lupus. *Lupus* 2001; 10: 385–387

Wang L, Jiang W, Ding G, Cao H, Lu Y, Luo P, Zhou H, Zheng J. The newly identified CpG-N ODN208 protects mice from challenge with CpG-S ODN by decreasing TNF- α release. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 646–655

Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342: 1334–1349

Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology* 2007; 212: 715–722

Weighardt H, Kaiser-Moore S, Vabulas RM, Kirschning CJ, Wagner H, Holzmann B. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection. *J Immunol* 2002; 169: 2823–2827

Weinacker AB, Vaszar LT. Acute respiratory distress syndrome: physiology and new management strategies. *Annu Rev Med* 2001; 52: 221–237

Werdan K, Schuster H, Müller-Werdan U. Sepsis und MODS. Heidelberg: Springer, 2005

Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997; 7: 837–847

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998; 101: 311–320

Yamada H, Gursel I, Takeshita F, Conover J, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita S, Klinman DM. Effect of suppressive DNA on CpG-induced immune activation. *J Immunol* 2002; 169: 5590–5594

Yamada H, Ishii KJ, Klinman DM. Suppressible oligodeoxynucleotides inhibit CpG-induced inflammation of the mouse lung. *Crit Care Med* 2004; 32: 2045–2049

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

Yasuda H, Leelahavanichkul A, Tsunoda S, Dear JW, Takahashi Y, Ito S, Hu X, Zhou H, Doi K, Childs R, Klinman DM, Yuen PS, Star RA. Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: F1050-F1058

Yi AK, Yoon H, Park JE, Kim BS, Kim HJ, Martinez-Hernandez A. CpG DNA-mediated induction of acute liver injury in D-galactosamine-sensitized mice: the mitochondrial apoptotic pathway-dependent death of hepatocytes. *J Biol Chem* 2006; 281: 15001–15012

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

Yi AK, Yoon JG, Hong SC, Redford TW, Krieg AM. Lipopolysaccharide and CpG DNA synergize for tumor necrosis factor- α production through activation of NF- κ B. *Int Immunol* 2001; 13: 1391–1404

Yu L, Chen S. Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 1271–1278

Zambon M, Vincent JL. Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time. *Chest* 2008; 133: 1120–1127

Zeuner RA, Ishii KJ, Lizak MJ, Gursel I, Yamada H, Klinman DM. Reduction of CpG-induced arthritis by suppressive oligodeoxynucleotides. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2219–2224

Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010; 464: 104–107

Zou W, Schwartz H, Endres S, Hartmann G, Bar-Shavit Z. CpG oligonucleotides: novel regulators of osteoclast differentiation. *FASEB J* 2002; 16: 274–282

7. Danksagung

Allen, die mich im Verlauf meiner Promotion begleitet und unterstützt haben, möchte ich auf diesem Wege herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Andreas Hoeft für die Überlassung des Themas, sowie Herrn Prof. Dr. med. Pascal Knüfermann für die freundliche, fachliche Betreuung und Ermöglichung dieser Arbeit.

Dr. med. Olaf Boehm für die hervorragende Betreuung, vor allem während der Erstellung meiner Promotionsarbeit.

Der Arbeitsgruppe, insbesondere Ralph Lohner, Dr. rer. nat. Stilla Frede, Dr. rer.nat. Markus Schwederski, Susanne Schulz für die Beratung, Einarbeitung in die Methoden und Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche.

Unserer Laborgruppe Maria van der Giet, Igor Lazarevitz und Verena Gielen für die gemeinsame arbeitsintensive Zeit in den Laborräumen und bei unseren Kaffeepausen mit auflockernden Unterhaltungen.

Jeannette Bastong für das fleißige Korrekturlesen der Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung und Motivation.