

**Die Rolle von Toll like Rezeptor 9 für die Entstehung einer  
pulmonalen Inflammation im Rahmen einer extrapulmonalen,  
polymikrobiellen Sepsis**

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

Jessica Inge Schleifer geb. Jahns  
aus Troisdorf  
2015

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Olaf Boehm
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. R. Meyer; Physiologie II

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.10.2015

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

*Für meine Eltern Ralf und Sabine Jahns,  
meine Schwester Carina und meine Großeltern.*



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	12
1.1 Sepsis	12
1.1.1 Definition der Sepsis	12
1.1.2 Epidemiologie der Sepsis	15
1.2 ARDS/ALI und Sepsis	16
1.3 Das Angeborene Immunsystem und die Pathogenese der Sepsis	17
1.3.1 Toll-like Rezeptor 9	20
1.3.2 Inflammatorische Zytokine	23
1.3.2.1 TNF- $\alpha$	23
1.3.2.2 IL-6	24
1.3.2.3 IL-1 $\beta$	24
1.3.2.4 IL-10	25
1.3.2.5 IFN- $\gamma$	25
1.3.3 Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS)	26
1.4 Pathophysiologie des ARDS/ALI	29
1.4.1.1 Entstehungstheorie des indirekten ARDS	30
1.5 Tiermodelle der Sepsis	33
1.5.1 CLP versus CASP	33
1.5.2 Krankheitsbeurteilung beim Versuchstier	34
1.6 Fragestellung und Zielsetzung	35
2. Material und Methoden	37
2.1 Versuchsablauf	37
2.2 Klinischer Score	40
2.3 Sepsisversuche <i>in vivo</i>	41
2.3.1 Versuchstiere	42
2.3.1.1 Genotypisierung der Toll-like Rezeptor 9 defizienten Tiere	43
2.3.2 <i>Colon ascendens Stent Peritonitis</i> (CASP)	48
2.3.3 SHAM-Operation	50
2.3.4 Präparation und Probengewinnung ohne Permeabilität- und Lungenfunktionsmessung	52
2.3.5 Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge	53
2.3.5.1 Intubation und Beatmung	54
2.3.5.2 Perfusion	56
2.3.6 Präparation zur isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge	57
2.4. Molekularbiologische und mikrobiologische Aufarbeitung der Proben	61
2.4.1 Mikrobiologie der Peritoneallavage	61
2.4.1.1 Herstellung der Agarplatten	62
2.4.2 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (RTqPCR)	62
2.4.2.1 Isolation der RNA und Konzentrationsbestimmung der RNA	63
2.4.2.2 cDNA-Synthese	64
2.4.2.3 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (RTq-PCR)	65

2.4.3	Durchflusszytometrie von Blut und BALF	67
2.4.4	Fluorescent Bead Immunoassay	69
2.4.5	Permeabilitätsbestimmung des Lungenparenchyms mittels HSA-ELISA	71
2.5	Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien	73
2.6	Statistische Auswertung	74
3.	Ergebnisse	74
3.1	Klinische Bewertung der Tiere	75
3.1.1	Der Klinische Score	75
3.1.2	Temperaturverlauf der Tiere	76
3.1.3	Temperaturverlauf und Klinischer Score	78
3.2	Intraperitoneale Bakterienfreisetzung	80
3.3	Systemische Inflammation	82
3.3.1	Zytokine im Serum	82
3.3.2	Zytokine und Klinischer Score	88
3.3.3	Entzündungszellen im Blut	93
3.4	Inflammation im Lungengewebe	96
3.4.1	Zytokinexpression im Lungengewebe	96
3.4.2	Entzündungszellen in der Bronchioalveolären Lavage	101
3.5	Lungenfunktionsparameter	104
4.	Diskussion	108
4.1	Interpretation und Diskussion der Ergebnisse	108
4.1.1	Verifizierung der polymikrobiellen Sepsis	108
4.1.1.1	Die klinische Bewertung der Versuchstiere	108
4.1.1.2	Intraperitoneale Bakterienfreisetzung	110
4.1.1.3	Systemische Inflammation	113
4.2.1	Auswirkung der polymikrobiellen Sepsis auf die Lunge und die Lungenfunktion	116
4.2.1.1	Inflammation im Lungengewebe	116
4.2.1.2	Lungenfunktion	118
4.3.1	Rolle von TLR9 für die pulmonale Inflammation nach CASP	120
4.4.1	Ist CASP das richtige Modell für indirektes ALI/ARDS?	122
5.	Zusammenfassung	123
6.	Literaturverzeichnis	125
7.	Danksagung	142

## Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	Aqua bidestillata, doppelt destilliertes Wasser
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP-1	Aktivatorprotein 1 (Transkriptionsfaktor)
APC	Allophycocyanin, fluoreszierendes Molekül zur Kopplung an Antikörper für die Durchflusszytometrie
ARDS	„Acute Respiratory Distress Syndrome“
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
BALF	Broncho-alveoläre Lavage Flüssigkeit
BHI Agar	„Brain–heart infusion“ Agar
C57BL/6	Wildtyp Mausstamm
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CASP	„Colon Ascendens Stent Peritonitis“
CD	„Cluster of differentiation“
cDNA	komplementäre DNA
CFU	Kolonie bildende Einheiten
CLP	Zökumligatur und -punktion
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CRP	C-reaktives Protein
CSIF	„Cytokine synthesis inhibitory factor“
Ct	„Threshold cycle“, Schwellenwertzykluszahl
DAMP	„Damage-associated molecular pattern“
DC	Dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Antikoagulation von Blutproben
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“

FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat, fluoreszierendes Molekül zur Kopplung an Antikörper für die Durchflusszytometrie
FSC	Vorwärtsstreulicht bei der Durchflusszytometrie
g	Erdschwerebeschleunigung: $g = 9,80665 \text{ m/s}^2$
G	Gauge, Maßeinheit für den Außendurchmesser einer Kanüle
G-CSF	Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GITC	Guanidinisoithiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HMGB 1	High Mobility Group Box Protein 1
HSA	Humanes Serum Albumin
HSP	Hitzeschockprotein
HZV	Herzzeitvolumen
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
IKK	I $\kappa$ B Kinase Komplex
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthetase
iODN	inhibitorische Oligonukleotide
IPSI	Intraperitoneale Stuhl Injektion
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulierender Faktor
KG	Körpergewicht
kPa	Kilopascal = 1000 Pascal, SI-Einheit des Drucks
KS	Klinischer Score
KS-SM	Klinischer Score für septische Mäuse
LODS	„Logistic organ dysfunction system“
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Wiederholungen, „Leucin rich repeats“
M-CLASS	„Mouse clinical assessment score for sepsis“
M-CSF	Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor



MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Min.	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule, Einheit des Drucks
MMR	Makrophagen Mannose Rezeptor
MODS	Multiples Organ Dysfunktions Syndrom, „Multiple organ dysfunction syndrome“
MR-proANP	„Midregional-proatrial natriuretic peptide“
mRNA	Messenger-RNA
MyD88	„myeloid differentiation factor 88“
N	Anzahl der pro Zeitpunkt und Gruppe untersuchten Tierproben, „number“
NFκB	„Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“
NK	Natürliche Killerzellen, Lymphozyten Population
nmol	Nanomol = $10^{-9}$ mol, SI-Einheit der Stoffmenge
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	„Nucleotide oligomerization domain“
NOS	Stickstoffmonoxid Synthethase
NYHA	New York Heart Associaton
ODN	Oligodesoxynukleotid
PaCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAMP	Pathogen-assoziierte Molekülmuster, „Pathogen associated microbial pattern“
PBS	“Phosphate buffered saline”
PCR	Polymerasekettenreaktion, „Polymerase chain reaction“
PCT	Procalcitonin
PE	Phycoerythrin, fluoreszierendes Molekül zur Kopplung an Antikörper für die Durchflusszytometrie
PELOD	„Pediatric logistic organ dysfunction“
PEMOD	„Pediatric multiple organ dysfunction“
PerCP	„Peridinin Chlorophyll Protein Complex“, fluoreszierendes Molekül zur Kopplung an Antikörper für die Durchflusszytometrie

PIRO	Akronym für „Predisposition“, „Insult“, „Response“, „Organ Failure“
PMN	Polymorphkernige Granulozyten
PRR	Mustererkennungsrezeptoren, „Pattern recognition receptor“
PSP	„Pancreatic stone protein“
PTX3	Pentraxin 3
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	„Reactive oxygen species“
RTqPCR	quantitative Realtime– Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion
sCD25	Löslicher CD 25, möglicher Sepsismarker
SCF	Stammzellefaktor
SDS	Dodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SEM	Standardfehler
SHAM	Schein operierte Gruppe, sham = engl. vorgetäuscht
SIGIRR	Kurzes, einzelnes Immunoglobulin IL-1-R- verwandtes Molekül
SIRS	„Systemic inflammatory response syndrome“
SOCS	Suppressor von Zytokin Signalübertragung, „Suppressor of cytokine signaling“
SOFA	Sequenzielle Organversagensbeurteilung
spp.	„Species pluralis“
SSC	Seitwärtsstreulicht bei der Durchflusszytometrie
ssDNA	Einzelstrang-DNA, „single-stranded DNA“
ssRNA	Einzelstrang-RNA, „single-stranded RNA“
TAK1	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ -aktivierte Kinase 1
TBE	Borsäure und EDTA Mischung
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helferzellen
TIR-Domäne	Toll-/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TIRAP	Toll-/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne enthaltenes Adapterprotein
TLR	Toll-like Rezeptor
TLR9-D	Toll-like Rezeptor 9 - defizient

TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNM	Tumor/ Lymphknoten/ Metastasen
TRAF-6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
TRAM	TRIF zugehöriges Adaptermolekül
TRIF	TIR-Domäne-enthaltendes IFN- $\beta$ -induzierendes Adaptermolekül
TSS	Toxisches Schocksyndrom
VILI	Ventilator induzierte Lungenschädigung
WT	Wildtyp

# 1. Einleitung

## 1.1 Sepsis

### 1.1.1 Definition der Sepsis

Das Verständnis und die heutige Definition von Sepsis reichen bis weit in die Geschichte zurück. Bereits der römische Chronist Aulus Cornelius Celsus und der griechische Arzt Galenos von Pergamon beschrieben die noch heute 5 gültigen Zeichen für einer Infektion mit *Rubor* (periphere Vasodilatation), *Calor* (Fieber), *Dolor* (Schmerz), *Tumor* (Schwellung durch erhöhte Gefäßpermeabilität) und *Functio laesa* (Organdysfunktion) (Vincent et al., 2013).

Der aktuelle Sepsisbegriff wurde 1992 auf der Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine festgelegt. Dort wurde Sepsis definiert als eine systemische Antwort auf eine Infektion, die Kriterien für das *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) erfüllt. SIRS wurde als neuer Begriff von der Konsensuskonferenz vorgeschlagen, da auch systemisch - entzündliche Reaktionen auf nicht-infektiöse Ereignisse sepsisähnliche Zustände auslösen können. Damit ein SIRS vorliegt, müssen mindestens zwei der 4 Variablen (Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz oder Leukozytenzahl) in nur geringem Ausmaß verändert sein (Tab. 1) (Bone et al., 1992).

Aus der Definition des SIRS folgten neue Probleme, da die Kriterien für ein SIRS so sensitiv gewählt waren, dass bis zu 90% aller Patienten einer Intensivstation von diesen erfasst wurden (Sprung et al., 2006), darunter auch viele Erkrankungen mit nicht-infektiösen Ursachen, wie Verbrennungen, schwere Traumata, Pankreatitis und Erkrankungen mit Ischämie und Reperfusion (Vincent et al., 2013). Weiterhin war festzustellen, dass sich die Krankheitsbilder SIRS und Sepsis oft schlecht voneinander abgrenzen lassen und eher fließend ineinander übergehen. Dies gab Anlass für eine erneute Konferenz 2001, die *International Sepsis Definitions Conference* (Levy et al., 2003), die aber keine wesentlichen Definitionsänderungen beschließen konnte. Dafür wurden weitere Parameter der Definition der Sepsis hinzugefügt, die zur Diagnosesicherung dienen sollen. Dazu gehören unter anderem das Erfassen von Gerinnungsstörungen, Erhöhungen des Kreatinins oder des Procalcitonins und das Vorliegen von hämodynamischer Instabilität.

Sielenkämper et al. (2005) beschrieben die Sepsis als „die systemische Reaktion des Organismus auf eine Infektion, wobei diese Reaktion von einer Vielzahl von Zelltypen, Mediatoren und Gerinnungsfaktoren getragen und moduliert wird. Die resultierenden Komplikationen bis zu Schock und Multiorganversagen werden als Auswirkungen dieser Reaktion des Organismus betrachtet, wobei die aus der initialen Immunantwort resultierenden Veränderungen auf makrovaskulärer (z. B. hyperdynamische Kreislaufphase) und mikrovaskulärer Ebene (Endothel- und Mikrozirkulationsschaden) sowie das Sauerstoffextraktionsdefizit auf Organebene als wichtige Größen in der pathophysiologischen Reaktionskette angesehen werden“.

**Tab. 1:** Dargestellt sind die Definitionen von SIRS, Sepsis, Schwerer Sepsis, Septischer Schock und MODS (Bone et al., 1992).

SIRS	Sepsis	Schwere Sepsis	Septischer Schock	MODS**
Systemisch-entzündliche Reaktion auf nicht-infektiöse Ereignisse, charakterisiert durch zwei oder mehr der folgenden Parameter: I. Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C II. Herzfrequenz > 90 /min III. Atemfrequenz > 20 /min oder $p_a\text{CO}_2$ < 32 mmHg IV. Leukozyten > 12.000 /mm <sup>3</sup> oder < 4.000 /mm <sup>3</sup> oder > 10 % unreife Formen	SIRS + Infektion	Sepsis + Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotension:  Laktatazidose, Azidose, Oligurie oder eine akute Änderung der Bewusstseinslage (ist aber nicht darauf beschränkt)	Sepsis mit Schock durch septische Hypotension* trotz adäquater Flüssigkeitsversorgung  Einsatz von positiv inotropen oder vasopressorischen Substanzen kann Hypotension verschleiern  *sept. Hypotension: < 90 mmHg <sub>sys</sub> oder Reduktion ≤ 40 mmHg vom Ausgangswert	Akutkranke, mit schwer veränderter Organfunktion  Homöostase kann nur noch durch Intervention aufrechterhalten werden  **Multiorgan-dysfunktions-syndrom

Die *International Sepsis Definitions Conference* entwickelte ein neues Stagingssystem für die Sepsis, das Progression und Prognose der Sepsis besser charakterisieren soll. In Anlehnung an die TMN-Klassifikation für maligne Tumoren, die eine recht genaue Stadieneinteilung erlaubt, wurde das PIRO-System für die Sepsis vorgeschlagen. Das Akronym PIRO steht für **P**rädisposition, krankheitsauslösende

Infektion, **R**eaktion auf die Infektion und **O**rgandysfunktion (Tab. 2). Die Entwicklung der PIRO-Klassifikation befindet sich noch im Aufbau, an vielen Punkten müssen noch Parameter identifiziert und validiert werden. Besonders schwierig zu charakterisieren ist die Reaktion des Wirts, die bisher von den biologischen Markern CRP, Procalcitonin und IL-6 erfasst wird (Harbarth et al., 2001; Hausfalter et al., 2002). Einen der genannten Biomarker allein als prognostischen Faktor für den Verlauf der Sepsis heranzuziehen, führt allerdings zu unbefriedigenden Ergebnissen in mehreren Studien (Lee et al., 2008). Einzig Procalcitonin zeigt in einigen Studien eine annehmbare Sensitivität und Spezifität als prognostischer Marker der frühen Sepsis (Clec'h et al., 2006). Aber auch hier gibt es bedeutende Unterschiede zwischen einzelnen Studien (Dorge et al., 2003). Die Komplexität der Sepsis wird wohl nur durch eine gemeinsame Betrachtung mehrerer Biomarker und physiologischer Parameter erfasst werden können.

Um diese Unzulänglichkeiten der bis *dato* verwendeten Biomarker zu umgehen, hat die Suche nach weiteren Biomarkern für die Sepsis in den letzten Jahren einen wesentlichen Stellenwert in der biomedizinischen Forschung eingenommen. Als mögliche Sepsismarker wurden hierbei u.a. identifiziert: pancreatic stone protein (PSP), löslicher CD25 (sCD25) (Llewelyn et al., 2013), Pentraxin 3 (PTX3), Midregional proadrenomedullin (MR-proADM) oder midregional-proatrial natriuretic peptide (MR-proANP) und viele mehr (Lichtenstern et al., 2012). Die intensive Diskussion über diese Sepsismarker und ihren prädiktiven Stellenwert dauert noch an (Lichtenstern et al., 2012). Zurzeit ist das Ausmaß der Organdysfunktion immer noch der wichtigste Faktor für die Prognose der Sepsis.

**Tab. 2:** Die Tabelle beschreibt das Klassifikationsschema PIRO für die Sepsis. Normaldruck: Status quo. Kursiv: möglicherweise zukünftig nutzbare Parameter zur besseren Klassifizierung des PIRO-Systems. MODS, *multiple organ dysfunction syndrome*; SOFA, *sepsis-related organ failure assessment*; LODS, *logistic organ dysfunction system*; PEMOD, *pediatric multiple organ dysfunction*; PELOD, *pediatric logistic organ dysfunction*; TLR, *Toll-like receptor*; TNF, *tumor necrosis factor*; IL, *interleukin*; LPS, *lipopolysaccharide*; SIRS, *systemic inflammatory response syndrome*; PCT, *procalcitonin*; HLA-DR, *human leukocyte antigen-DR*; PAF, *platelet-activating factor* (Levy et al., 2003).

<b>Prädisposition</b>	<b>Infektion</b>	<b>Reaktion</b>	<b>Organdysfunktion</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prämorbide Vorerkrankungen</li> <li>• Alter, Geschlecht</li> <li>• Kultureller Hintergrund</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kultur und Empfindlichkeit der Erreger</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SIRS</li> <li>• andere Sepsis-Formen</li> <li>• Schock</li> <li>• C-reaktives Protein (CRP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anzahl der versagenden Organe oder</li> <li>• Scores wie MODS, SOFA, LODS, PEMOD, PELOD</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Genetische Polymorphismen</i></li> </ul> <p><i>TLR, TNF, IL-1, CD14</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bestimmung mikrobiologischer Produkte</i></li> </ul> <p><i>LPS, Mannan, bakterielle DNA, Genprofile</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Marker für die aktive Inflammation oder eingeschränkte Reaktionsfähigkeit des Patienten</i></li> <li>• <i>Mögliche Therapie Ansätze</i></li> </ul> <p><i>PCT, IL-6, Protein C, TNF, PAF</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Dynamische Messung der zellulären Vorgänge</i></li> </ul> <p><i>Apoptose, Zellstress, Hypoxie</i></p>

### 1.1.2 Epidemiologie der Sepsis

Die Sepsis gehört nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen. In Deutschland stellt sie beispielsweise die dritthäufigste Todesursache mit 60.000 Todesfällen pro Jahr dar (Brunkhorst et al., 2006). Trotz der fortgeschrittenen Entwicklung in der Intensivmedizin konnte zwar die Gesamtmortalität der Sepsis leicht reduziert werden, dafür scheint aber insbesondere die Inzidenz weiter zuzunehmen. Dies hat eine amerikanische Langzeitstudie eindrücklich gezeigt, die Daten aus den Jahren von 1979 bis 2000 erfasste. 1979 wurden noch 164.072 Sepsis Fälle gezählt, 2000 bereits 659.935. (Martin et al., 2003). Eine aktuellere Studie zeigt sogar die Verdopplung der Hospitalisierungsrate der schweren Sepsis, innerhalb eines 11-jährigen Studienzeitraums (Dombrovskiy et al., 2007).

Diese steigende Inzidenz ist möglicherweise durch den demographischen Wandel und somit die Zunahme der Zahl älterer Patienten zu erklären, denn insbesondere Patienten über 65 Lebensjahren sind von einer Sepsis betroffen und weisen zudem ein schlechteres *Outcome* auf (Carbajal-Guerrero et al., 2013). Die steigende Bereitschaft, auch diese alten Patienten hochinvasiven Operationen zu unterziehen, wird in der Zukunft die Zahl der Sepsispatienten weiter zunehmen lassen. Hierzu tragen das häufig supprimierte Immunsystem der alten Patienten und die vermehrte Implantation von Körperfremdenmaterialien entscheidend bei. Auch die alarmierende Zunahme von multiresistenten Keimen wird die Inzidenz der Sepsis weiter erhöhen (Angus et al., 2001).

Die weiterhin hohe Mortalitätsrate für Sepsis von 48,4 % (Engel et al., 2007) auf deutschen Intensivstationen zeigt deutlich, dass dieses Krankheitsbild trotz intensivmedizinischer Maßnahmen weiterhin ein große Gefahr darstellt. Die schwere Sepsis mit einer Prävalenz von 11 % zeigt sogar eine Mortalitätsrate von 55,2 % (Engel et al., 2007). Aufgrund der Therapieintensivierung und der steigenden Inzidenz beansprucht die Sepsis in Deutschland geschätzt 30% des intensivmedizinischen Jahresbudgetes von etwa 1,77 Milliarden Euro (Graf et al., 2007).

## 1.2 ARDS/ALI und Sepsis

Die Sepsis steht im engen Zusammenhang mit dem *acute respiratory distress syndrom* (ARDS) und *acute lung injury* (ALI). Die heute benutzten Kriterien und Definitionen für ARDS und ALI wurden 1994 auf der *American - European Consensus Conference on ARDS* (Bernhard et al., 1994) festgelegt.

ARDS und ALI zeichnen sich demnach durch ihren akuten Beginn, bilaterale Infiltrate im Röntgen Thorax, einen Wedge Druck  $< 18$  mmHg oder keinen klinischen Hinweis auf eine linksatriale Hypertension aus. Es wird formal in Abhängigkeit vom Schweregrad der Hypoxämie zwischen ALI und ARDS unterschieden. Ein ALI liegt dann vor, wenn der Quotient des Sauerstoffpartialdruck zur inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (Horowitz Quotient)  $< 300$  ist. Ist der Quotient  $< 200$  handelt es sich um ein ARDS.

Die Inzidenz und die Mortalität der Erkrankung sind trotz großer Fortschritte in der Intensivmedizin, wie bei der Sepsis, weiterhin hoch. Die Metaanalyse mehrerer



Studien im Jahr 2008 ergab eine Mortalitätsrate von etwa 43 % mit großen Unterschieden in den einzelnen Studien zwischen 15 und 72 %. Die gleiche Analyse zeigte aber auch eine leichte Verbesserung der Gesamtmortalitätsrate von 1,1 % pro Jahr zwischen 1994 bis 2006 (Zambon und Vincent, 2008). In diesem Zusammenhang von großem Interesse ist der Anstieg der Inzidenz und der Mortalität mit dem Lebensalter der Patienten (Rubenfeld et al., 2005). In Zeiten des demographischen Wandels ist daher auch, wie bei der Sepsis mit einer Zunahme von ARDS/ALI zu rechnen.

Bei ARDS/ALI wird zwischen einer direkten und einer indirekten Erkrankung unterschieden, je nachdem, ob der Grund für das Lungenversagen eine primäre pathologische Veränderung am Lungengewebe ist, z. B. durch eine Pneumonie, Aspiration oder ob der Lungenschaden sekundär durch eine extrapulmonale Ursache entstanden ist, wie z. B. bei einer Sepsis, Trauma oder Schock (Perl et al., 2011). Patienten, die an einem ARDS erkranken, versterben in erster Linie nicht an ihrer Lungenerkrankung, einem primär respiratorischen Versagen, sondern an einer Sepsis und dem sich hieraus entwickelnden MODS (Tsushima et al., 2009).

Eisner et al. konnten bereits 2001 zeigen, dass aus der Kombination von ARDS/ALI und einer Sepsis eine ungünstige Kombination für das Outcome der betroffenen Patienten erwächst und daraus die höchste Mortalität resultiert (Eisner et al., 2001). Septische Patienten zeigten eine Sterblichkeitsrate von 43 %, Pneumonie oder Aspirations assoziiertes ARDS eine Letalitätsrate von 36,5 % und Traumapatienten eine Rate von 11 % (Eisner et al., 2001).

### **1.3 Das Angeborene Immunsystem und die Pathogenese der Sepsis**

Unser Immunsystem spielt für die Entstehung der Sepsis die entscheidende Rolle. Es kann zwar den Organismus durch „Fremd-Eigen“ Diskrimination vor Pathogenen effizient schützen, im Fall der Sepsis führt die Abwehrreaktion auf den exogenen Stimulus jedoch zu einer sich selbst amplifizierenden Inflammationskaskade, die schließlich den Wirt selbst schädigt. Die hierbei stattfindenden immunologischen und pathophysiologischen Vorgänge sind hoch komplex und bis *dato* noch nicht vollständig verstanden.

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Instanz der Immunantwort. Wesentliche zelluläre Bestandteile sind hierbei Makrophagen, Polymorphkernige Granulozyten (PMN), Mastzellen und Killerzellen (NK). Das adaptive Immunsystem hingegen unterstützt die angeborene Immunität im Falle seiner Aktivierung. Dies geschieht über die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, durch nicht antigenspezifische Rezeptoren (Janeway und Medzhitov, 2002). Das adaptive und das angeborene Immunsystem sind weitaus stärker miteinander verknüpft als ursprünglich angenommen. Es ist heute bekannt, dass das erworbene Immunsystem die schädigende Wirkung des nativen Immunsystems verstärken kann und eine wichtige Rolle in der Entstehung der Immunparalyse spielt (Hotchkiss et al., 2005; Shelley et al., 2003).

Gerade die Frühphase der Sepsis ist charakterisiert durch eine initial überschießende Reaktion des angeborenen Immunsystems auf invasive Mikroorganismen mit Freisetzung großer Mengen pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6. Diese hyperinflammatorische Phase wird ausgelöst durch von Mikroorganismen freigesetzten *pathogen-associated molecule patterns* (PAMP), wie beispielsweise Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäure, Flagellin, Bakterielle DNA und viele andere. Gleichzeitig werden bei Zellschädigung aber auch *Alarmine* freigesetzt. Sie haben die Wirkung von endogenen PAMP, die von der geschädigten Zelle freigesetzt werden können und das Immunsystem ebenfalls stimulieren (Bianchi et al., 2007; Celes et al., 2013; Janeway und Medzhitov, 2002). Heute werden diese Alarmine in Analogie zu den PAMP als *damage associated molecular pattern* (DAMP) bezeichnet. Die Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) des Körpers, *Toll-like Rezeptoren* (TLR), *Macrophage mannose receptor* (MMR) und andere, erkennen PAMP und die ebenfalls aktivierten DAMP und induzieren so die Immunantwort. Eigentlich wird diese inflammatorische Antwort durch intrazelluläre Signalwege, Antagonisten von pro-inflammatorischen Zytokinen, anti-inflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-10) und dem spezifischen Silencing proinflammatorischer Gene kontrolliert. Aus noch unverstandenen Gründen funktioniert dieses Kontrollsystem bei der Sepsis unvollständig und die notwendige Immunantwort des Körpers zur Bekämpfung des Pathogens wandelt sich in eine systemische inflammatorische Dysregulation, gekennzeichnet durch einen „Zytokinsturm“ (Celes et al., 2013).

Die mögliche Schädigung durch eine Sepsis wird zwar größtenteils von der Reaktion des Wirts auf das Pathogen bestimmt, dennoch ist der Mechanismus, mit dem der Keim die Immunantwort auslöst, von größter Bedeutung für einen möglichen Therapieansatz. In gramnegativen Keimen spielt das Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS), aus der äußeren Zellmembran, eine entscheidende Rolle für die Immunstimulation. Es bindet über einen sehr gut beschriebenen PRR, nämlich TLR4, und induziert hierüber eine Signaltransduktionskaskade mit konsekutiver Expression inflammatorischer Gene (Takeuchi et al., 1999). Grampositive Bakterien hingegen besitzen kein Endotoxin, dafür aber eine Zellwand aus Peptidoglykanen und Lipoteichonsäure, die zwar einzeln die angeborene Immunität nicht so stark stimulieren wie LPS aber in Kombination ebenfalls eine robuste pro-inflammatorische Reaktion induzieren. Lipoteichonsäure und Peptidoglykane werden dabei ebenfalls über TLR4, v.a. aber über TLR2 und andere Rezeptorsysteme, wie *Nucleotide oligomerization domain* (NOD), erkannt und es resultiert ebenfalls eine inflammatorische Antwort (Sukhithasri et al., 2013). Des Weiteren können grampositive Erreger potente Exotoxine bilden, die sehr schnell zu einem septischen Schock führen. Das bekannteste Beispiel ist hier das Toxische Schocksyndrom (TSS), das von Exotoxinen von *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus pyogenes* ausgelöst wird. Diese Exotoxine werden auch als Superantigene bezeichnet, da sie direkt an Rezeptoren des major histocompatibility complex (MHC)-II binden können und somit T-Zellen direkt aktivieren (Cohen et al., 2002). Sehr viele andere bakterielle Komponenten mit pro-inflammatorischer Wirkung wurden bereits beschrieben, wie z. B. verschiedene Zellwandfragmente und nichtmethylierte CpG-Sequenzen bakterieller DNA (Diacovich und Gorvel, 2010).

Interessanterweise wird die Sepsis in einigen Fällen nicht durch einen einzelnen Keim ausgelöst, sondern es sind zeitgleich unterschiedliche pathogene Keime nachweisbar. Eine solche polymikrobielle Infektion liegt etwa bei 8,5 % der Kreislaufinfektionen vor (Luzzaro et al., 2011) und stimuliert durch das Auftreten diverser PAMP auch unterschiedliche PRR bzw. TLR gleichzeitig, z. B. TLR2, TLR4 und TLR9. Polymikrobielle Infektionen treten typischerweise bei der abdominellen Sepsis auf und zeigen dann besonders schwere Krankheitsverläufe. In 30 % der Patienten

mit einem septischen Schock war die Ursache eine abdominelle Infektion (Hasper et al., 2009).

### 1.3.1 Toll-like Rezeptor 9

Toll-like Rezeptoren gehören wie schon im vorangegangenen Abschnitt beschrieben zur Familie der PRR und erfüllen damit eine wichtige Aufgabe, insbesondere für die schnelle Antwort des angeborenen Immunsystems.

Insgesamt wurden bisher 11 menschliche TLR beschrieben und zahlreiche spezifische Ligand-Rezeptor Interaktionen charakterisiert (Tab. 3). Da es sich bei den PRR um evolutionär alte Strukturen handelt, die auch schon in Insekten, wie der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* vorkommen (dort das Toll Protein, als Homolog zum humanen Toll-like Rezeptor), erkennen sie auch ätiologisch bedingt, nur hochkonservierte Ligandenstrukturen von Bakterien, Viren und Pilzen.

**Tab. 3:** Dargestellt sind die TLR und ihre natürlichen Liganden und Herkunftsorte. Tabelle nach Akira und Takeda, 2004.

Rezeptor	Ligand	Herkunft des Liganden
TLR 1	Lipopeptide / . Lösliche Faktoren	Bakterien, Mykobakterien, Neisseria meningitidis
TLR 2	Lipoproteine / Lipopeptide Peptidoglykan/ Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Zymosan und andere	Verschiedene Pathogene Gram-positive Bakterien Mykobakterien Pilze
TLR 3	dsRNA	Viren
TLR 4	LPS Taxol Fusion Protein und andere	Gram-negative Bakterien Pflanzen RS-Virus
TLR 5	Flagellin	Bakterien
TLR 6	Zymosan Lipoteichonsäure Diacyllipopeptide	Pilze Gram-positive Bakterien Mykoplasmen
TLR 7	ssRNA	Viren
TLR 8	ssRNA	Viren
TLR 9	CpG DNA	Bakterien, Viren
TLR 10	unbekannt	unbekannt
TLR 11	unbekannt	Uropathogene Bakterien

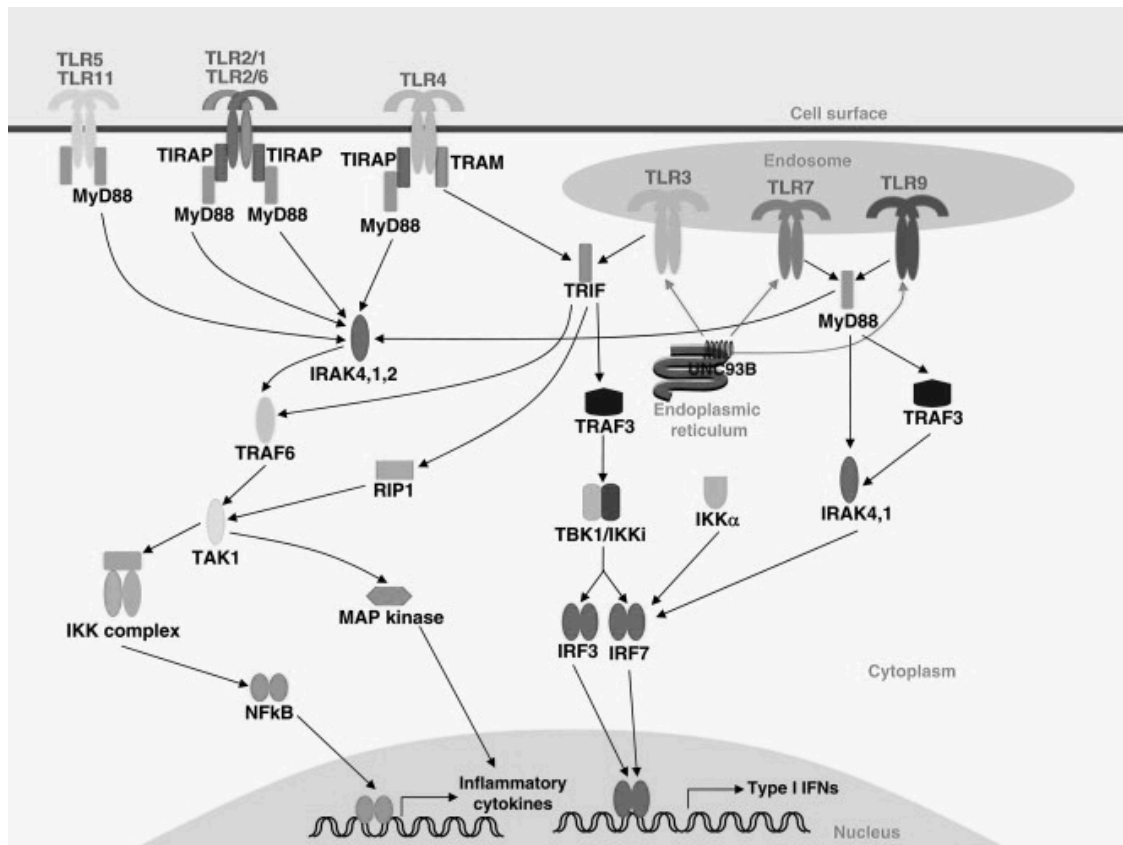
Toll-like Rezeptoren sind integrale Glykoproteine mit einem dreischichtigen Aufbau, die entweder in der Zellmembran liegen (TLR1, -2, -4, -5, und -6) oder in der Membran intrazellulärer Vesikel (TLR3, -7, -8 und -9). Extrazellulär liegt die N-terminale Domäne, die aus Leucinreichen Wiederholungen besteht (*Leucine rich repeats* LRR), die die PAMP erkennen (Lim und Staudt, 2013). Die intrazellulär gelegene C-Domäne weist Ähnlichkeiten zum IL-1-Rezeptor auf und wurde deshalb Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) genannt. Sie ist verantwortlich für die Aktivierung des weiteren Signalweges (Kumar et al., 2009).

Einige der TLR bilden Komplexe mit anderen Proteinen, um das Pathogen zu erkennen und die Signalkaskade zu aktivieren. TLR4 bildet beispielsweise ein Komplex mit CD14, MD-2 und dem PAMP LPS, TLR2 bildet Heterodimere mit TLR1 und TLR3 (Celes et al., 2013).

Die meisten TLR aktivieren die Signaltransduktion über das an die TIR-Domäne gebundene Adaptermolekül *myeloid differentiation primary response gene* (MYD)88 und enden in einer *nuclear factor* (NF) $\kappa$ B-abhängigen Induktion von inflammatorischen Zytokinen. Über den gleichen Weg werden auch die MAP Kinasen AP1 Transkriptionsfaktoren aktiviert, die ebenfalls die Transkription von inflammatorischen Zytokinen, Interferonen und Chemokinen induzieren. TLR4, -3 und -9 sind außerdem in der Lage, über andere Wege die Interferon regulierenden Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 zu aktivieren und so die Transkription von Typ 1 Interferonen zu initiieren (Kumar et al., 2009).

Die Stimulation von TLR führt also zur Bildung und Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, Prostaglandinen, Leukotrienen, Plättchenaktivierendem Faktor und anderen. Werden diese im Sinne des oben beschriebenen Zytokinsturms in großen Mengen ausgeschüttet, kann dies zu schweren systemischen Erkrankungen, wie dem septischen Schock führen (Celes et al., 2013). Physiologisch wird eine pro-inflammatorische Immunantwort durch ein inhibitorisches Regulationssystem kupiert, das gleichzeitig mit Aktivierung der TLR-abhängigen Signaltransduktion in Kraft gesetzt wird. Daran beteiligt sind *IL-1 receptor - associated kinase* (IRAK)-M, *suppressor of cytokine signalling* (SOCS)1, MyD88 short, *single immunoglobulin IL-1-R-related molecule* (SIGIRR) und ST2 (Akira und

Takeda, 2004). Als wichtigstes anti-inflammatorisches Zytokin wurde in diesem Zusammenhang IL-10 beschrieben (Iyer und Cheng, 2012). Ist der pro-inflammatorische Stimulus jedoch zu groß, ist die Feinregulation des komplexen Systems gestört: Die ebenfalls zu stark amplifizierte Inhibition führt zeitversetzt zur Immunparalyse mit deletären Folgen für den Wirt, wie z. B. einem unkontrollierten Bakterienwachstum (Celes et al., 2013; Osuchowski et al., 2006).



**Abb. 1:** Alle TLR außer TLR3 rekrutieren MyD88. TLR1, -2, -4 und -6 benötigen zusätzlich das Adapterprotein TIRAP und TLR4 auch noch den Adapter TRAM, der ihre TIR-Domäne mit MyD88 verbindet. TLR3 und -4 rekrutieren TRIF. Die Rekrutierung läuft in den meisten Fällen über eine Phosphorylierung der Enzyme, eine intrazellulär weit verbreitete Möglichkeit der Aktivierung (Travers et al., 2008). Werden dendritische Zellen oder Makrophagen mit TLR1, -2, -5, -9 oder -11 Liganden behandelt, so aktivieren sie den MyD88-abhängigen Signalweg, während TLR3 Liganden den TRIF-abhängigen Signalweg induzieren. TLR4 kann beide dieser Signalwege auslösen. Im MyD88-Signalweg mobilisiert MyD88 die IRAK Proteinfamilie und TRAF6. TRAF6 wiederum aktiviert TAK1. Das aktivierte TAK1 aktiviert dann den IKK Komplex, der die NFκB Untereinheit aktiviert und TAK1, das den MAP-Kinase-Signalweg einschaltet. Plasmazytoide dendritische Zellen mit TLR7 und -9 aktivieren NFκB und die MAP-Kinase via MyD88. MyD88 kann aber auch über die Rekrutierung von IRAK1 in Interaktion mit TRAF3 Typ 1 Interferone über IRF7 induzieren (Abbildung und Beschriftung nach Kumar et al., 2009).

### 1.3.2 Inflammatorische Zytokine

Wie beschrieben sind Zytokine besonders essentiell für die Pathophysiologie der Sepsis. Bei Zytokinen handelt es sich um Botenstoffe, die innerhalb des Organismus zwischen den Komponenten des Immunsystems und anderen Systemen des Körpers vermitteln und somit ein Netzwerk zur Regulation der Immunantwort bilden (Delves und Roitt, 2000).

Es ist zum Beispiel bekannt, dass Zytokine zur vermehrten Rekrutierung von Leukozyten am Ort der Infektion führen, indem sie die Zelladhäsion der neutrophilen Granulozyten gegenüber der Gefäßwand steigern und indirekt die Permeabilität der Blutgefäße erhöhen (Travers et al., 2008). Dies ist entscheidend für den Schutz des Organismus und zur Eradikation von Mikroorganismen. Die darauf folgende erhöhte Bildung von antimikrobiellen Produkten und weiteren inflammatorischen Mediatoren führt zur Produktion von Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen (Superoxide Anionen  $O_2^-$  und Stickstoffmonoxid NO), die die Zerstörung der Pathogene ermöglichen. Im ungünstigen Verlauf können diese aber zur Gewebeschädigung des Wirts und der weiteren Amplifikation der inflammatorischen Reaktion führen (Celes et al. 2013).

Osuchowski et al. haben gezeigt, dass erhöhte Plasmaspiegel von pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 u.a.) und anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10, löslicher TNF- $\alpha$  Rezeptor, IL-1 Rezeptor Antagonist) mit einer erhöhten Mortalität in den ersten 1-5 Tage der Sepsis einhergehen (Osuchowski et al., 2006). Eine frühe und überschießende inflammatorische Antwort korreliert demnach direkt mit der frühen Mortalität septischer Patienten.

#### 1.3.2.1 TNF- $\alpha$

Tumor-Nekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  wird von aktivierten Makrophagen als Antwort auf ein Pathogen oder eine Verletzung ausgeschüttet. Es ist ein wichtiger und potenter Mediator der lokalen und systemischen Inflammation. Lokale Ausschüttung von TNF- $\alpha$  verursacht die typischen klinischen Zeichen einer Inflammation mit Wärme, Schwellung, Schmerz und Rötung. Des Weiteren erhöht es die Migration von Phagozyten in das Gewebe und die Plättchenadhäsion an den Wänden der Blutgefäße. Dadurch werden lokal kleine Blutgefäße verschlossen und eine weitere Ausbreitung der Erreger verhindert (Travers et al., 2008; Tracey et al., 2002).

Bei einer systemischen Freisetzung führt TNF- $\alpha$  zu Gewebeschäden, durch ein verringertes Herzzeitvolumen als Folge einer inflammatorischen Kardiomyopathie (Girardin und Dayer, 1993; Muller-Werdan et al., 1998), mikrovaskuläre Thrombosen und Kapillarlecksyndrom (*capillary leak syndrome*, CLS) (Girardin and Dayer 1993). TNF verstärkt zudem die Freisetzung von Zytokinen durch andere Zellen, wie IL-1 und anderen Mediatoren, wie Eicosanoide, Stickoxide und reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS). Bei einer „erfolgreichen“ inflammatorischen Antwort sind Menge und Dauer der TNF Freisetzung limitiert und eine Resolution der Inflammation kann stattfinden (Tracey et al., 2002).

### **1.3.2.2 IL-6**

Interleukin-6 wird ebenfalls von aktivierten Makrophagen oder dendritischen Zellen in Reaktion auf bakterielle Produkte ausgeschüttet. Es hat entscheidende Aufgaben in der Immunregulation, der Inflammation, aber auch der Hämatopoese, der Onkogenese und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Kishimoto et al., 2010). Zuerst beschrieben wurde IL-6 als B-Zell stimulierender Faktor-2, da zunächst nur die B-Zell aktivierende Komponente des adaptiven Immunsystems bekannt war. Dabei wirkt es, wie heute bekannt, nicht nur auf B-Lymphozyten, in Form von Aktivierung und Steigerung der Antikörperproduktion, sondern aktiviert auch T-Lymphozyten (besonders T<sub>H</sub>17). Weiterhin induziert es in der Leber die Akut-Phase-Reaktion zusammen mit TNF und IL-1 $\beta$  und kann Fieber auslösen (Travers et al., 2008). Im Gegensatz dazu werden IL-6 aber auch anti-inflammatorische, beziehungsweise regenerative Eigenschaften zugeschrieben (Garbers et al., 2012).

### **1.3.2.3 IL-1 $\beta$**

Interleukin-1 $\beta$  gehört zur Familie der IL-1 Moleküle. Von den 10 beschriebenen Formen ist hierbei IL-1 $\beta$  das bekannteste und hat bereits Eingang in die klinische Anwendung gefunden (Dinarello et al., 2009). Auch bei IL-1 $\beta$  handelt es sich um ein hauptsächlich pro-inflammatorisch wirkendes Zytokin. Es moduliert die Inflammation dadurch, dass es das Überleben der T-Zellen unterstützt, IL-2 Rezeptoren auf Lymphozyten hochreguliert, die Antikörperproduktion von B-Zellen steigert und bei der Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen beteiligt ist (Lamkanfi et al., 2011). Hauptsächlich



wird IL-1 $\beta$  von Blutmonozyten, Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen gebildet (Krause et al., 2012).

#### **1.3.2.4 IL-10**

Interleukin-10 gilt als anti-inflammatorisches Zytokin, das die inflammatorische Antwort auf ein Pathogen begrenzen und so Gewebeschäden des Wirts verhindern kann. Als erste IL-10 sezernierende Zellen wurden T<sub>H</sub>2-Zellen entdeckt und IL-10 als *cytokine synthesis inhibitory factor* (CSIF) beschrieben (Fiorentino et al., 1989). Neben diesen T-Helferzellen sezernieren aber auch viele andere Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems IL-10. Dazu gehören im adaptiven Immunsystem neben den T-Zellen T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17, T-regulatorische Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auch B-Zellen. Im angeborenen Immunsystem können Makrophagen, Mastzellen, natürliche Killerzellen, Granulozyten und dendritische Zellen IL-10 sezernieren (Saraiva und O'Garra, 2010). Die Rolle von IL-10 bei einer Infektion wird kontrovers diskutiert. Einerseits scheint die Abwesenheit von IL-10 zu einer schnelleren Beseitigung des Pathogens aus dem Körper zu führen und verbessert die Überlebensrate, andererseits zeigen Studien, dass die Abwesenheit von IL-10 zu einer verlängerten Inflammation und letztendlich zum septischen Schock führt und somit die Sterblichkeit erhöht (Couper et al., 2008; Iyer und Cheng, 2012). Die überschießende Produktion von IL-10 kann auch in der anti-inflammatorischen Phase der Sepsis zu einer Immunsuppression führen und damit zu einer insuffizienten Infektionsabwehr und zum Tod des Patienten (Horner et al., 2004).

#### **1.3.2.5 IFN- $\gamma$**

Auch IFN- $\gamma$  ist ein wichtiger Mediator während der Sepsis. Ihm wird überwiegend eine essentiell regulatorische Komponente zugeschrieben, die besonders die Balance zwischen der Beseitigung der eingedrungenen Keime und den dabei entstehenden Gewebsschäden steuert (Hu und Ivashkiv, 2009). Gebildet wird IFN- $\gamma$  von Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems: Makrophagen, dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen (NK), zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) und T<sub>H</sub>1-Zellen (Sturge et al., 2013). Die ältere Bezeichnung von IFN- $\gamma$  als Makrophagenaktivierender-Faktor (Kelchtermans et al., 2008) impliziert bereits dessen starken

Einfluss auf diese Zellen: Hier wirkt der Mediator durch direkte Aktivierung antimikrobieller Mechanismen und Steigerung der Antigenpräsentation. Es moduliert aber auch die Differenzierung von T-Helferzellen und von regulatorischen T-Zellen (Schroder et al., 2004). IFN- $\gamma$  wird folglich zum Teil von den gleichen Zellen gebildet, auf die es letztendlich einwirkt. Das könnte besonders wichtig in der frühen Phase einer Infektion sein, wenn Makrophagen und NK ihre Toxizität gegen das Pathogen selbst verstärken, bevor T<sub>H</sub>1-Zellen die weitere Aktivierung unterstützen (Frucht et al., 2001).

IFN- $\gamma$  wirkt aber nicht nur aktivierend auf die Inflammation, sondern kann auch eine überschießende Reaktion durch Aktivierung von inhibitorischen Proteinen, wie beispielsweise IRF2 (*Interferon Regulatory Faktor 2*) und SOCS (*Suppressor of cytokine signaling*), regulieren (Saha et al., 2010).

### **1.3.3 Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS)**

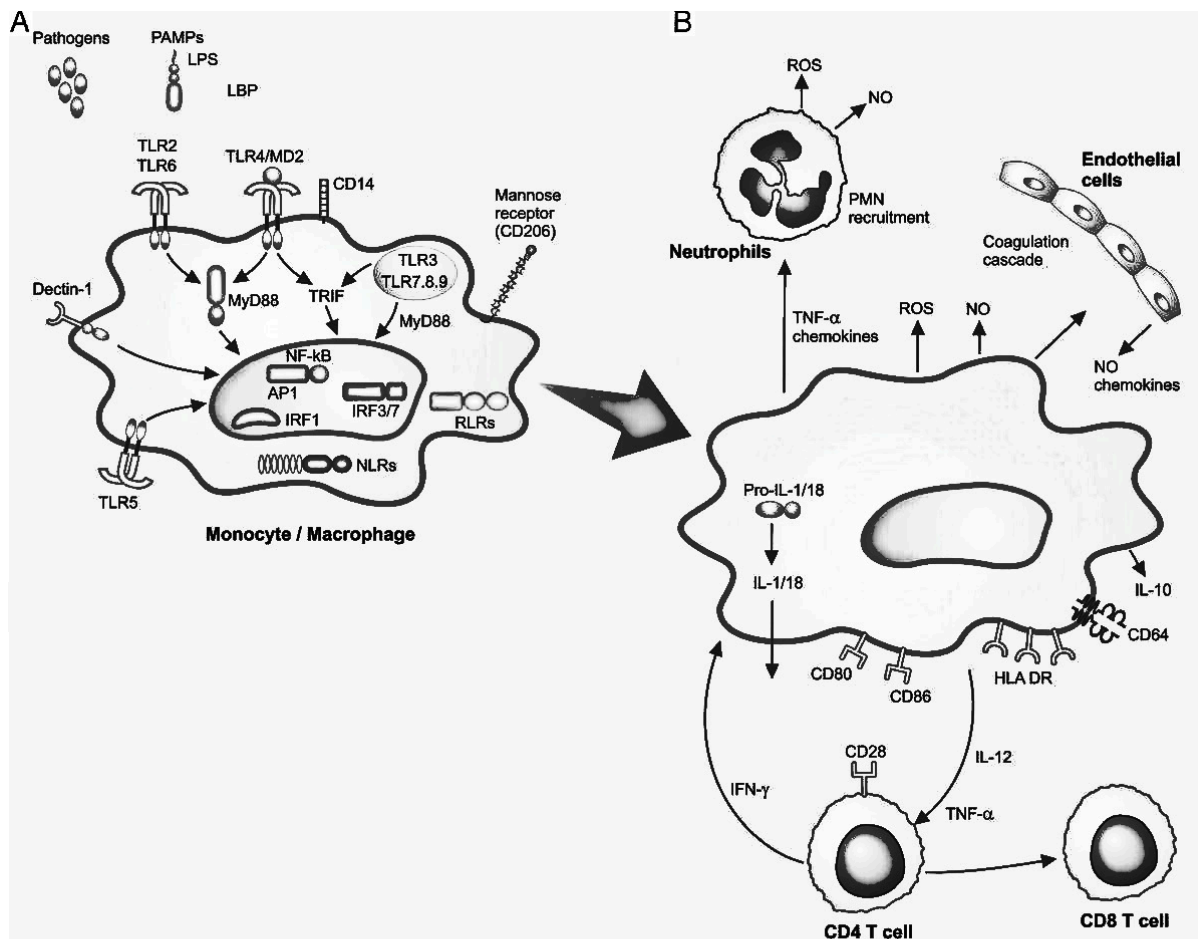
Die Stickstoffmonoxid Synthase (NOS) synthetisiert Stickoxid (NO), das eine entscheidende Rolle in der Entstehung diverser Organversagen im Rahmen einer Sepsis einnimmt. Als Substrat verwendet die NOS L-Arginin und katalysiert die Reaktion mit O<sub>2</sub> und NADPH zu L-Citrullin und NO (Kirkeboen und Strand, 1999).

NOS existiert in verschiedenen Isoformen der neuronalen (nNOS), endothelialen (eNOS) und der induzierbaren Isoform iNOS (Alderton et al., 2001). iNOS wird von vielen Zellen des Körpers gebildet, Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Endokard- und Myokardzellen und vielen mehr, besonders aber von den Zellen des Immunsystems (Makrophagen und Neutrophile) und kann durch inflammatorische Stimuli, wie bakterielle Produkte und Zytokine (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1), induziert werden (Feihl et al., 2001). Dabei führt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B zu einer vermehrten Expression von iNOS.

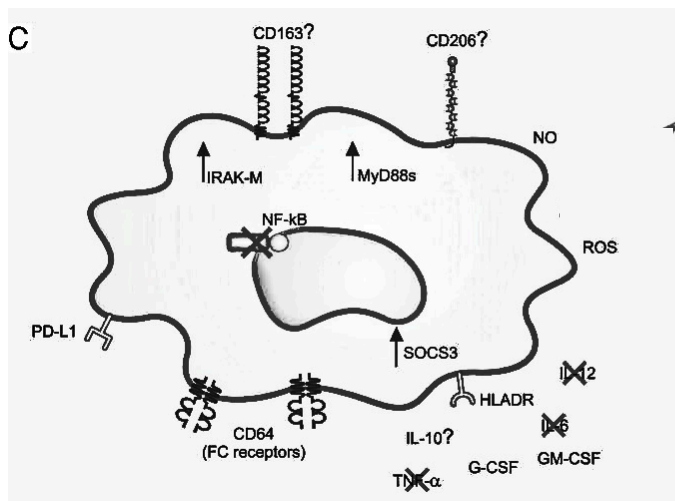
Das durch iNOS gebildete NO und seine Metabolite Nitrit und Nitrat sind hochreaktiv und haben verschiedenste Effekte auf die umliegenden Zellen und Gewebe. Auf Gefäßwände wirkt NO zum Beispiel vasodilatatorisch und im Blut hemmt es die Thrombozytenaggregation. Zudem kann NO zu einem potenten Oxidanz reagieren, mit starken zytotoxischen Effekten, wie der Hemmung der mitochondrialen Atmungskette (Vincent et al., 2000).

Es besteht Konsensus darüber, dass NO ein wichtiger Mediator bei der Entwicklung eines Organversagens darstellt (Feihl et al., 2001). Durch neue Untersuchungen wird postuliert, dass die Gewebhypoxie, die für die Entstehung des Sepsis - assoziierten Organversagens verantwortlich gemacht wird, weniger durch eine Sauerstoffunterversorgung des Gewebes induziert wird. Vielmehr wird von einer Sauerstoffverwertungsstörung der Zellen ausgegangen (Galley et al., 2011). Die entstehende mitochondriale Dysfunktion durch oxidativen Stress soll demzufolge eine entscheidende Rolle spielen. Zwar ist hierbei der genaue Mechanismus nicht vollständig verstanden, aber es konnte klar gezeigt werden, dass eine gesteigerte Produktion von NO und anderen Oxidanzien mit dem Zusammenbruch der Bereitstellung von Energiemetaboliten assoziiert ist. Aus der sich konsekutiv entwickelnden zellulären Dysfunktion entsteht schließlich klinisch ein mögliches Organversagen (Andrades et al., 2011).

In der Lunge konnte beispielsweise *in vitro* gezeigt werden, dass die vermehrte Bildung von NO durch die gesteigerte Expression von iNOS in Makrophagen zu einem direkten Schaden der pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen führt und so ein entscheidender Mechanismus für die Entstehung eines ALI/ARDS zu sein scheint (Wang et al., 2012).



**Abb. 2:** Monozyten Funktion während einer bakteriellen Sepsis. (A) Aktivierung zellulärer Signalkaskaden: das angeborene Immunsystem wird über die PAMP von Mikroorganismen aktiviert. PRR auf Makrophagen erkennen und binden PAMP und induzieren intrazellulär inflammatorische Signaltransduktionswege. (B) Ausbildung der Immunreaktion: Zum Abtöten der Mikroorganismen bilden die nun aktivierten Makrophagen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und NO. Weiterhin synthetisieren sie Mediatoren, die Lymphozyten aktivieren (z. B. TNF- $\alpha$  und IL-12), Neutrophile rekrutieren (z. B. TNF- $\alpha$ ) und Epithelzellen aktivieren. Synergistisch dazu wirkt die Amplifikation von HLA-Rezeptoren und ihren Co-Rezeptoren, wie CD80 und CD86, auf der Zelloberfläche der aktivierten Makrophagen. All dies kann, wenn systemisch auftretend, die typischen Sepsissymptome verursachen. Abbildung und Beschriftung: Salomao et al., 2012.



**Abb. 3:** Monozyten Funktion während einer bakteriellen Sepsis. (C) Kontrolle der Inflammation: Makrophagen reduzieren zum einen die Effizienz der T-Zell Aktivierung durch verminderte Expression von HLA-Rezeptoren und der gesteigerten Expression von inhibitorischen Corezeptoren (z. B. PD-L1) und zum anderen reduzieren sie die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine. Dabei behalten sie die Fähigkeit zur Phagozytose und Tötung von Mikroorganismen über den Fc-Rezeptor (CD64) und die Bildung von ROS und NO. Diese Phase kann die Rückkehr zur natürlichen Homöostase im Falle einer spontanen Kontrolle der Infektion, einer erfolgreichen antimikrobiellen Therapie und/oder die Genesung der zugrundeliegenden Krankheit darstellen. Sie kann aber auch nach zu starker Induktion in eine Immundepression münden mit Versagen der antimikrobiellen Therapie und einem anhaltenden Organversagen. Dann führt die verringerte Zahl proinflammatorisch wirkender Makrophagen zur Verschlechterung der bakteriellen Clearance und zur besonderen Anfälligkeit gegenüber einer neuen oder wiederaufflammenden Infektion. Abbildung und Beschriftung: Salomao et al., 2012.

#### 1.4 Pathophysiologie des ARDS/ALI

Die genaue Pathophysiologie des ARDS ist weiterhin nicht vollständig verstanden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass insbesondere bakteriell verursachte Erkrankungen und die durch die angeborene Immunität vermittelten, inflammatorischen Prozesse von großer Bedeutung sind. Die Aktivierung von PRR (TLR und andere) im Lungengewebe wird als bedeutende Antriebsquelle der Lungeninflammation aufgefasst. Zu Schäden am Lungengewebe kommt es durch die Freisetzung zytotoxischer Substanzen aus den dadurch aktivierten Gewebsmakrophagen und den einwandernden neutrophilen Granulozyten, insbesondere durch Proteasen, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (Matthay et al., 2012). Die gesteigerte Permeabilität der Blutgefäße, ausgelöst durch Entzündungsmediatoren (Zytokine, NO etc.), führt zur Ausbildung eines Lungenödems. Man bezeichnet dieses

Stadium auch als exsudative Phase. Des Weiteren laufen fibroproliferative Prozesse mit Ausbildung einer alveolären hyalinen Membran und interstitieller Fibrose ab, die die Lungenfunktion weiter einschränken können. All diese Veränderungen lassen sich histopathologisch bei Patienten mit ALI/ARDS nachweisen (Ware et al., 2000).

Durch diese pathologischen Prozesse verringert sich die Gasaustauschfläche und der Diffusionsweg für den Gasaustausch wird verlängert. Dies resultiert in schwerer arterieller Hypoxie und verminderter CO<sub>2</sub> Elimination.

Genau wie bei der Sepsis scheint es sich um eine Imbalance zwischen der Eradikation der Pathogene auf der einen Seite und dem „Kollateralschaden“ am Gewebe auf der anderen Seite zu handeln (Matthay et al., 2012).

#### **1.4.1 Entstehungstheorie des indirekten ARDS**

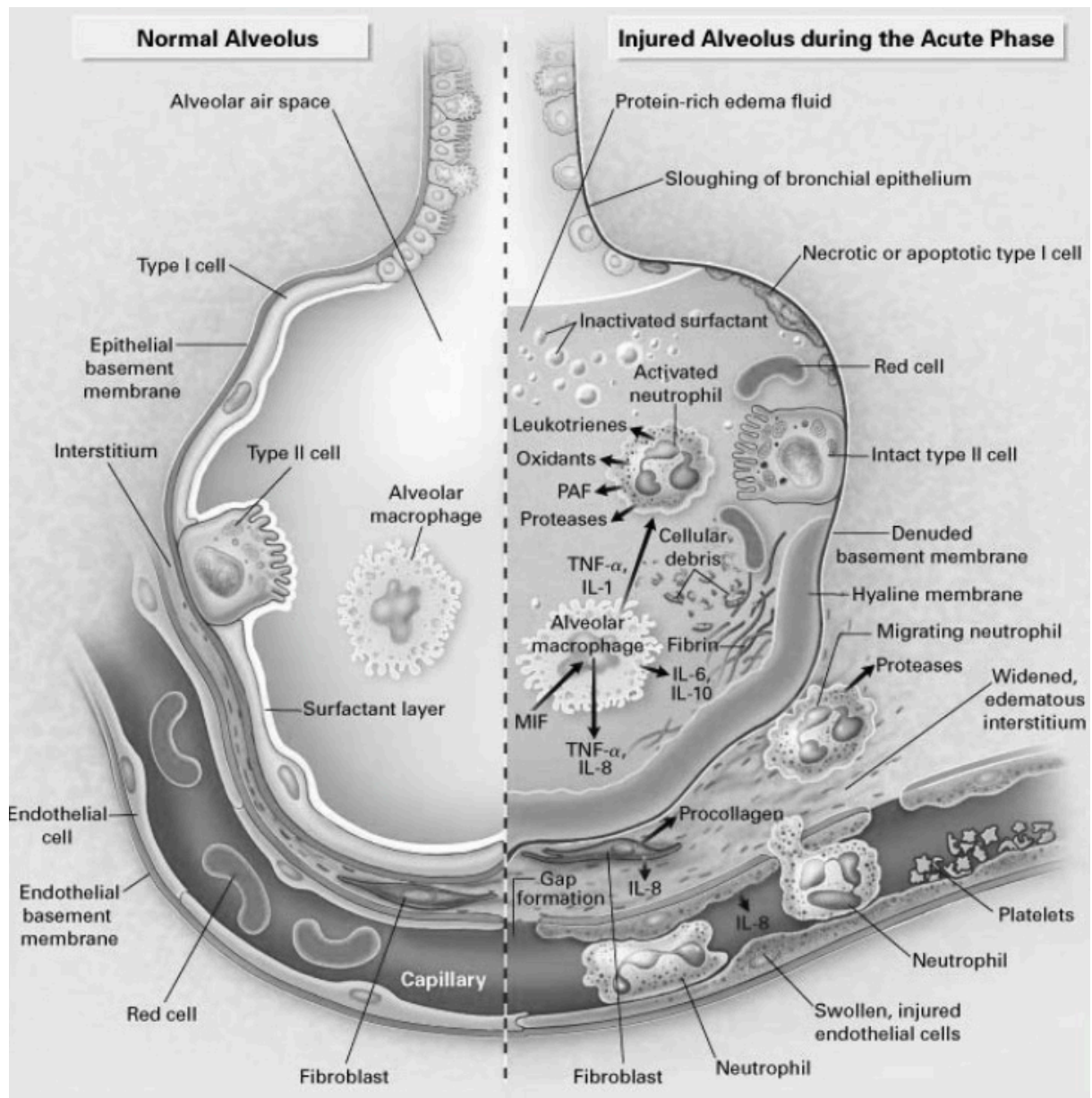
Beim indirekten ALI/ARDS wird ein anderer Auslösemechanismus, als der direkte Einfluss des Pathogens auf die Zellen des Lungengewebes und die damit verbundene Immunreaktion postuliert: Die pathologischen Lungenveränderungen entstehen hier vielmehr auf dem Boden einer systemischen Erkrankung wie z. B. einer Sepsis, einer schweren Verbrennung, eines hypovolämischen Schocks oder eines Transfusionssyndroms (Willson und Notter, 2011). Die unterschiedlichen Entitäten münden hier dann alle im Syndrom des Lungenversagens. Es muss demnach extrapulmonale Mediatoren geben, die in der Lage sind, solche Veränderungen an der Lunge herbeizuführen. Hohe Spiegel an Zytokinen und die massive Rekrutierung von Granulozyten aus dem Knochenmark sind kennzeichnend für die Sepsis (Drifte et al., 2013). Sie könnten deswegen auch die entscheidenden Auslösefaktoren für ein ARDS sein.

Auch die vaskulären Endothelzellen der Lungengefäße scheinen einen wichtigen Einfluss zu haben, was bereits 1984 von Stevens et al. in einem Review 1984 zusammengefasst wurde (Stevens und Raffin, 1984).

Das Lungengewebe besitzt eine sehr große immunogene Oberfläche: zum einen das große Netz aus Alveolen, das für eine möglichst große Gasaustauschfläche sorgt und zum anderen das große Kapillarnetzwerk mit zahlreichen intraalveolären Segmenten, das den effizienten Gasaustausch über möglichst geringe Diffusionsstrecken gewährleistet (Raghavendran et al., 2011).

Granulozyten werden im Lungengewebe vor allem in pulmonalen Kapillaren gespeichert und enthalten in etwa 50 Mal mehr Granulozyten im Vergleich zu andern Gefäßbetten (Perl et al., 2011). Einerseits steht den vermehrt vorhandenen Granulozyten eine sehr breite Eintrittsfläche ins Gewebe zur Verfügung und andererseits ist der Weg bis in das funktionelle Gewebe, d.h. die Alveolen, sehr kurz. Eine hohe Anzahl an neutrophilen Granulozyten wird bei Patienten mit ARDS in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit gefunden und ihre Anzahl korreliert mit einem schlechten Gasaustausch und einer erhöhten Permeabilität für Proteine (Geerts et al., 2001).

Hinzu kommt, dass die große Anzahl an vaskulären Endothelzellen auf einen inflammatorischen Stimulus, wie zum Beispiel auf pro-inflammatorische Zytokine aus neutrophilen Granulozyten (Wang et al., 2013), mit der Expression von Thromboplastin und Von-Willebrand-Faktor reagieren und die Blutgerinnung aktivieren (Scarpati und Sadler, 1989). Vasoaktive Substanzen erhöhen die pulmonal-vaskuläre Resistance ebenfalls, was zu einer pulmonalen Hypertension führen kann (Perl et al., 2011). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Priming und die Aktivierung von Epithelzellen, Endothelzellen und Immunzellen durch die systemische Inflammation und ihre Mediatoren beim indirekten ARDS eine besonders große Rolle spielt. Die Lunge mit ihrer erwähnten großen immunogenen Oberfläche ist hier besonders vulnerabel.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der pulmonären Inflammation. Links gesunde Alveole und rechts Alveole in der akuten Phase des ALI. Die von Granulozyten freigesetzten Oxidanzien und Proteasen führen zu einer Schädigung der Pneumozysten, zu deren Nekrose oder Apoptose und zu einer freiliegenden Basalmembran, auf der sich eine hyaline Membran abgelagert. Die Alveole ist gefüllt mit einem proteinreichen Ödem, das durch eine erhöhte Permeabilität der mikrovaskulären Lungengefäße ausgelöst wird und zur Inaktivierung von Surfactant führt. Die Permeabilitätssteigerung wird ihrerseits durch die gebildeten pro-inflammatorischen Zytokine und NO-Metaboliten begünstigt. Die aktivierten vaskulären Epithelzellen unterstützen zudem die Einwanderung neutrophiler Granulozyten durch Ausbildung spezieller Oberflächenrezeptoren. Die eingewanderten neutrophilen Granulozyten unterhalten wiederum die Inflammation durch Ausschüttung weiterer, potentiell schädlicher Mediatoren (Abbildung und Beschriftung nach Ware et al., 2000).



## 1.5 Tiermodelle der Sepsis

Die Erforschung der Sepsis und ihrer zugrundeliegenden Pathophysiologien muss häufig auf *in vivo* Modelle im Versuchstier zurückgreifen, da viele *in vitro* Ansätze die Komplexität der Inflammation, der umfassenden Immunreaktion und Gewebeschädigung nur ungenau und unvollständig abbilden.

Seit Mitte des 20. Jahrhunderts wurden verschieden Modelle zur Simulation einer Sepsis entwickelt, u.a. die Endotoxin Injektion mit Lipopolysacchariden (LPS), über Injektionen von Mikroorganismen, zu Implantation von Stuhlproben in unterschiedliche Gewebe bis hin zu Peritonitis-Modellen mit Störung der gastrointestinalen Barriere, im *cecal ligation and puncture* (CLP) und *colon ascendens stent peritonitis* (CASP) Modell, mit unterschiedlichsten Vorzügen und Nachteilen (Deitch et al., 2005; Wichterman et al., 1980).

### 1.5.1 CLP versus CASP

Die Peritonitis-induzierenden Sepsismodelle sind die häufig genutzten Ansätze zur Analyse einer systemischen bakteriell induzierten Inflammation. In diesem Rahmen haben sich insbesondere die CLP und die CASP durchgesetzt, denn sie spiegeln am ehesten den klinischen Verlauf während der Sepsis wider, wie z. B. die Verschlechterung des Allgemeinzustandes, eine Bakteriämie, frühe hyperdynamische- und späte hypodynamische Phase und hohe Sterblichkeitsraten (Deitch et al., 2005; Nemzek et al., 2008).

Die 1998 von Zantl etablierte CASP-Operation (Zantl et al., 1998) stellt eine Weiterentwicklung des schon 1980 durch Wichterman et al. beschriebenen CLP-Modells dar (Wichterman et al., 1980).

Bei der CLP wird das Zökum der Versuchstiere bei offener Laparotomie ligiert und anschließend mit einer Nadel einfach oder mehrfach punktiert. Die Tiere entwickeln im Verlauf eine schwere Infektion und versterben nach 24 bis 48 Stunden. Dabei kann die Mortalitätsrate durch die Größe der Nadel und der Anzahl der Punktionen beeinflusst werden (Deitch et al., 2005). Durch die Ausbildung eines Abszesses wird die Entzündungsreaktion allerdings häufig lokal begrenzt und erst die Nekrose des Zökums und die damit auftretende abrupte, massive Freisetzung von Bakterien bedingt die hohe Mortalität (Maier et al., 2004). Im CASP Modell hingegen wird eine

ständige Verbindung zwischen Bauchhöhle und Gastrointestinaltrakt über einen eingenähten Stent geschaffen. Die dadurch kontinuierlich freigesetzte Bakterienmenge aus dem Zökum der Tiere führt zu einer im Verlauf stärker ansteigenden Bakteriämie, sowohl im Peritoneum, als auch im Blut bis zum Erreichen eines Plateaus (Nemzek et al., 2008). Begleitend werden eine stärkere Induktion der Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-1 (Buras et al., 2005) im Serum im Vergleich zum CLP Modell beobachtet. Über die Größe des eingebrachten Stents kann zudem die Mortalitätsrate beeinflusst werden. Ein 14 G Stent führt zu einer Mortalitätsrate von 100 % in 48 h, wohingegen ein 18 G Stent eine 68%ige und ein 22 G Stent eine 38%ige Mortalitätsrate aufweisen (Nemzek et al., 2008; Zantl et al., 1998).

### **1.5.2 Krankheitsbeurteilung beim Versuchstier**

Eine fundierte Krankheitsbeurteilung der Versuchstiere ist nicht nur eine ethische Entscheidung, um einen *human endpoint* im Experiment festzulegen. Gerade in Sepsismodellen ist es essentiell für die Auswertung der durchgeführten Versuche, den Schweregrad der Sepsis festhalten zu können, um milde und schwere Krankheitsverläufe besser vergleichen zu können. Die Beurteilung des Krankheitsgrades der Versuchstiere ist dabei bisher nicht standardisiert und es kann auf viele verschiedene Beurteilungsmöglichkeiten zurückgegriffen werden. In der Tumorforschung stellt ein starker Verlust der Körpermaße ein wichtiges Euthanasiekriterium für Versuchstiere dar (Workman et al., 2010). Viele weitere Kriterien wurden festgehalten, die Leid, Schmerz oder eine konsumierende Erkrankung der Labormäuse beschreiben. Dazu zählen besonders klinische Erscheinungen, die insgesamt den verschlechterten Allgemeinzustand der Tiere abbilden, wie ungepflegtes Fell, ungewöhnliche Bewegungen, verändertes Verhalten von Aggressivität bis Lethargie, Stopp der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme und viele mehr (Gebhart et al., 2009; Hawkins et al., 2002; Morton und Griffiths, 1985).

Eine zuverlässige, einfach und schnell durchzuführende Bewertung anhand eines Scores für die *in vivo* Sepsismodelle, wie CASP, CLP oder IPSI (intraperitoneale Stuhl Injektion) wäre wünschenswert, um den Krankheitszustand der Tiere vergleichbar zu erfassen. Dieser sollte möglichst nicht invasiv und mit einem geringen apparativen Aufwand betrieben werden können. Bisher gibt es dazu nur wenige

Modelle mit unterschiedlichen Bewertungskriterien. Eine Anfang des Jahres 2013 veröffentlichte Publikation von Huet, Ramsey et al. beschreibt einen Score, *mouse clinical assessment score for sepsis* (M-CLASS), der die klinischen Ausprägung der Sepsis bei Mäusen bewerten soll (Huet et al., 2013). In dieser Bewertung wird allerdings die Körpertemperatur der Versuchstiere, die als wichtiger Faktor für die Letalität von Mäusen bei einer Sepsis postuliert wurde, nicht mit einbezogen (Miao et al., 2012).

Wir entwickelten einen eigenen Klinischen Score (KS) und untersuchten, inwiefern sich die Körpertemperatur in diesen Sepsis Score mit einbeziehen lässt.

## 1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle von TLR9 für die Entstehung einer pulmonalen Inflammation im Rahmen der polymikrobiellen Sepsis *in vivo*.

Im Einzelnen wurden folgenden Fragestellungen nachgegangen:

1. Ist in C57BL/6 Wildtyp (WT)-Mäusen durch die CASP Operation eine polymikrobielle Sepsis induzierbar? Folgende Kriterien wurden hierfür untersucht:
  - a. klinische Zeichen der Infektion
  - b. Nachweis der lokalen bakteriellen Belastung
  - c. Nachweis der systemischen Inflammation
  
2. Zeigen TLR9 defiziente (TLR9-D) Mäuse andere Charakteristika der polymikrobiellen Sepsis nach CASP als WT-Tiere? Folgende Kriterien wurden hierfür untersucht:
  - a. klinische Zeichen der Infektion
  - b. Nachweis der lokalen bakteriellen Belastung
  - c. Nachweis der systemischen Inflammation
  
3. Induziert die systemische polymikrobielle Sepsis in C57BL/6 WT-Mäusen
  - a. eine pulmonale Inflammation?
  - b. eine Veränderung der Lungenfunktion?
  
4. Zeigen TLR9 defiziente Mäuse im Vergleich zu C57BL/6 WT-Mäusen nach CASP andere Charakteristika
  - a. der pulmonalen Inflammation?
  - b. der pulmonalen Funktion?

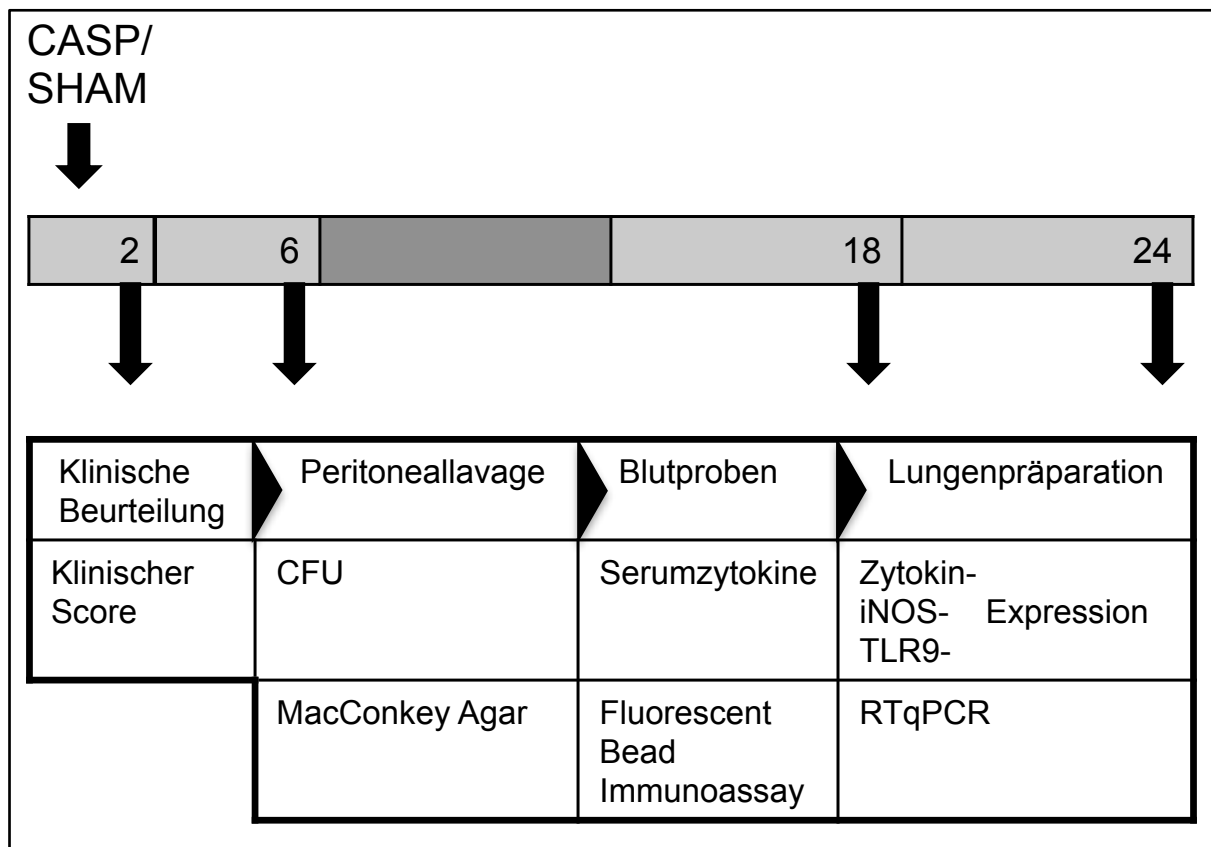
## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchsablauf**

Die Untersuchungen zur Rolle von TLR9 für die pulmonale Inflammation und Funktion im murinen Modell der polymikrobiellen Sepsis fanden in zwei unterschiedlichen Laboren statt: Zum einen am Universitätsklinikum Bonn (UKB) in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin und zum anderen in den Laborräumen unseres Kooperationspartners, der AG Witzenrath, in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin.

#### **Versuchsteil Universitätsklinikum Bonn: systemische und pulmonale Inflammation**

Zunächst wurde an den Versuchstieren entweder eine „Scheinoperation“ (SHAM-OP) durchgeführt oder eine CASP induziert. Nach der Behandlung der Mäuse zum Zeitpunkt 0 mit der SHAM/CASP folgten nach den Zeitpunkten 2, 6, 18 und 24 Stunden *post operationem*, die klinische Bewertung der Tiere nach dem Klinischen Score (KS), sowie die Präparation und Organentnahme. Nachdem die Tiere klinisch bewertet wurden, führten wir unter Narkose eine offene Peritoneallavage zum Nachweis der lokalen Bakterienfreisetzung durch.



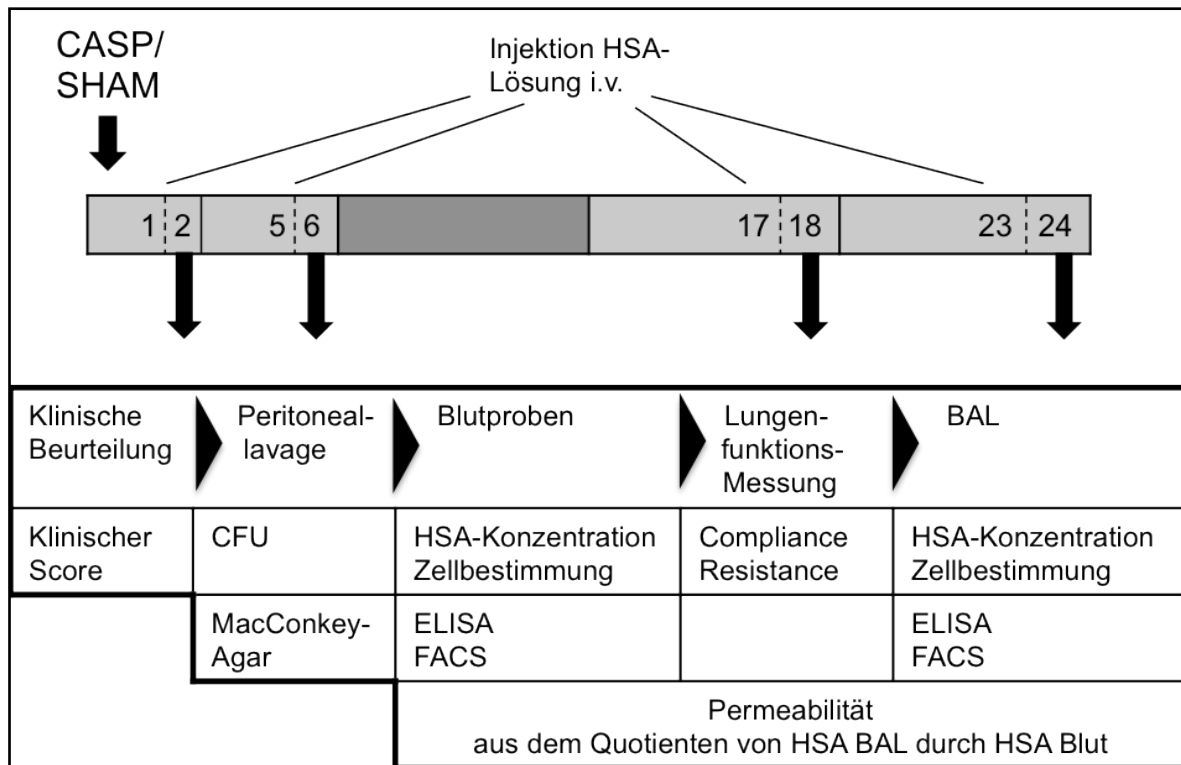
**Abb. 5:** Zeitverlauf für die in Bonn durchgeführten Versuche zur Untersuchung der systemischen und pulmonalen Inflammation. 2, 6, 18 oder 24 Stunden nach CASP/SHAM Operation wurden die hier aufgeführten Proben entnommen und mit den angegebenen Methoden verarbeitet.

Dafür bestimmten wir die *colony-forming-units* (CFU) von gramnegativen aeroben Bakterien. Im Anschluss gewannen wir Blut aus der Vena cava inferior und Gewebeproben der Lunge. In zentrifugierten Plasma wurden im Cytomix-Assay die Zytokin-spiegel für TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  und IL-10 als Marker für eine systemische Infektion bestimmt. Aus den Gewebeproben der Lunge gewannen wir RNA und untersuchten diese mit Hilfe der quantitativen Realtime Polymerase Kettenreaktion (RTqPCR) auf die mRNA Expression von TLR9, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und iNOS zur Beurteilung der pulmonalen Inflammation.

### **Versuchsteil Charité Berlin: pulmonale Funktion**

Die in Berlin durchgeführten Experimente sollten die Lungenfunktion der Versuchstiere unter SHAM/CASP Bedingungen untersuchen. Zum Zeitpunkt 0 wurde zunächst

die SHAM bzw. CASP Operation vorgenommen. Zu den Zeitpunkten 6, 18 und 24 Stunden nach Operation wurden die Tiere präpariert.



**Abb. 6:** Zeitverlauf für die in Berlin durchgeführten Versuche zur Untersuchung der Lungenfunktion. 6, 18 und 24 Stunden nach SHAM / CASP Operation wurden die Proben entnommen / Messungen durchgeführt und entsprechend der Abbildung weiter mit den angegebenen Methoden verarbeitet.

Eine Stunde vor Versuchsende wurde den Tieren, für die Quantifizierung der pulmonalen Permeabilität, über die Schwanzvene humanes Serumalbumin (HSA) appliziert, da erst nach einer Stunde Zirkulation eine ausreichende Verteilung in allen Geweben angenommen werden konnte. Zum Ende des Versuches wurden die Tiere zunächst anhand des KS beurteilt, dann erfolgte eine Peritoneallavage, es wurden Blutproben entnommen und anschließend mit Hilfe des Modells der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge die Compliance und Resistance der Lunge untersucht. Im Anschluss daran wurde aus der Lunge eine broncho-alveoläre Lavage gewonnen. Zusammen mit der Blutprobe konnte sie für die Untersuchung der pulmonalen Permeabilität genutzt werden, um eine mögliche alveolo-kapilläre Barriere-störung zu quantifizieren.

## 2.2 Klinischer Score

Um eine objektive Vergleichbarkeit des Krankheitszustandes der operierten Mäuse zu gewährleisten, entwickelten wir einen Klinischen Score (KS), in Anlehnung an Morton und Griffiths (1985). Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf der Begutachtung des Allgemeinzustandes sowie auf möglichen Gewichtsveränderungen der Tiere. Für die Auswertung des Allgemeinzustandes erhielten die Mäuse Punktwerte von jeweils 0 bis 3 in den Kategorien: Körperhaltung, Körperpflege und Bewegung/Verhalten. Versuchstiere, die eine normale Körperhaltung, Körperpflege und Bewegung / Verhalten zeigten, erhielten im Score 0 Punkte. Je mehr die Tiere von ihrem physiologischen Verhalten abwichen, desto höher lag ihr Punktwert. So zeigten erkrankte Tiere eine verkrampfte Haltung mit Buckelbildung und Einziehung des Bauches und zeichneten sich durch verminderte Körperpflege mit struppigem, stumpfem Fell, verklebten, unsauberen Körperöffnungen und trüben Augen aus.

Ein normales Verhalten mit nicht gestörtem Schlaf-Wach-Rhythmus, Reaktion auf Anpusten und Berühren, neugierigem Verhalten und normalen sozialen Kontakte zu den anderen Tieren war im Krankheitsfall ebenfalls verändert. Es imponierte zum Beispiel eine eingeschränkte Motorik, Selbstisolation und Lethargie. Es fanden sich aber auch Verhaltensstereotypien, Koordinationsstörungen und ein zum Teil autoaggressives Verhalten, das sich besonders in einem zu starken Putzen und Knabbern im operierten Bereich auszeichnete.

Die Gewichtsveränderung bewerteten wir ebenfalls mit 0-3 Punkten. Verloren die Tiere weniger als 5 % ihres Ausgangsgewichts, erhielten sie keine Punkte. Leichte Gewichtsschwankungen wurden auch bei den SHAM-Gruppen beobachtet und sind auf die Laparatomie zurückzuführen. Lag der Verlust des Körpergewichts zwischen 5 und 7,5 % erhielten sie 1 Punkt. Gewichtsverlust größer 7,5 % aber kleiner als 10 % erhielt 2 Punkte und bei einem Verlust von mehr als 10 % des Körpergewichts wurden 3 Punkte vergeben.

Somit konnte ein Tier minimal einen Score von 0 und maximal einen Score von 12 Punkten erreichen. Starb ein Tier im Versuchsverlauf nach der Operation, erhielt es einen KS von 13 Punkten.



**Tab. 4:** Darstellung des Klinischen Scores (KS) zur Beurteilung des klinischen Krankheitszustandes der operierten Versuchstiere. Mit 0 bis 3 Punkten wurden jeweils die Körperhaltung, das Sozialverhalten/Bewegung und die Körperpflege bewertet. Der Gewichtsverlust wurde in % zum Ausgangsgewicht vor Versuchsbeginn ebenfalls mit 0 bis 3 Punkten bewertet.

<b>Klinischer-Score</b>					
Optisches klinisches Erscheinungsbild	Körperhaltung	0	1	2	3
		Normale Körperhaltung	Von der Norm abweichende Körperhaltungen, Verkrampfungen, Lähmungen, hoher Muskeltonus, Buckelung werden je nach Stärke der Ausprägung mit 1-3 Punkten bewertet		
	Sozialverhalten / Bewegung	0	1	2	3
		normales Sozialverhalten und Bewegungsabläufe (Schlafwachrhythmus, Neugier, Sozialkontakte, Verhalten bei Berührung)	Ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik Selbstisolation, Lethargie oder ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypien, Koordinationsstörungen und Autoaggression werden je nach Stärke der Ausprägung mit 1-3 Punkten bewertet.		
	Körperpflege	0	1	2	3
		Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber; Augen klar und glänzend	Stupf, ungeordnetes Fell, un gepflegte Körperöffnungen und trübe Augen werden je nach Stärke Ausprägung mit 1-3 Punkten bewertet.		
Gewichtsverlust in %		0	1	2	3
		0 % - 4,9 %	5-7,4 %	7,5-9,9 %	≥ 10 %

### 2.3 Sepsisversuche *in vivo*

Die CASP Operation ist in der Lage, modellhaft eine polymikrobielle Sepsis in der Maus zu induzieren (Maier et al., 2004). Da bei dieser Methode nicht nur ein oder zwei ausgesuchte Keime in das Peritoneum injiziert werden, sondern das gesamte Darmspektrum die Sepsis auslöst, ist es besonders gut vergleichbar mit Komplikationen, wie sie z. B. bei Darmoperationen beim Menschen auftreten können.

Die Versuche wurden an C57BL/6 Wildtyp- (WT) und Toll-like Rezeptor 9 defizienten (TLR9-D) Mäusen durchgeführt.

Alle Tierversuche dieses Projektes wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein Westfalen (LANUV NRW) unter dem Aktenzeichen 8.87-51.04.20.09.393 genehmigt und wurden unter Beachtung der Tierschutzbe-

stimmungen durchgeführt. Die in Berlin durchgeführten Versuchsteile wurden dem dortigen Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo Berlin) durch eine Ortsänderungsanzeige mitgeteilt (G-0369/10). Die jeweils verwendeten Geräte, Materialien und Lösungen sind separat in Tabellen nach der Beschreibung der Vorgehensweise aufgelistet.

### 2.3.1 Versuchstiere

Für alle *in vivo* Versuche wurden ausschließlich Männchen mit einem C57BL/6N Hintergrund vom Züchter Charles River verwendet. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren die Tiere ca. 12 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht von ungefähr 25-26 g.

Die verwendeten TLR9-D Tiere stammten aus einem eigenen Zuchtprogramm. Es handelte sich um homozygote Knockout Tiere, die ebenfalls aus der Linie der C57BL/6N gezüchtet wurden. Die Homozygotie wurde durch eine Genotypisierung der Versuchstiere überprüft.

Gehalten wurden die Tiere im Tierhaus des Universitätsklinikums, Haus für Experimentelle Therapie (HET) Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn. Die einheitliche standardisierte Haltung erfolgte wie angegeben.

Beleuchtung:	200 Lux auf 1 Meter (m) Höhe
Hell-/ Dunkelphase:	7:00 Uhr- 19:00 Uhr Licht 19:00 Uhr bis 07:00 Uhr Dunkel
Relative Luftfeuchtigkeit:	~50 % (30 bis 70 %)
Luftwechselrate:	15 fach pro Stunde (h)
Raumtemperatur:	22 °C (+/- 2 °C)
Käfigart:	Filtertop- Käfigsysteme, Firma Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeissberg
Futter und Wasser:	<i>ad libitum</i>
Futter:	ssniff Haltungsdiät Maus (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland); Futter, Wasser und Einstreu wurden vor Nutzung autoklaviert
Besatzdichte:	4 Tiere pro Käfig

### 2.3.1.1 Genotypisierung der Toll-like Rezeptor 9 defizienten Tiere

Zur Genotypisierung musste zunächst genomische DNA der zu bestimmenden Tiere gewonnen werden. Dazu verwendeten wir Schwanzspitzen oder Ohrbiopsien, die wir zunächst nach folgendem Protokoll präparierten:

Als erstes wurden die notwendigen Stammlösungen hergestellt.

Stammlösung 1 M Tris HCl pH 8,0	78,8 g Tris HCl in 200 ml A. bidest lösen pH 8,0 mit 5 M NaOH einstellen auf 500 ml mit A. bidest auffüllen
Stammlösung 500 mM EDTA pH 8,0	18,6 g EDTA in 50 ml A. bidest lösen pH 8,0 mit 5 M NaOH einstellen auf 100 ml mit A. bidest auffüllen
Stammlösung 10%iges SDS	10 g SDS in 100 ml A. bidest lösen
Stammlösung 5 M NaCl	146,1 g 5 M NaCl in 500 ml A. bidest lösen

Aus den Stammlösungen erfolgte danach die Herstellung der Gebrauchslösung Tail Lysis Puffer (100 mM Tris HCL, 0,5 mM EDTA, 0,2% SDS und 200 mM NaCl)

25 ml	1M Tris pH 8,0
2,5 ml	500 mM EDTA pH 8,0
10 ml	5M NaCl (Vor Zugabe von SDS mit etwas A. bidest auffüllen)
5 ml	10 % SDS

auffüllen mit A. bidest auf 250 ml und Lagerung bei Raumtemperatur.

Protokoll zur Präparation genomischer DNA:

1. 500 µl Tail Lysis Puffer zu den Ohrbiopsien (bei Schwanzspitze ca. 5 mm) geben
2. 10 µl Proteinase K pro Probe in die 2ml Reaktionsgefäße pipettieren
3. Proben über Nacht bei 55 °C und 600 rpm im Thermo-Mixer inkubieren
4. Reaktionsgefäße 10 Min. bei max. Geschwindigkeit zentrifugieren, um unverdaute Bestandteile vom Überstand zu trennen
5. Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
6. 500 µl Isopropanol (2-propanol) zugeben, Tubes kurz schwenken
7. Reaktionsgefäße 35 Min., 4 °C, bei max. Geschwindigkeit zentrifugieren und Überstand abkippen

8. ca. 500 µl 70 % Ethanol zugeben
9. kurz bei max. Geschwindigkeit ab zentrifugieren, Überstand abkippen und Pellet trocknen
10. Pellet in 20 µl A. bidest resuspendieren
11. Bis zur PCR die Proben im Kühlschrank bei 4 ° lagern

### PCR der genomischen DNA

Für die Genotypisierung wurde folgender Ansatz für die PCR verwendet.

**Tab. 5:** Die Tabelle beschreibt die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR der Genotypisierung für WT-Mäuse links und TLR9-D Mäuse rechts.

Primer A/B = WT		Primer B/C = TLR9-D	
Aqua dest.	14,25 µl	Aqua dest.	14,25 µl
10 x PCR Puffer	2,5 µl	10x PCR Puffer	2,5 µl
MgCl (50 mM)	1 µl	MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1 µl
dNTP (2,5 mM)	2,5 µl	dNTP (2,5mM)	2,5 µl
Primer A (10 pM)	1,25 µl	Primer B (10pM)	1,25 µl
Primer B (10 pM)	1,25 µl	Primer C (10pM)	1,25 µl
Taq Polymerase	0,25 µl	Taq Polymerase	0,25 µl
DNA aus Isolation	2 µl	DNA	2 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>

Als Primersequenzen für die Genotypisierung der TLR9-D Tiere verwendeten wir:

Primer A: TLR-9 A forward GAA GGT TCT GGG CTC AAT GGT CAT GTG

Primer B: TLR-9 B reverse GCA ATG GAA AGG ACT GTC CAC TTT GTG

Primer C: TLR-9 C KO neo forward ATC GCC TTC TAT CGC CTC TTG ACG

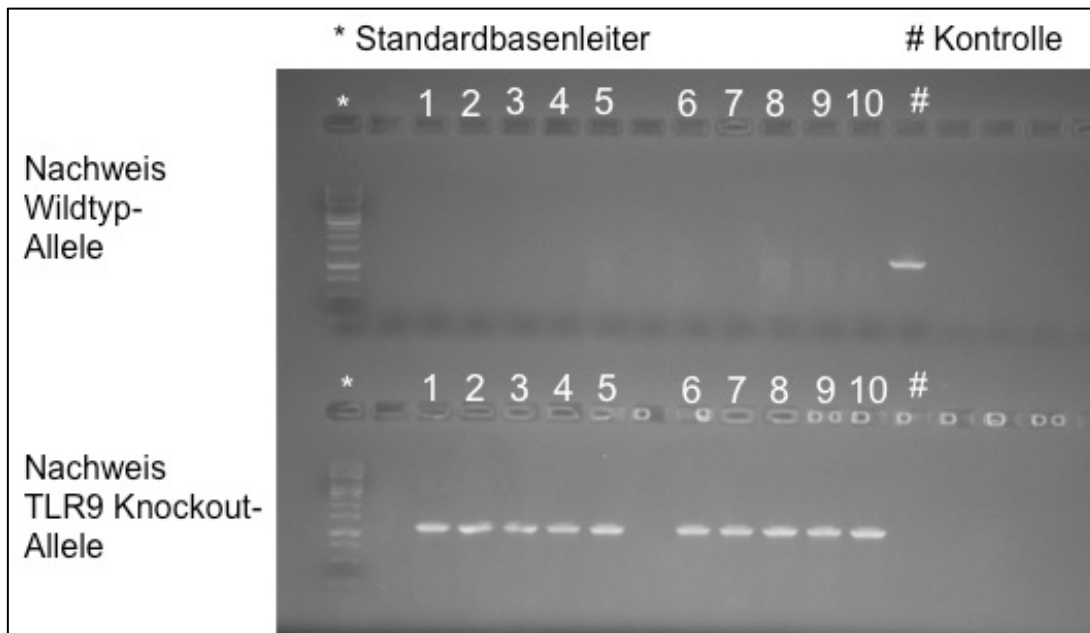
Die Allele der Knock-out Tiere detektierten wir durch die Primer B und C und die der WT-Mäuse durch die Primer A und B. In 40 Zyklen erfolgte die Amplifikation des Genproduktes im Thermocycler mit folgender Einstellung:

- 1) 94 °C     3 Min.
- 2) 94 °C     30 Sek.
- 3) 61 °C     1 Min.
- 4) 72 °C     1 Min.
- 5) 72 °C     10 Min.
- 6) 20°C     ∞

Es folgte die Auftrennung der Genprodukte in der Agarose Gelelektrophorese. Die Genprodukte wurden durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (10 mg/ml) unter UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

1. Gelkammer in die Gießstation einspannen und die Kämme einlegen
2. 600 mg Agarose in ein 200 ml Becherglas abwägen
3. 60 ml Tris / Borate (Borsäure) / EDTA (TBE) 0,5-fach zugeben
4. In der Mikrowelle erst bei 360 Watt 1-2 Min. erhitzen, dann bei 600 Watt solange kochen, bis große Blasen entstehen
5. Becherglas aus der Mikrowelle nehmen
6. 6,5 µl Ethidiumbromid, (1 Tbl. Ethidiumbromid in 1 ml A. bidest lösen, in ein Reaktionsgefäß geben und mit Alufolie vor Licht schützen) zu dem heißen Gel geben, schwenken und in die eingespannte Gelkammer zügig eingießen, da die Oberfläche der Agarose dazu neigt, schnell abzukühlen und Schlieren zu bilden.
7. Nach dem Polymerisieren des Gels die Kämme vorsichtig herausziehen
8. Gelkammer aus der Gießstation lösen und in die Elektrophoresekammer einlegen
9. Rechte und linke Kammer soweit mit TBE 0,5-fach füllen, dass die Taschen nicht überflutet sind.
10. 5 µl Standardbasenleiter in die erste Tasche geben, 2 µl DNA Proben in die restlichen Taschen auftragen und den Decke schließen
11. Bei 100 Volt die DNA in das Gel hineinlaufen lassen, dann die Elektrophorese unterbrechen
12. Kammer nun bis zur Markierung mit TBE 0,5-fach auffüllen
13. Nun die Elektrophorese bei 80 Volt weiterlaufen lassen bis die Bromphenol-Bande kurz vor der B/C Tasche angekommen ist
14. Elektrophoresekammer ausschalten, Gel und Gelhalter herausnehmen
15. Gel mit UV-Licht bestrahlen, ablichten und Ergebnis ausdrucken (im Gel-Doc)

Die zu erwartenden Banden lagen für die TLR9-D Tiere bei 1200 bp. Die Wildtyp Tiere zeigten keine Bande bei 1200 bp.



**Abb. 7:** In dieser Abbildung wurde das Ergebnis einer Agarose-Gelelektrophorese mit homozygoter TLR9-D und WT DNA dargestellt. Ein \* markiert die Tasche mit dem Standardbasenleiter, # markiert die Tasche mit der Kontrolle. Die Zahlen 1 – 10 markieren jeweils die Proben von 10 verschiedenen Tieren. Handelt es sich um ein WT Tier entstand keine Bande bei 1200 bp. Bei TLR9-D war eine Bande bei 1200 bp sichtbar.

**Tab. 6:** Aufgelistet sind die verwendete Geräte zur Genotypisierung der Versuchstiere.

Geräte	Typ	Hersteller
<b>Elektrophorese</b>	Wide Mini-sub <sup>®</sup> Cell GT Power Pac 3000	Bio-Rad Bio-Rad
<b>Gel-Doc</b>	BioDoc-IT <sup>™</sup> Imaging System Benchtop UV Transilluminator	UVP <sup>®</sup>
<b>Thermocycler</b>	TGradient	Biometra <sup>®</sup>

**Tab. 7:** Aufgelistet sind die verwendeten Materialien / Lösungen zur Genotypisierung der Versuchstiere.

<b>Material/Lösung</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Agarose</b>	PeqGold Universal Agarose	Peq Lab Best. Nr. 35-1010
<b>dNTP (2,5 mM)</b>	dNTP 2,5 mM Mix Lot1257684	Invitrogen
<b>EDTA</b>	Art. Nr. E5134, 50 g	Sigma
<b>Eppendorf Cups</b>	Safe-Lock Tubes PCR clean 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
<b>Ethanol</b>	70 % vergällt mit Methylethylketon	Otto Fischer GmbH & Co KG
<b>Ethidiumbromid Tabletten</b>	10 mg / Tablette	Sigma Best. Nr. E-4391
<b>Glycerin</b>	Glycerin > 98 % wasserfrei LotK25345909	Merck-Schuchardt
<b>Isopropanol</b>	2-Propanol Lot1Y008501	AppliChem
<b>MgCl<sub>2</sub> (50mM)</b>	50 mM MgCl <sub>2</sub> 1 ml Lot1074189	Invitrogen
<b>NaCl</b>	Art. Nr. 106404, 5 kg	Merck
<b>NaOH</b>	Natronlauge 2 mol/l LotOC190007	Merck
<b>PCR Puffer 10 x</b>	10 x PCR Rxn Buffer(MgCl <sub>2</sub> ) 1,25 ml Lot1224506	Invitrogen
<b>Primer A (10 pM)</b>	TLR9 A 558379 S5441(G09) 28 ug/OD	Invitrogen
<b>Primer B (10 pM)</b>	TLR9 B 558379 S5441(G10) 27 ug/OD	Invitrogen
<b>Primer C (10 pM)</b>	TLR9koCneo 558379 S5441(G11) 31 ug/OD	Invitrogen
<b>Proteinase K</b>	Proteinase K 10 ml Lot145013159	Quiagen®
<b>SDS</b>	Dodecylsulfat, Art. 20763, 10 g	Serva
<b>Standardbasenleiter</b>	GeneRuler 1 Kb (ready to use Marker) 1 µg/µl, 50 µg	Thermo Scientific Best. Nr. SM 0313
<b>Taq Polymerase</b>	Taq DNA Polymerase recombinant 5 U/µl Lot1262145	Invitrogen
<b>TBE</b>	TBE 10-fach	Bio-Rad Best. Nr. 1610770
<b>Tris HCl</b>	Tris hydrochlorid, Art. Nr. 37192	Serva

### **2.3.2 *Colon ascendens Stent Peritonitis (CASP)***

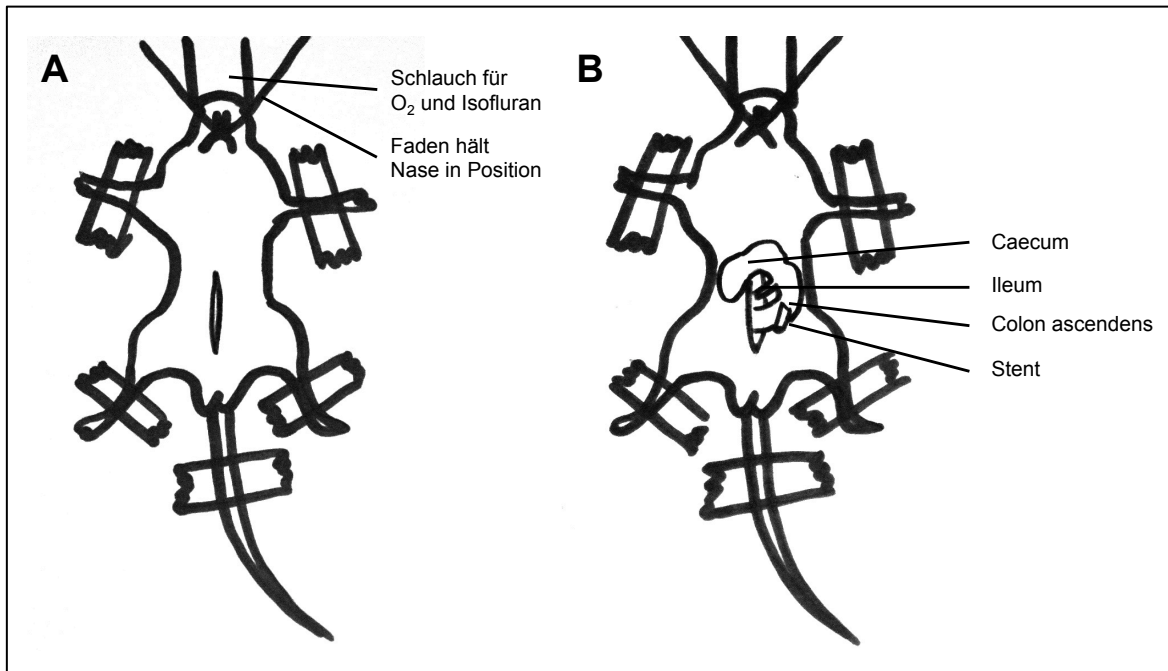
Zur kontinuierlichen Freisetzung coliformer Keime in das Peritoneum wurde ein Stent in das Colon ascendens der Maus eingenäht. Als Stent diente die Plastikspitze einer 18 G Venenverweilkanüle der Firma Braun.

Alle zu verwendenden Oberflächen wurden mit Oberflächendesinfektionsmitteln gereinigt. Das sterile OP-Besteck wurde auf einer vorbereiteten Unterlage zusammen mit den zu verwendenden Fäden bereit gelegt. Enthaarungscreme, Wattestäbchen, Tupfer und Jod zur Hautdesinfektion wurden ebenfalls in Griffweite positioniert. Dann wurde die Maus gewogen und ihre Körpertemperatur rektal gemessen.

Die Anästhesie erfolgte mit Isofluran 2 Vol % (O<sub>2</sub>-Flow von 1,5 l/min). Vor dem Beginn der Operation erfolgte die Applikation von 1 ml NaCl mit 0,3 µg Temgesic® (Buprenorphin) subkutan zur Analgesie. Nun wurde das Fell am Bauch mit Hilfe einer Enthaarungscreme entfernt und anschließend die Haut mit Jod desinfiziert. Ein beheizter Operationstisch (37 °C) verhinderte ein Auskühlen der Maus während der Operation.

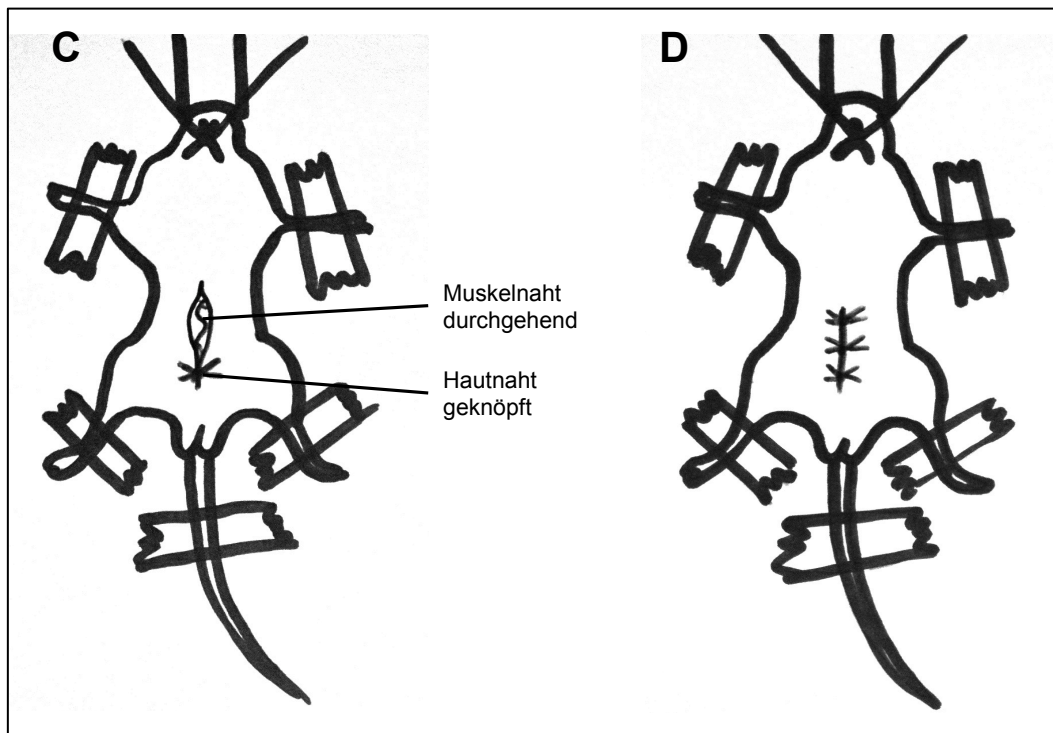
Zeigte das Tier auf Zwickeln mit einer Pinzette keinerlei Schmerzreaktionen mehr, wurde mit der Operation begonnen. Ein 1 cm großer Hautschnitt wurde ca. 1 cm unterhalb des Sternums in Richtung Schwanzspitze gesetzt. Es folgte die Eröffnung des Peritoneums entlang der Linea alba.





**Abb. 8:** Eine schematische Darstellung der CASP-Operation: Operationsbeginn. A) Längsinzision der Haut 1 cm unterhalb des Sternum, anschließender Längsinzision der Linea alba mit Eröffnung des Peritoneums B) Herauslösen des Zökums und des ileozökalen Übergangs und Darstellung des Kolon ascendens. 0,5 cm aboral der ileozökalklappe wurde der Stent in das Kolon ascendens eingenäht.

Das Kolon ascendens wurde vorsichtig zusammen mit dem Zökum herausgelöst. Nun konnte mit einem 7.0 Prolene® Ethicon Faden ein Stent in das Kolon ascendens eingenäht werden. Dafür musste die Eintrittsstelle des Ileums in das Kolon aufgesucht werden. 0,5 cm aboral von dieser Position wurde der Stent an einer Stelle mit wenigen Blutgefäßen eingebracht. Dafür wurde zunächst der Faden an der Außenwand des Kolons angenäht und mit einem dreifachen chirurgischen Knoten befestigt. Danach wurde das Kolon mit der 18 G Venenkanüle punktiert, die Kanüle leicht vorgeschoben und die Nadel zurückgezogen. Dann wurde der Plastikstent mit dem Faden durchstoßen und mit dem bereits vorgelegten verknotet. Der Schlauch wurde abgeschnitten, so dass sich ca. 4 mm innerhalb des Kolons und ca. 4 mm außerhalb des Kolons befanden. Der Stent wurde durch vorsichtiges massieren des Zökums mit Stuhl befüllt bis ein kleiner Tropfen am Ende des Stents austrat. Dann erfolgte die Reposition der Darmschlingen in die Bauchhöhle, die Naht der Muskelschicht mit einer durchgehenden Naht und die Hautnaht mit 3-4 Einzelknüpfnähten.

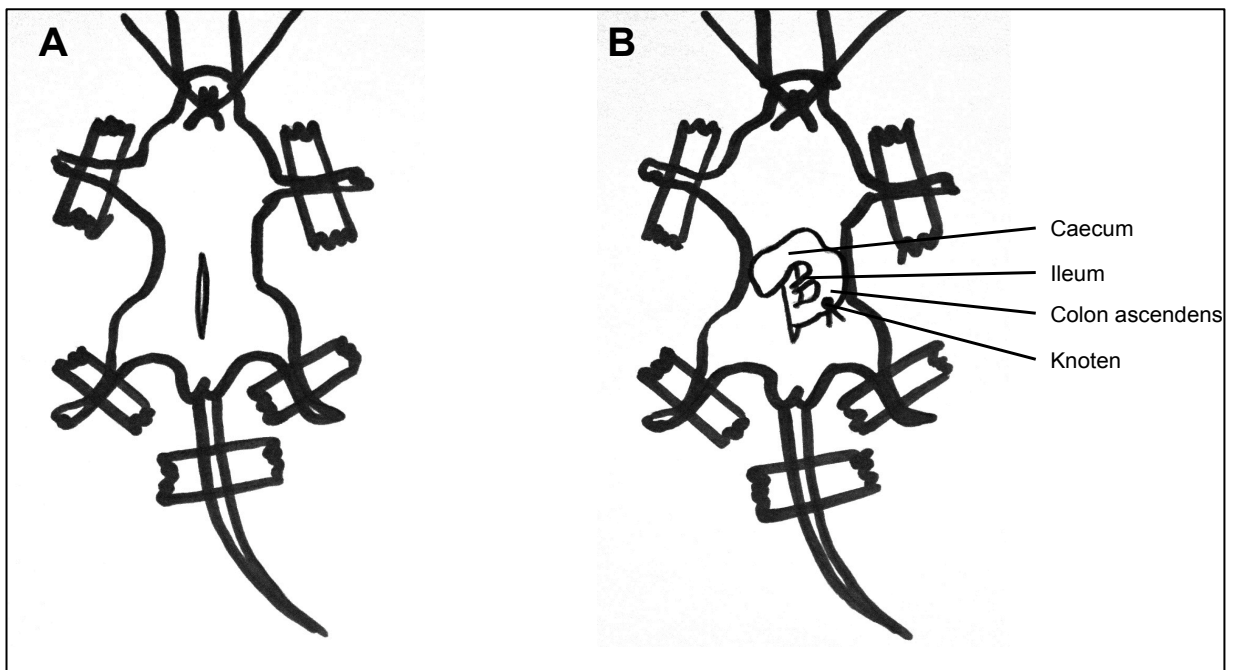


**Abb. 9:** Eine schematische Darstellung der CASP Operation: OP-Abschluss. C) Die Längsinzision der Linea alba wurde durch eine durchgehende Muskelnaht verschlossen. D) Die Haut wurde mit 3-4 Einzelknopfnähten versorgt.

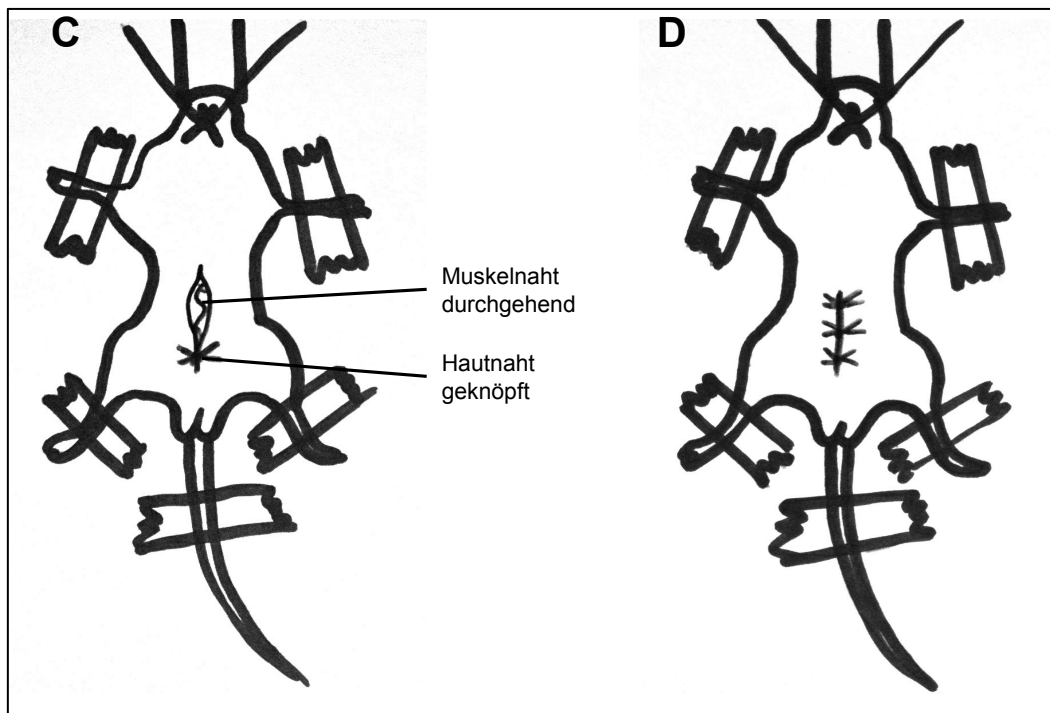
Nach Abschluss der Operation wurde die Narkose beendet und die Maus für die nächsten 30 Min. unter eine Wärmelampe zum Aufwachen gelegt.

### 2.3.3 SHAM-Operation

Die SHAM-Operation entsprach in allen wesentlichen Punkten der CASP-Operation. Der einzige Unterschied bestand im Nicht-Einnähen eines Stents. Anstelle des Stents wurde lediglich ein Faden mit einem 7.0 Prolene® Ethicon Faden an das Kolon ascendens genäht und das Tier wie oben beschrieben weiter behandelt.



**Abb. 10:** Eine schematische Darstellung der SHAM-OP: Operationsbeginn. A) Längsinzision der Haut 1 cm unterhalb des Sternums, anschließend Längsinzision der Linea alba mit Eröffnung des Peritoneums. B) Herauslösen des Zökums und des ileozökalen Übergangs und Darstellung des Kolon ascendens. 0,5 cm aboral der Ileozökalklappe wird ein Knoten an das Kolon ascendens genäht.



**Abb. 11:** Eine schematische Darstellung der SHAM-OP: Operationsabschluss. C) Die Längsinzision der Linea alba wird durch eine durchgehende Muskelnaht verschlossen. D) Die Haut wird mit 3-4 Einzelknüpfnähten versorgt.

### **2.3.4 Präparation und Probengewinnung ohne Permeabilität- und Lungenfunktionsmessung**

Zwei, 6, 18 oder 24 Stunden nach CASP-Operation wurde das Versuchstier mit dem KS bewertet, gewogen und die Temperatur gemessen. Dann erfolgte eine erneute Anästhesie mit Isofluran 2,0 Vol % (O<sub>2</sub>-Flow 1,5 L). Nach Testung der ausreichenden Narkosetiefe erfolgte die Präparation.

Nach der Hautdesinfektion mit Polyvidon-Jod-Lösung und einer Einwirkzeit von einer Minute wurde das Peritoneum der Maus in Analogie zur CASP und SHAM-Operation mit einem ca. 1 cm großen Längsschnitt eröffnet. Das verwendete OP-Besteck wurde, wie bei der CASP zwischen allen Tieren mit Ethanol gereinigt und am Ende des Versuchstages sterilisiert.

Es folgte eine Peritoneallavage mit 5 ml einfach konzentriertem, ca. 30 °C warmen PBS. In 2 Portionen à 2,5 ml wurde das PBS über eine Spritze in die Bauchhöhle eingebracht. Die Wundränder wurden mit einer Pinzette verschlossen und das Tier vorsichtig für 30 s geschüttelt, sodass das gesamte Peritoneum gut durchgespült wurde. Danach erfolgte die Entnahme des PBS über eine Spritze aus der Bauchhöhle. Diesen Vorgang wiederholten wir mit den restlichen 2,5 ml PBS. Am Ende sollten 4 ml der injizierten 5 ml zurückgewonnen werden. Die mikrobiologische Aufarbeitung erfolgte direkt am Ende der Präparation. Bis dahin wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

Das Blut wurde aus der Vena cava inferior mit einer heparinisierten 1 ml Spritze gewonnen. Das gewonnene Vollblut wurde bei 4 °C, 4000 rpm 10 Min. lang zentrifugiert, um anschließend das Plasma abpipettieren zu können. Das Plasma wurde auf Flüssigstickstoff gefroren und bis zur Aufbereitung für die Cytomix-Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

Sowohl die linke als auch die rechte Lunge wurden vollständig entnommen mit PBS in einer Petrischale gespült und ebenfalls auf flüssigem Stickstoff gefroren. Auch die Organproben wurden bei -80 °C bis zur Aufbereitung für die PCR gelagert.

**Tab. 8:** Aufgelistet wurden die verwendete Geräte zur CASP / SHAM Operation und zur Präparation, Organentnahme und Probenaufbereitung der Versuchstiere.

Gerät	Typ	Hersteller
<b>OP-Tisch mit Heizplatte</b>		Eigenbau
<b>Operations- und Präparationsbesteck</b>	Nadelhalter Pinzetten Scheren	Fine Science Tools und Everhards
<b>Sterilisator</b>	Steri 250	Simon Keller
<b>Temperatursonde</b>	Rectal Probe „RET-3“ for mouse,	Physiotemp Instruments INC (USA)
<b>Waage</b>	EMB 500-1	Kern und Sohn

**Tab. 9:** Aufgelistet wurden die verwendete Materialien und Lösungen zur CASP / SHAM Operation und zur Präparation, Organentnahme und Probenaufbereitung der Versuchstiere.

Material/Lösung	Typ	Hersteller
<b>Buprenorphin</b>	Temgesic® Injektionslösung 1 ml = 0,324 mg Buprenorphinhydrochlorid/ml	Essex Pharma GmbH
<b>Enthaarungscreme</b>	Pilca	DM
<b>Ethanol</b>	70 % vergällt mit Methylethylketon	Otto Fischer GmbH & Co KG
<b>Fäden</b>	7.0 Prolene® 5.0 Prolene®	Ethicon
<b>Heparin</b>	Heparin-Natrium 25000 Injektionslösung	Ratiopharm
<b>Isofluran</b>	Forene® 100 % (V/V) 250ml	Abbott
<b>Povidon-Jod-Lösung</b>	Braunol®	Braun AG Melsungen
<b>Tape</b>	Leukosilk S	BSN
<b>Venenverweilkanüle</b>	18 G Vasofix® Safety	Braun AG Melsungen

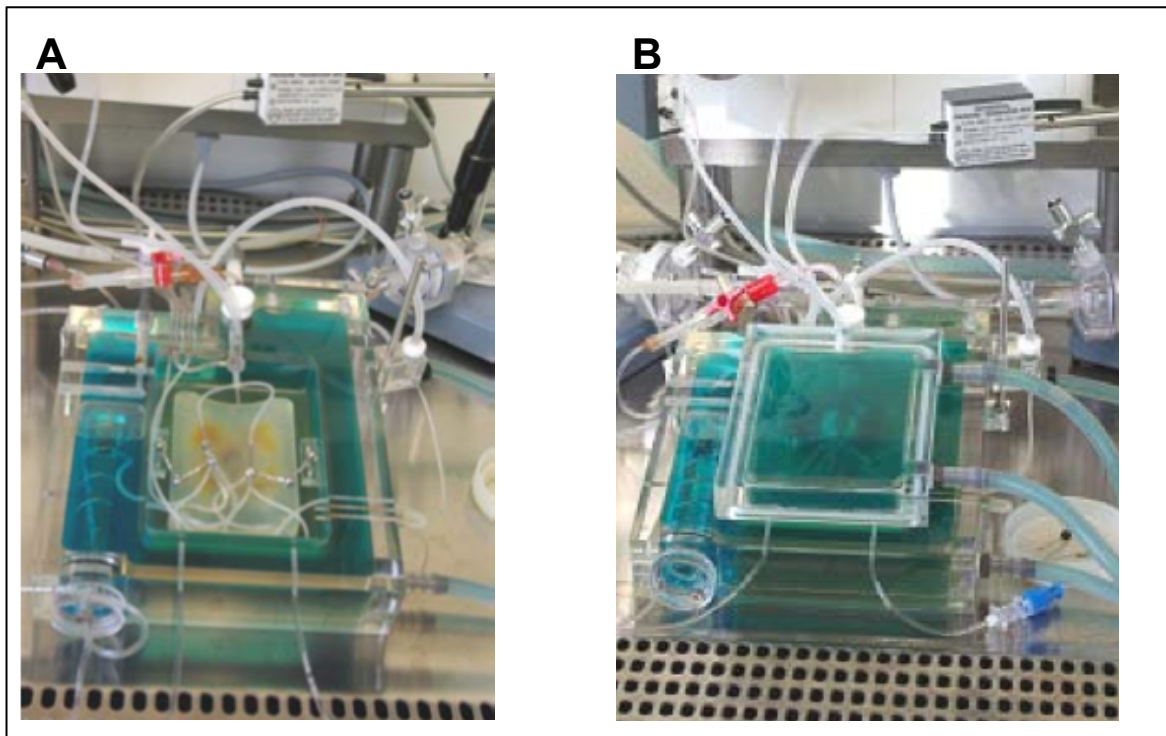
### 2.3.5 Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge

Mit Hilfe dieses Modells können an einer isolierten Mauslunge funktionelle Parameter, wie die dynamische Compliance der Lunge und die Resistance der Atemwege bestimmt werden. Zudem kann auch die Ausprägungen einer möglicherweise auftretenden alveolokapillären Barrierestörung untersucht werden. Weiterhin sind vielfältige Anschlussuntersuchungen mit entnommenen Proben, z. B. bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit (BALF) oder Lungengewebe möglich.

Der Versuchsaufbau ist so gewählt, dass die Lunge, als einzelnes Organ betrachtet und ohne die neuralen und hämodynamischen Einflüsse des Organismus untersucht werden kann. Dadurch wird eine bessere Vergleichbarkeit der Versuchsreihe erreicht. Um die Lunge vom Organismus zu isolieren, wird im ersten Schritt die Maus intubiert und permanent beatmet, anschließend die Lunge vom Blutkreislauf getrennt und im Folgenden über einen Katheter, der *Arteria pulmonalis* mit Elektrolytlösung als Blutersatz versorgt. Damit ist das Organ vom Rest des Körpers isoliert und es können die gewünschten Messungen zur dynamischen Compliance der Lunge und Resistance der Atemwege durchgeführt und zeitgleich die Messdaten mit einer speziellen Software (Pulmodyn Software, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) registriert und gespeichert werden.

#### **2.3.5.1 Intubation und Beatmung**

Wie oben beschrieben wurden die Versuchstiere zunächst intubiert. Dies geschah in einer speziell eingerichteten Perfusionsanlage der Firma Hugo Sachs Elektronik. Die Perfusionsanlage ist eine doppelwandige Kammer, die mit einem Deckel verschlossen werden kann. In diese Doppelwandkammer sind alle notwendigen Anschlüsse eingelassen, die für die weitere Perfusion, Ventilation und Messungen benötigt werden. Das Doppelwandsystem wurde mit 37,5 °C warmen Wasser gefüllt, so dass der Kammerinnenraum eine konstante Temperatur von 37 °C hatte. Diese Kammer wurde in einem 20° Winkel positioniert, damit die Trachea höher als die unteren Lungenabschnitte lag.



**Abb. 12:** Foto A zeigt die Perfusionsanlage mit den eingelassenen Anschlüssen für die Ventilation, Perfusion und Messung; Foto B zeigt die geschlossene Perfusionsanlage im Versuch mit einer isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge.

Die Ventilation der Lunge konnte anschließend entweder durch eine Überdruck- oder aber durch eine Unterdruckbeatmung erfolgen. Für die Überdruckbeatmung existierte eine direkte Verbindung der Druckluftpumpe zur Trachea, dabei diente ein Feinnadelventil zur Regulierung des Luftflusses. Für die Unterdruckbeatmung konnte der Luftfluss über einen Drei-Wege-Hahn zu einer Venturidüse umgeleitet werden. Diese stand mit dem Innenraum in Verbindung und erzeugte einen negativen Kammerinnendruck.

Folgende Einstellungen wurden für die Unterdruckbeatmung festgelegt:

Endexpiratorischer Druck: -4,5 cm H<sub>2</sub>O

Endinspiratorischer Druck: -9 cm H<sub>2</sub>O

Atemfrequenz: 90 / Min.

Inspirationszeit : Expirationszeit: 1:1

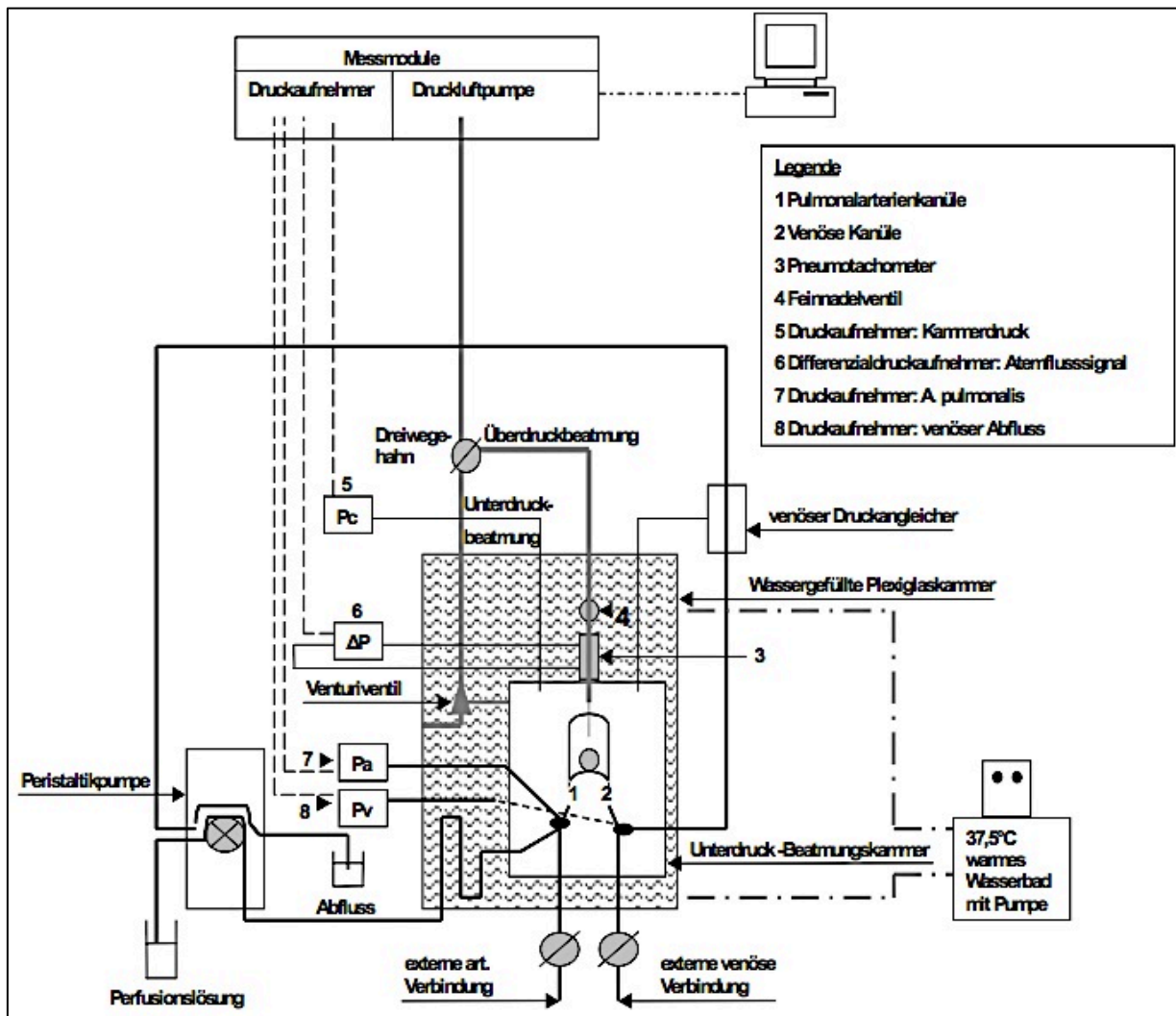
Mit Hilfe eines Pneumotachometers wurde das Atemflusssignal in ein proportionales Drucksignal umgewandelt und mit einem Differenzialdruckaufnehmer gemessen.

Durch weitere Druckaufnehmer konnten die Veränderungen des Kammer- und Trachealdrucks aufgenommen werden.

### **2.3.5.2 Perfusion**

Um die Lunge auch von der Hämodynamik des Versuchstieres zu isolieren, wurde der Blutfluss durch den kontinuierlichen Fluss einer auf 37,5 °C erwärmten Elektrolytlösung (0,9 % NaCl-Lösung) ersetzt. Dafür wurde die *A. pulmonalis* katheterisiert. Über diesen Katheter erfolgte die kontinuierliche Perfusion mit 1 ml/min. Der Katheter war an eine Peristaltikpumpe angeschlossen, die die Perfusionslösung aus dem Vorratsgefäß über einen Wärmeaustauscher und eine Blasenfalle in die Lungengefäße pumpte. Es handelte sich hierbei um ein nicht-rezirkulierendes System. Der Abfluss der Elektrolytlösung erfolgte über eine große Öffnung im linken Ventrikel (die Herzspitze wurde abgeschnitten).





**Abb. 13:** Schematischer Versuchsaufbau der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslung. Das Perfusionssystem ist schwarz dargestellt, das Ventilationssystem grau und der Warmwasserkreislauf zur Erwärmung der Unterdruckkammer in Wellenlinien und als unterbrochene Linie (Gutbier, 2008). Anders als in dieser Abbildung gezeigt verwendeten wir keine externe venöse Verbindung. Der Abfluss erfolgte einfach über eine große Öffnung im linken Ventrikel.

### 2.3.6 Präparation zur isoliert perfundierten und ventilerten Mauslung

Wie bei den anderen Präparationen bestimmten wir als Erstes die Körpertemperatur und das Gewicht der Maus 5, 17 oder 23 Stunden postoperativ. Darauf folgte eine Injektion von 1 mg humanem Serumalbumin (HSA) in 75  $\mu$ l 0,9 %iger NaCl-Lösung in die Schwanzvene der Maus. Eine Stunde nach dieser Injektion wurde das Versuchstier mit einem Gemisch aus 160 mg/kg KM Ketamin und 75 mg/kg KM Xylazin anästhesiert und nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe mit der

Präparation begonnen. Dafür wurde das Tier in Rückenlage in der Perfusionskammer fixiert. Als Nächstes folgte eine Laparotomie und eine Peritoneallavage, wie oben beschrieben (Kap. 2.3.4.).

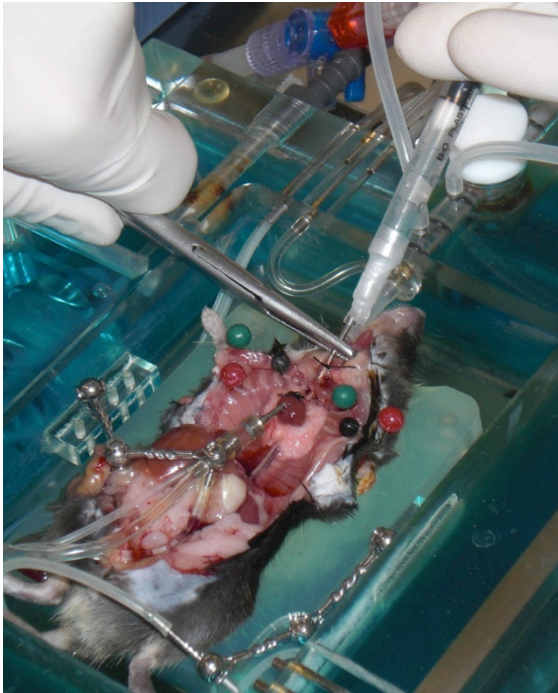
Nach der Peritoneallavage wurde die Intubation der Maus vorbereitet. Dafür wurde ein medianer Hautschnitt am Hals des Tieres durchgeführt und nach Darstellung der Trachea eine Trachealkanüle eingeführt. Eine Ligatur fixierte die Kanüle. Das Tier wurde während der weiteren Präparation mit einer Druckluftpumpe (Ventilation Control Module (VCM); Hugo Sachs Elektronik) per Überdruckbeatmung, wie unter 0 erläutert, mit 90 Atemzügen pro Minute ventiliert. Mit dem Feinnadelventil wurde der Luftfluss dabei so reguliert, dass der maximale Druck über der Trachea bei 9,0 cm H<sub>2</sub>O und der minimale Druck bei 4,5 cm H<sub>2</sub>O lag.

Im Anschluss wurde das Tier heparinisiert, indem über das Zwerchfell unter Sicht die rechte Herzkammer punktiert und 50 µl Heparin (2500 I.E./ml) injiziert wurden. Nach 2 Minuten erfolgte eine finale Blutentnahme aus der Vena cava inferior oder der Vena renalis sinister mit eintretendem Herz-/Kreislaufstillstand.

60 µl der Blutprobe wurde in ein EDTA-Gefäß für die weitere FACS-Analyse gegeben, der Rest wurde bei 1500 g für 10 Minuten zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und bei -80 °C gelagert.

Das Zwerchfell wurde komplett entfernt und der Thorax über das Sternum eröffnet. Vorsichtig wurde der Thorax auseinander gezogen und ebenfalls auf der Unterlage fixiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Lunge nicht manipuliert wurde und die Pleura nicht an der Lunge haften blieb.

Über die *Arteria pulmonalis* wurde ein Spülkatheter eingeführt und mit einer Ligatur befestigt und die Herzspitze für den Abfluss der Spülflüssigkeit abgeschnitten.



**Abb. 14:** Durchführung der BAL. Zu sehen ist oben im Bild die kanülierte Trachea mit aufgesetzter Spritze gefüllt mit Spülflüssigkeit.

So konnten die Blutreste im pulmonalen System über den Spülkatheter mit steriler, auf 37 °C erwärmten, 0,9%igen Kochsalzlösung herausgespült werden.

Sobald die Lungenperfusion gewährleistet war, wurde die Ventilationskammer verschlossen und mit der Unterdruckbeatmung begonnen. Um mögliche gebildete Lungenatelektasen wieder zu öffnen, erfolgte zu Beginn ein tiefer Atemzug (-24 cm WS) und anschließend eine kontinuierliche Unterdruckbeatmung für 3-4 Minuten, bei der die Messung der dynamischen Lungencompliance und der pulmonalen Resistance durchgeführt wurde. Die Perfusion der Lungengefäße, mit einem Fluss von 1 ml/min, wurde während dieser Messung fortgesetzt. Die Einstellungen erfolgten wie im Unterpunkt Intubation und Beatmung (2.3.5.1) beschrieben.

Mit Beendigung der Messung konnte eine broncho-alveoläre Lavage (BAL) durchgeführt werden. Die Flüssigkeit zum Spülen bestand aus 650 µl eiskaltem PBS, zu dem ein Protease-Inhibitor (1 Tablette Complete™ Mini in 10 ml PBS) hinzugegeben wurde. Zwei Mal wurde die Lunge mit 650 µl (BAL 1 und BAL 2) lavagiert.

Das Volumen der zurückgewonnenen BAL-Flüssigkeit (BALF) wurde bestimmt und mit 1011 g, 10 Min. bei 4 °C zentrifugiert. 250 µl des Überstandes von BALF 1 und BALF 2 wurden gepoolt und für die HSA-Konzentrationsbestimmung mittels ELISA verwendet.

Die Zellpellets von BAL 1 und BAL 2 wurden ebenfalls gepoolt und dabei insgesamt in 1000 µl PBS resuspendiert. 5 µl dieser Lösung wurden mit 5 µl Methylviolett gemischt und die Zellen für die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl pro ml in einer Neubauer Zählkammer mit 4 Großquadraten (1 Großquadrat = 16 Quadrate) ausgezählt. Die mittlere Leukozytenzahl entspricht der addierten Leukozytenzahl aller 4 Großquadrate dividiert durch 4. Die Gesamtleukozytenzahl pro ml wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte und des Zählkammervolumens folgendermaßen berechnet: Mittlere Leukozytenzahl x 2 x 10000.

Der Rest der Zellsuspension wurde für die FACS-Analyse, wie unten beschrieben vorbereitet.

Nach der BAL erfolgt die Entnahme der Lunge aus dem Thorax unter besonderer Schonung des Lungenparenchyms.

**Tab. 10:** Dargestellt sind die Geräte, die im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge und deren Probenaufbereitung verwendet wurden.

Geräte	Typ	Hersteller
<b>Differential-Druckaufnehmer</b>	Differential Pressure Transducer Validyne DP45-14	Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
<b>Druckaufnehmer</b>	Pressure Transducer MPX, Typ 399/2	Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
<b>Durchflussszytometer</b>	FACS Calibur	Beckton Dickinson und BD CellQuest™ Pro (Version 4.0.2)
<b>Neubauer Zählkammer</b>	Bright-Line	BD Biosciences
<b>Perfusionsanlage</b>	Unterdruckkammer (Isolated Lung, size 1, Typ 839)	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus GmbH
<b>Peristaltikpumpe</b>	Reglo-Analog	Isamtec SA, Glattbrugg, Schweiz
<b>Software (Pulmodyn)</b>		Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus GmbH
<b>Ventilator</b>	Ventilation Control Module (VCM)	Hugo Sachs Elektronik

**Tab. 11:** Materialien und Substanzen, die im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge und deren Probenaufbereitung verwendet wurden.

<b>Material/Lösung</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Heparin</b>	Liquemin <sup>®</sup> N25000 (Heparin-NaCl 5000 I.E./ml)	Hoffmann-La Roche AG
<b>Humanes-Serum-Albumin</b>	Human Albumin Grifols <sup>®</sup> 20 % (200 g Alb./ 1000 ml)	Grifols Deutschland GmbH
<b>Ketamin</b>	Ketaminhydrochlorid Ketavet <sup>®</sup> 100 mg/ml	Pfizer Pharmacia GmbH
<b>Methylviolett</b>		Merck (Darmstadt) 115945 75 Amyloid: 0,5 % solution 25 g
<b>Povidon-Jod-Lösung</b>	Braunol <sup>®</sup>	BRAUN AG
<b>Protease-Inhibitor</b>	1 Tablette Complete <sup>™</sup> Mini	Roche
<b>Xylazin</b>	Xylazinhydrochlorid Rompun <sup>®</sup> 2 % 20 mg/ml	Bayer Vital GmbH

## 2.4 Molekularbiologische und mikrobiologische Aufarbeitung der Proben

### 2.4.1 Mikrobiologie der Peritoneallavage

Die gewonnene Peritoneallavage wurde zunächst verdünnt. Jeweils zwei verschiedene Verdünnungen der Lavage pro Tier wurden auf MacConkey-Agarplatten ausgestrichen und nach der Inkubation ausgezählt. Die Platten wurden 48 h bei 37 °C bebrütet.

Waren beide Platten eines Tieres auszählbar, wurde der Mittelwert aus diesen beiden Platten gebildet. Aus Vorversuchen war bekannt, dass sowohl für 2 h und 6 h post-operativ CASP WT und TLR9-D Tiere als auch für 2 h und 6 h SHAM Tiere eine Verdünnung von 1:10 und eine unverdünnte Probe auf den MacConkey-Agarplatten die am besten auszählbaren Ergebnisse lieferten. Für die Zeitpunkte 18 h und 24 h nach SHAM wurde eine Verdünnung von 1:10 und 1:100, zum Zeitpunkt 18 h und 24 h nach CASP eine Verdünnung von 1:1000 und 1:10000 angewendet.

Für jedes Tier wurde die Anzahl der *colony forming units* (cfu) pro Milliliter Lavageflüssigkeit nach dem Auszählen berechnet.

#### **2.4.1.1 Herstellung der Agarplatten**

Die Agarplatten stellten wir selbst in unserem Labor her. 25 g Mac Conkey-Agar (Merck KGaA, Bestellnr. 1.05465.0500) wurden unter Rühren in 500 ml A. bidest in einer autoklavierbaren Laborflasche gelöst, die Flasche anschließend verschlossen und autoklaviert (Arioklav<sup>®</sup> Dampfsterilisator H+P). Nach dem Autoklavieren wurde der Inhalt der Flasche wiederum durch Schwenken durchmischt. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde der flüssige Agar unter der Sterilbank (Herasafe, Heraeus Instruments) in sterile Zellkulturschalen (Cellstar<sup>®</sup>Cellculture Dishes, Greiner bio-one) gegossen. Nach Aushärtung der Platten wurden die Zellkulturschalen verpackt und konnten bei Raumtemperatur außerhalb der Sterilbank gelagert werden.

#### **2.4.2 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (RTqPCR)**

Mit der RTqPCR wurde das mRNA-Expressionsmuster von TLR9, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und iNOS im Lungengewebe bestimmt.

Da Nukleinsäuren in den meisten Zellen in zu niedriger Konzentration vorliegen, um gemessen werden zu können, nutzt man die Polymerasekettenreaktion, mit deren Hilfe spezifisch gewünschte DNA- oder RNA-Abschnitte vervielfältigt werden können. Um RNA in einem Gewebe zu quantifizieren, muss die RNA zunächst extrahiert und photometrisch bezüglich ihrer Konzentration und Reinheit bestimmt werden. Anschließend wird diese RNA-Probe in cDNA umgeschrieben und für die folgenden Analysen benutzt.

In mehreren Zyklen wird die doppelsträngige cDNA denaturiert und spezifische Oligonucleotidprimer angelagert, die die zu untersuchende cDNA einschließen. Dann erfolgt die Elongation der 3'-Hydroxyenden der Primer mithilfe einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase aus einem Bakterium (*Thermus aquaticus*). Die Amplifikation führt zu einem exponentiellen Wachstum der DNA-Menge und erlaubt somit die molekularbiologischen Analysen.

Die quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (RTq-PCR) vereint die Amplifikation der Polymerasekettenreaktion mit der Detektion der Reaktionsprodukte in Echtzeit. Sichtbar gemacht werden die Reaktionsprodukte durch Primer-Sonden, die gebunden an ihre komplementäre DNA-Sequenz ein Fluoreszenzsignal abgeben. Dieses Signal wird von einem Detektor (Viia7) aufgezeichnet. Da die in der Probe

vorhandene cDNA-Menge proportional zum gemessenen Fluoreszenzsignal ist, kann indirekt auf ihre Menge zurückgeschlossen werden.

#### **2.4.2.1 Isolation der RNA und Konzentrationsbestimmung der RNA**

Die totale Isolation der RNA des Lungengewebes wurde mit Hilfe des RNeasy mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt.

Die anschließende Extraktion der RNA erfolgte etwas abweichend vom Benutzerhandbuch des Kits mit Silica Säulen nach folgendem Protokoll (alle Schritte wurden ausschließlich mit RNase/DNase-freien Lösungen und Reaktionsgefäßen) durchgeführt:

1. 30 mg Gewebeproben abwiegen und mit 600 µl RLT-Puffer im Ultra-Thurax homogenisieren und Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
2. 590 µl DEPC-Wasser mit 10 µl Proteinase K mischen und zum Homogenat dazu geben
3. 10 Min. bei 55 °C unter leichtem Schütteln inkubieren und anschließend 3 Min. bei 10.000 g bei Raumtemperatur zentrifugieren
4. Überstand in ein neues Tube überführen , 450 µl 96-100 % Ethanol zugeben, mit der Pipette mischen
5. 700 µl des Gemisches auf die Silika Säule geben
6. 30 Sek. bei 8000 g zentrifugieren und das Lysat verwerfen
7. Schritt 5 und 6 wiederholen bis das Gemisch aufgebraucht ist
8. 350 µl RW1 Puffer auf die Säule geben und 30 Sek. bei 8000 g zentrifugieren, Lysat verwerfen
9. 10 µl Proteinase K mit 70 µl RDD Puffer mischen und direkt auf die Säule geben, dann bei Raumtemperatur 15 Min. inkubieren
10. 350 µl RW1 Puffer auf die Säule geben und 30 Sek. bei 8000 g zentrifugieren, Lysat verwerfen
11. 500 µl RPE Puffer auf die Säule geben und 30 Sek. bei 8000 g zentrifugieren, Lysat verwerfen
12. 500 µl RPE Puffer auf die Säule geben und 2 Min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren

13. RNeasy Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und 40 µl RNase freies Wasser (DEPC-behandeltes A. bidest) direkt auf die Membran geben und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
14. 1 Min. bei 8000 g zentrifugieren und 0,5 µl RNase Inhibitor zum Lysat dazugeben. Im Lysat ist nun die aufgereinigte DNA

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure erfolgte im Anschluss durch eine spektrophotometrische Messung mit dem NanoDrop.

Der NanoDrop nutzt die chemische Eigenschaft der Nukleinsäure das Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm zu absorbieren. Mit einem Photodetektor kann so die Konzentration einer Probe bestimmt werden. 2 µl einer Probe wurde gegen 2 µl der korrespondierenden Lösungsflüssigkeit (DEPC-Wasser) gemessen. Zusätzlich kann über den Quotienten 260 nm zu 280 nm, das Absorptionsmaximum für Proteine, der Reinheitsgrad der Probe bestimmt werden. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2 spricht für eine reine Probe.

#### **2.4.2.2 cDNA-Synthese**

Für die cDNA-Synthese benutzten wir 2000 ng Gesamt-RNA. Für jede Probe wurde, mit Hilfe der zuvor bestimmten Konzentration an RNA pro Probe, die µl berechnet, die zu RNase freiem Wasser gegeben werden mussten, um eine Lösung von 25 µl mit einer Konzentration von 80 ng/µl RNA zu erhalten.

Dazu wird das Reaktionsgemisch für die cDNA-Synthese gegeben, bestehend aus: 5 µl reverse Transkriptase Puffer, 2 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), 5 µl Random Primer, 2,5 µl Multi Scribe reverse Transkriptase 50 U/µl, 0,25 µl RNase Inhibitor 2000 U/µl und 10,25 µl DEPC-Wasser. Dies ergibt ein Gesamtvolumen von 25 µl des Reaktionsgemischs. Zu jede RNA-Probe á 25 µl wurden diese 25 µl Reaktionsgemisch hinzugegeben, zentrifugiert und 2 h im Thermocycler inkubiert (1: 25 °C für 10 Min., 2: 37 °C für 2 h, 3: 85 °C für 5 Sek., 4: 4 °C ∞). Bis zur nachfolgenden Analyse mittels PCR wurden die Proben bei 4 °C gelagert.



### 2.4.2.3 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (RTq-PCR)

Wir benutzen für unsere Untersuchungen den Vii7 von Applied Biosystems, 384 Well Platten und folgende Primer-Sonden.

**Tab. 12:** Dargestellt sind die verwendete Primer, die in der RTq-PCR zur Detektion von TLR9, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und iNOS verwendet wurden.

Primer-Sonde	Produkt-Nummer
mouse 18S (endogene Kontrolle)	Mm02601777_g1
mouse IL-1 $\beta$	Mm01336189_m1
mouse IL-6	Mm00446190_m1
mouse TNF- $\alpha$	Mm00443258_m1
mouse TLR9	Mm00446193_m1
mouse iNOS	Mm00440485_m1

Als *Housekeeping* Gen für alle Analysen wurde 18S verwendet.

Jede Probe wurde dreifach für jedes einzelne Zielgen analysiert. Wir verwendeten folgenden Reaktionsansatz pro Reaktion:

5,61  $\mu$ l PCR-Mastermix (2x)

2,83  $\mu$ l DEPC-Wasser

0,56  $\mu$ l der jeweiligen Primer-Sonde.

2,22  $\mu$ l der zu untersuchenden cDNA pro Well

Aus dem Gesamtvolumen von 11,22  $\mu$ l pro Reaktionsansatz wurden 10  $\mu$ l in ein Well pipettiert. Alle Versuchsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die RTqPCR durchlief 40 Zyklen und die Daten wurden anschließend mit der Software Vii<sup>TM</sup>7 Version 1.2 analysiert. Wir schlossen eine  $\Delta\Delta C_T$  Auswertung an. Bei dem CT-Wert handelt es sich um einen Zeitpunkt in der PCR-Analyse, zu dem sich alle gemessenen Werte in einem exponentiellen Produktzuwachs befinden. Die CT-Werte der einzelnen Proben werden so miteinander vergleichbar. Zunächst wurde für die  $\Delta\Delta C_T$  Auswertung der  $\Delta C_T$ -Wert berechnet, indem der CT-Wert des *Housekeeping*-Gens (18S) vom CT-Wert des Zielgens subtrahiert wurde. Im nächsten Schritt wurde der CT-Mittelwert der Kontrollen gebildet. Als Kontrolle dienten dabei jeweils die Mittelwerte mehrerer unbehandelter WT oder TLR9-D Tiere. Für die

$\Delta\Delta CT$ -Berechnung wurde dieser errechnete Mittelwert vom  $\Delta CT$  der jeweiligen behandelten Probe subtrahiert.

Mithilfe des  $\Delta\Delta CT$ -Wertes konnte im Folgenden der Relative Quotient (RQ) jeder Probe bestimmt werden, um den Expressionsunterschied zwischen den CASP und den SHAM operierten Tieren und den Unterschied zwischen den WT und den TLR9-D Gruppen zu verifizieren.

$$\Delta CT = CT_{Zielgen} - CT_{Housekeeping-Gen}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{CASP:SHAM WT oder TLR9-D} - \Delta CT_{Kontrolle WT oder TLR9-D}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

**Tab. 13:** Aufgelistet sind die Materialien und Substanzen, die zur RNA-Isolation, cDNA-Synthese und RTqPCR verwendet wurden.

Materialien/Substanzen	Typ	Hersteller
<b>384 Well Platte</b>	384-well PCR-Platte 781347	Brand
<b>DEPC</b>	Diethyl pyrobarbonate LotBCBD3923V	Sigma
<b>GIT</b>	Guanidine thiocyanate $\geq 97\%$ LotBCBK5190V	Sigma
<b>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</b>	reverse Transkriptase Puffer, Desoxyribonukleosidtri- phosphate (dNTPs), Random Primer, Multi Scribe reverse Transkriptase, Lot1207126	Applied Biosystems
<b>Kryoröhrchen</b>	2 ml	Thermo Scientific
<b>Mercaptoethanol</b>	2-Mercaptoethanol 98 % Lot125K0165	Sigma-Aldrich
<b>PCR Tubes</b>	PCR-02-C thin wall, clear 32102051	Axygen
<b>PCR-Mastermix(2x)</b>	TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems
<b>Proteinase K</b>	Proteinase K 10 ml Lot145013159	Qiagen <sup>®</sup>
<b>RNase Inhibitor</b>	RNase Inhibitor 2000units Cat.No129916	Qiagen
<b>RNeasy mini Kitt</b>	Cat. No. 74106 (250rxn) mit RLT-Puffer, RW1-Puffer, RDD- Puffer, RPE-Puffer, Rnase freies Wasser	Qiagen

**Tab. 14:** Aufgelistet sind die Geräte, die zur RNA-Isolation, cDNA-Synthese und RTqPCR verwendet wurden.

Geräte	Typ	Hersteller
Dispergier-Aggregat	Polytron <sup>®</sup> PT2100	Kinematica AG
NanoDrop	NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Viia7 Software	Viia <sup>™</sup> 7 Software Version 1.2	Applied Biosystems <sup>™</sup>

### 2.4.3 Durchflusszytometrie von Blut und BALF

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Leukozytenpopulationen im Blut und in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit der Mäuse identifiziert und quantifiziert.

Das Durchflusszytometer sortiert Zellen anhand ihrer Größe, Oberflächenbeschaffenheit und des speziellen Farbspektrums der gebundenen Antikörper. Die Zellen werden einzeln über eine Kapillare an einem Laser vorbei geschickt und streuen das Licht je nach Größe und Beschaffenheit der Zelle unterschiedlich. Dies wird von Detektoren (Photomultipliern) registriert. Es wird unterschieden in Vorwärtsstreulicht (FSC *forward scatter*) und Seitwärtsstreulicht (SSC *sidewards scatter*). Der FSC ist ein Maß für das Volumen der Zelle, während der SSC ein Maß für die Granularität der Zelle ist. Zusätzlich können mit dem gestreuten Licht Fluoreszenzen registriert und zusammen mit dem FSC und SSC eine Aussage über die Zellart gemacht werden.

Als Vorbereitung für die FACS-Analyse wurde die gepoolte Zellsuspension aus der gewonnenen BALF mit PBS auf ungefähr 4 ml aufgefüllt und bei 1500 rpm (470 g), 5 Min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet aufgeschüttelt und mit 2 µl Fc-Block (0,5 mg/ml, ausreichend für 1 x 10<sup>6</sup> Zellen) 10 Min. bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Immunglobulinrezeptoren zu blockieren.

In einem Polystyren Round-Bottom Tube (5 ml) wurden die Antikörper von jeweils 3 µl (für 300000 Zellen ausreichend) vorgelegt (Tab. 15).

**Tab. 15:** Aufgelistet sind die Antikörper, die bei der Durchflusszytometrie verwendet wurden.

Rat Anti-Mouse CD3 FITC (T-lymphocytes, clone 145-2C11)	T-Lymphozyten
Rat Anti-Mouse Ly-6G/Ly-6C, PE conjugated (GR-1) (neutrophil marker; clone RB6-8C5)	Neutrophile Granulozyten
Rat Anti-Mouse CD45, PerCP conjugated (panleukocyte marker; clone: 30-F11)	Leukozyten
Rat Anti-Mouse F4/80, APC conjugated (alveolar macrophage marker; clone: BM8)	(nur bei der BALF-Analyse) Alveolarmakrophagen
Rat Anti-Mouse CD19 APC (b lymphocytes, clone 1D3)	(nur bei der Blutanalyse) B-Lymphozyten

Die mit Fc-Block behandelte Zellsuspension wurde zu den Antikörpern gegeben, vermischt und weitere 30 Min. im Dunkeln und bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Röhrchen mit 500 µl FACS™ Lysing Solution (BD-Lyse) behandelt und wiederum 10 Min. im Dunkeln im Kühlschrank gelagert, bevor die Probe mit Cellwash auf ungefähr 4 ml aufgefüllt und bei 470 g für 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde anschließend abgegossen, die Probe aufgeschüttelt und mit 1 ml Cellwash aufgefüllt. Die Probe wurde dann im FACS Calibur der Firma Beckton Dickinson gemessen und mit der BD CellQuest™ Pro Software (Version 4.0.2) analysiert. Es wurden insgesamt 20.000 Zielzellen ausgezählt und die Fraktionen von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten bestimmt.

Durch die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl in der BALF, über die Neubauer-Kammer und den gemessenen prozentualen Anteil der Makrophagen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und Lymphozyten über die FACS-Analyse, konnten die absoluten Zahlen dieser drei Populationen bezogen auf 1 ml BAL berechnet und verglichen werden.

Für die Analyse der Blutproben wurden 60 µl Vollblut, die direkt nach der Blutentnahme in ein EDTA-Röhrchen überführt worden waren, verwendet. Fünf µl der folgenden Antikörper wurden auf das Sieb im BD TruCount™ Tube vorgelegt: CD3 FITC, GR-1 PE, CD45 PerCP und CD19 APC und mit 50 µl Vollblut vermischt. Nach

einer Inkubationszeit im Dunkeln von 20 Min. bei Raumtemperatur wurden 450 µl BD-Lyse hinzu gegeben und weitere 10 Min. im Dunkeln inkubiert. Es folgten gründliches Schütteln der Probe und die Überführung in ein Polystyren Round-Bottom Tube (5 ml) und die Analyse über das FACS Calibur der Firma Beckton Dickinson und BD CellQuest™ Pro (Version 4.0.2).

**Tab. 16:** Aufgelistet sind die Geräte, die zur FACS-Analyse verwendet wurden.

Geräte	Typ	Hersteller
<b>Durchflusszytometer</b>	FACS Calibur	Beckerton Dickinson und BD CellQuest™ Pro (Version 4.0.2)
<b>Mikroskop</b>	Axioskop 20	Carl Zeiss

**Tab. 17:** Aufgelistet sind die Materialien und Substanzen, die zur FACS-Analyse verwendet wurden.

Materialien/Substanzen	Typ	Hersteller
<b>BD TruCount™ Tube</b>		BD Biosciences
<b>BD-Lyse</b>	FACS™ Lysing Solution	BD Biosciences
<b>Cellwash</b>		BD Biosciences
<b>EDTA-Röhrchen</b>	Microvette	Sahrstedt
<b>Fc-Block rat anti-mouse CD16/CD32 (FcγII/III receptor block; clone:2.4G2)</b>	Mouse BD Fc-Block™	BD Biosciences Pharmingen
<b>Polystyren Round-Bottom Tube</b>	BD Falcon™ 5 ml Polypropylen Round-BottomTube	BD Biosciences

#### 2.4.4 Fluorescent Bead Immunoassay

Zur Analyse der Zytokine im Serum der Tiere verwendeten wir einen Immunoassay, der Fluoreszenz-markierte Mikropartikeln, sog. Beads nutzt. Für jedes der zu untersuchenden Zytokine existiert ein spezieller Bead, der sich von anderen Mikropartikeln durch seine Größe und die Intensität des eingesetzten fluoreszierenden Farbstoffes unterscheidet. Die Mikropartikel zur Detektion eines Zytokins sind mit einem spezifischen Antikörper beschichtet, über den dieses Zytokin an den Mikropartikel bindet. Ein spezifischer Biotin-konjugierter Zweitantikörper

bindet an das Zytokin, falls dieses an den ersten Antikörper auf dem Bead gebunden ist.

Die Substanz Streptavidin-Phycoerythrin bindet anschließend an die Biotinkonjugate und setzt ein fluoreszierendes Signal frei. Die Messung erfolgt dann mit Hilfe eines Durchflusszytometers. Das Zytometer identifiziert die verschiedenen Beads anhand ihrer unterschiedlichen Größe und der Intensität der Eigenfluoreszenz. Weiter analysiert es automatisch die Intensität der Fluoreszenz der Biotin-Konjugate und kann deren Intensität den Partikeln zuordnen und ermöglicht so eine quantitative Auswertung.

Aufbereitung und Messung der Proben erfolgten, wie im Benutzerhandbuch des Kits FlowCytomix™ Pro 2.4 mouse Basic Kit BMS820FF von eBioscience beschrieben.

**Tab.18:** Aufgelistet sind die Antikörper, die im FlowCytomix Kit verwendet wurden.

Mouse IL-6 FlowCytomix Simplex	BMS8603FF, eBioscience
Mouse TNF-alpha FlowCytomix Simplex	BMS8607/2FF, eBioscience
Mouse IL-10 FlowCytomix Simplex	BMS8614/2FF, eBioscience
Mouse IL-1beta FlowCytomix Simplex	BMS86002FF, eBioscience
Mouse IFN-gamma FlowCytomix Simplex	BMS8606/2FF, eBioscience

Durchgeführt wurde die Messung mit einem Canto II (BD Bioscience). Wie im Handbuch beschrieben wurden zuerst die beiden Ausgangspopulationen R1 und R2 über SSC-A und FSC-A zur Diskriminierung der unterschiedlichen Bead-Größen gegatet und anschließend die Fluoreszenzintensität in PE versus APC untersucht.

**Tab. 19:** Aufgelistet sind die Geräte, die für den Fluorescent Bead Immunoassay verwendet wurden.

Geräte	Typ	Hersteller
Durchflusszytometer	BD Canto II	BD Bioscience
Software	FlowCytomixPro3.0	eBioscience

**Tab. 20:** Aufgelistet sind die Materialien und Substanzen, die für den Fluorescent Bead Immunoassay verwendet wurden.

Materialien/Substanzen	Typ	Hersteller
Multi-Well Platte	Im Kit enthalten	eBioscience
FACS-Tubes		Sarstedt
FlowCytomix™ Pro 2.4 mouse Basic Kit BMS820FF		eBioscience

#### 2.4.5 Permeabilitätsbestimmung des Lungenparenchyms mittels HSA-ELISA

Die Permeabilität des Lungengewebes wurde anhand der gemessenen Konzentrationen von humanem Serumalbumin (HSA) in der BALF und im Plasma bestimmt. Den Mäusen wurde dafür 1 h vor Präparationsbeginn 1 mg HSA in 75 µl 0,9%iger NaCl-Lösung in die Schwanzvene injiziert. Wie in der Präparationsanleitung auf Seite 57 beschrieben wurden Blutproben gewonnen und direkt nach Blutentnahme bei 1500 g, 4 °C für 10 Min. zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und bis zur ELISA-Analyse bei -80 °C gelagert. Die gewonnene gepoolte BALF wurde ebenfalls direkt nach Entnahme bei -80 °C gelagert.

Die Konzentration von HSA in der BALF und im Plasma konnte mit Hilfe des Human Albumin ELISA Quantitation Kits, von Bethyl Laboratories, quantifiziert werden. Dabei wurden die Versuchsschritte wie im Benutzerhandbuch des Kits beschrieben durchgeführt.

Folgende Puffer fanden dabei Verwendung:

Coating Puffer: (0,05 M, pH 9,6) 2,63 g Natrium Carbonat / 500 ml Aqua dest.

10 x Grundpuffer: (500 mM Tris Base, 1,4M NaCl, pH 8,0) 60,5 g Tris Base / l Aqua dest. + 81,8 g NaCl / l Aqua dest. Für die Versuche wurde der Puffer 1:10 verdünnt

Waschpuffer: (50 mM Tris Base, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween20) 500 ml

Postcoat Puffer: (50 mM Tris Base, 1,14 M NaCl, 1 % BSA) 500 ml 1 x Grundpuffer + 5 g BSA

Probenpuffer: (50 mM Tris Base, 1,14 M NaCl, 1 % BSA, 0,05% Tween20) 500 ml

1 x Grundpuffer + 5 g BSA + 250 µl Tween20

2 Mol Schwefelsäure: 98,1 g/l = 1 Mol (d.h. 100 ml/l = 1 Mol) 200 ml auf 800 ml Aqua dest. ergibt eine 2 molare Schwefelsäure (200 ml/l = 2 Mol)

Mit einem Mikroplatten Photometer erfolgte die Messung bei einer optischen Dichte (OD) von 450 nm. Anschließend konnte das HSA-Verhältnis zwischen BALF und Plasma berechnet werden ( $BALF / Plasma \times 1000$ ). Die Permeabilität und damit die Schädigung des Lungengewebes ist umso stärker, je größer dieser Quotient ist. Denn das HSA kann nur in größeren Mengen in der BALF vorkommen, wenn die alveolo-kapilläre Barrierefunktion durch einen schädlichen Einfluss gestört ist und dadurch die großen HSA-Moleküle aus den Blutgefäßen in die Alveolen gelangen können. Um auszuschließen, dass bei der BAL durch den erhöhten Sog HSA-Moleküle aus den Lungengefäßen fälschlicherweise in die Alveolen bzw. in die BALF gelangen konnten, wurden vor Durchführung der BAL die Lungengefäße, wie oben beschrieben, blutfrei gespült.

**Tab. 21:** Aufgelistet sind die Geräte , die bei der ELISA Analyse verwendet wurden.

Geräte	Typ	Hersteller
Photometer	Anthos ht2 Mikroplatten Photometer	Anthos Mikrosysteme GmbH
Software	WinRead Anthos	Anthos Mikrosysteme GmbH

**Tab. 22:** Aufgelistet sind die Materialien und Substanzen, die bei der ELISA Analyse verwendet wurden.

Materialien/Substanzen	Typ	Hersteller
BSA	Albumin bovine serum , Fracti0n V, $\geq 96\%$	Sigma
Human Albumin ELISA Quantitation Kit	LotE80-12914	Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA
Multi-Well Platte	Nunc MaxiSorp® flat-bottom 96 well plate	Nunc
NaCl	Natriumchlorid	Merck
Natriumcarbonat	wasserfrei zur Analyse EMSURE® ISO 1 * 1 kg	Merck
Schwefelsäure	95-97% zur Analyse	Merck
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Tween20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate	Sigma



## 2.5 Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tab. 23:** Häufig verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien, die nicht speziell nur für einen Versuch benutzt wurden finden sich in dieser Tabelle wider.

<b>Geräte/Material</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Falkontubes</b>	Cellstar <sup>®</sup> Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one
<b>Feinwaage</b>	CP225D-OCE	Sartorius
<b>Glasgefäße</b>	Diverse	SIMAX und Technische Glaswerke Ilmenau
<b>Handschuhe</b>	Nitrile Powder-Free	Micor-Touch
<b>Kanülen</b>	27 G ½ Portex <sup>®</sup> Hypodermic Needle-Pro <sup>®</sup>	Smiths Kendall
	23 G 1 Monoject Magellon <sup>™</sup>	Tycon/Healthcare
<b>Multipipette</b>	Matrix	Thermo Scientific
<b>Multipipettenspitzen</b>	30 µl Non-Sterile	Thermo Scientific
<b>NaCl steril</b>	0,9 %	Braun AG
<b>Oberflächendesinfektion</b>	Freka <sup>®</sup> -NOL A-T	Dr. Schumacher GmbH
<b>PBS 1x</b>	Phosphate Buffered Saline (1x) pH 7,4 500 ml	Gibco <sup>®</sup>
<b>pH-Meter</b>	φ 340 pH/Temp Meter	Beckman
<b>Pinzetten &amp; Scheren</b>	Diverse	Fine Science Tools GmbH
<b>Pipetten</b>	Research 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf
<b>Pipettenspitzen</b>	RNAse/DNAse, Pyrogen frei 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Maxymum Recovery <sup>™</sup>
<b>Spritzen steril</b>	1 ml 5 ml und 10 ml	BD Platipak <sup>™</sup> BD Discardit <sup>™</sup> II
<b>Thermo-Mixer</b>	Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf
<b>Thermocycler</b>	TGradient	Biometra <sup>®</sup>
<b>Vortex</b>	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
<b>Zentrifuge</b>	Centrifuge 5415R Megafuge 1.0R	Eppendorf Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products

## 2.6 Statistische Auswertung

Für die Statistische Analyse der Daten wurde das Programm Prism 4.0 for Macintosh Version 4.0c (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) verwendet. Als Grundlage zur Auswertung der Daten wurde ein One-Way ANOVA mit anschließender Newman-Keuls Multiple Comparison bzw. Bonferroni's Multiples Comparison *post-hoc* Analyse oder einer Dunnett's Multiple Comparison *post-hoc* Analyse, wenn angemessen angewendet. Für den Vergleich von 2 Gruppen fand ein unpaired-t-test Anwendung. Alle Ergebnisse sind mit ihrem Mittelwert (MW) und ihrem Standardfehler (SEM), wie im Folgenden gezeigt: (MW  $\pm$  SEM) dargestellt. Ein signifikanter Unterschied wurde angenommen für ein  $P < 0,05$ .

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Klinische Bewertung der Tiere**

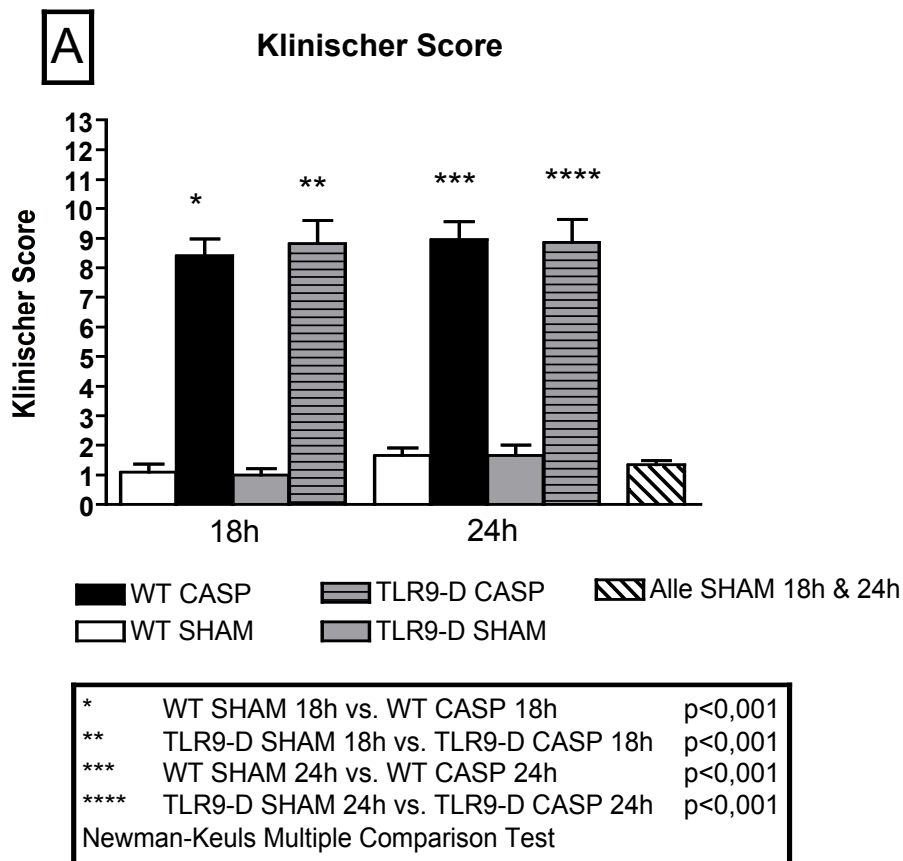
##### **3.1.1 Der Klinische Score**

Um die Versuchstiere hinsichtlich ihrer Sepsis besser beurteilen zu können, wurden alle Tiere nach 18 und 24 Stunden hinsichtlich ihres Krankheitsgrades durch den im Methodenteil beschriebenen Klinischen Score bewertet (S. 41). Damit wurde eine Objektivierung des Krankheitszustandes erreicht und die verschiedenen Versuchsgruppen konnten besser mit einander verglichen werden.

Wir achteten insbesondere auf äußere klinische Symptome, die auf eine systemische Infektion hindeuteten. In den Score flossen ein: Fellzustand und Körperpflege, Körperhaltung, Beweglichkeit, das soziale Verhalten der Versuchstiere und der Gewichtsverlust in % vom Ausgangsgewicht. Die Mäuse zeigten nach 6-18 Stunden bereits deutliche Krankheitszeichen, wie eine desolante Körperpflege, Bewegungsarmut bis zur Lethargie, ein abnormes Sozialverhalten, einen Gewichtsverlust und eine Hypothermie.

SHAM operierte Tiere entwickelten hingegen keine oder nur sehr gering ausgeprägte Krankheitszeichen. Der KS Mittelwert aller SHAM Tiere nach 18 h und 24 h lag bei 1,344 mit einer geringen Standardabweichung von 0,827 und damit verhielten sie sich am ehesten wie nicht operierte gesunde Mäuse.

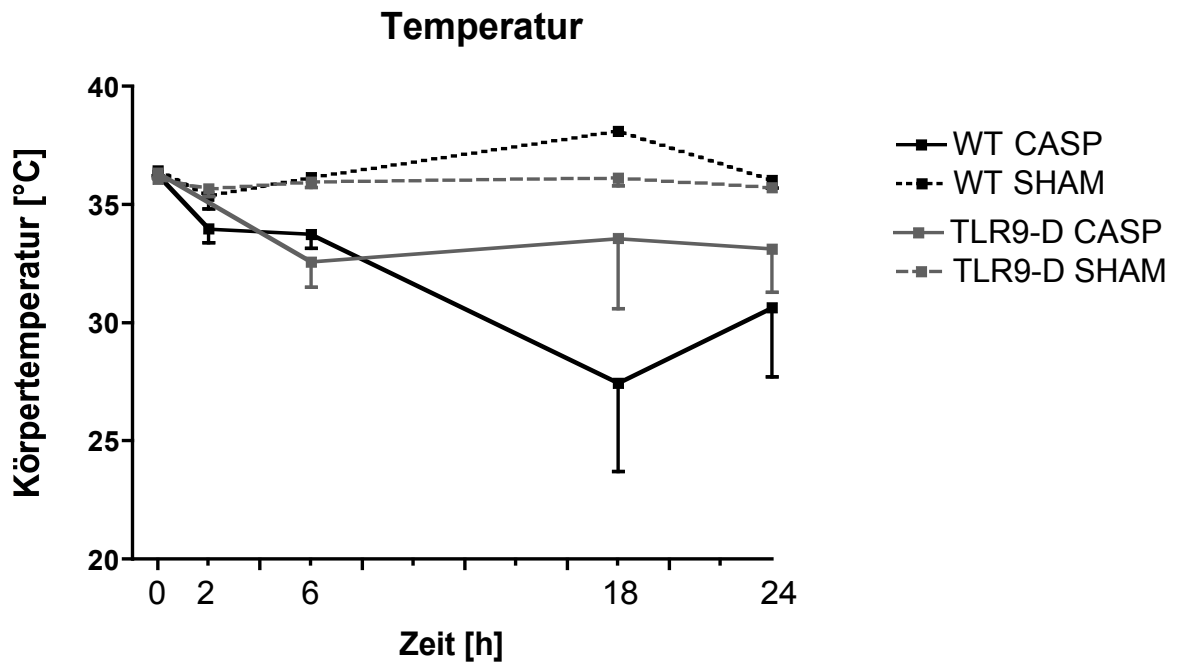
Knock-out- und Wildtypiere wiesen keine relevanten Unterschiede auf. Der Mittelwert beider Tiergruppen im KS lag zwischen 8 und 9 für 18 und 24 Stunden. Signifikant mit  $p < 0.001$  sind die Unterschiede der jeweiligen SHAM-Gruppe zu der dazugehörigen CASP-Gruppen (Newman-Keuls Multiple Comparison Test). Zwei TLR9-D Tiere starben in der 18 Stunden CASP-Gruppe, 1 WT-Tier in der 24h CASP-Gruppe und 3 weitere TLR9-D Tiere ebenfalls in der 24h CASP-Gruppe.



**Abb. 15:** Dargestellt ist der Klinische Score der Gruppen WT CASP, WT SHAM, TLR9-D CASP und TLR9-D SHAM zu den Zeitpunkten 18 und 24 Stunden *post OP*. A) Darstellung als Säulendiagramm.

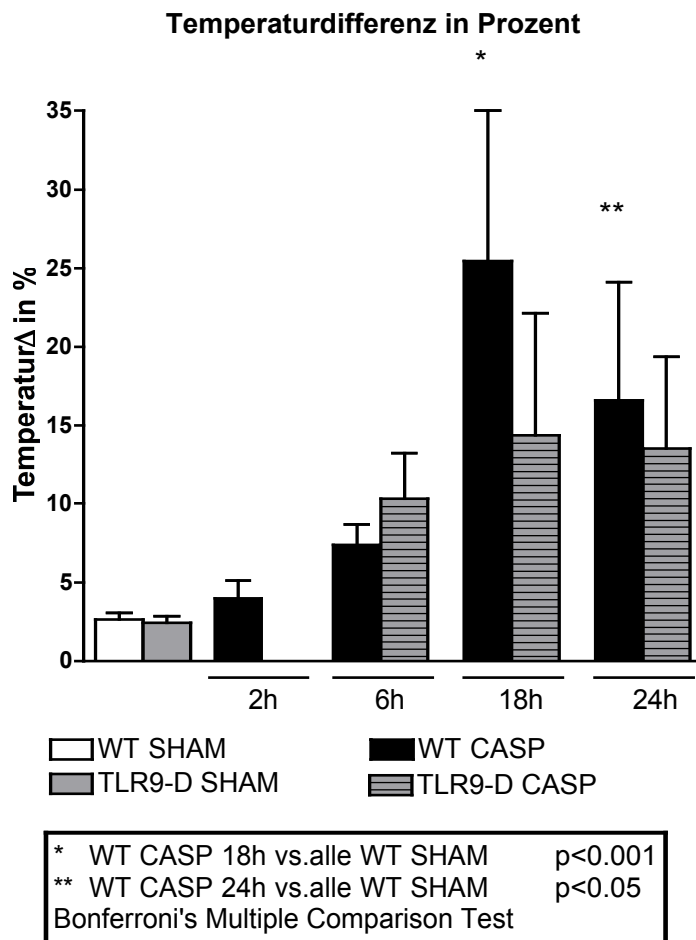
### 3.1.2 Temperaturverlauf der Tiere

Der Temperaturverlauf der Versuchstiere schien ebenfalls gut mit dem Krankheitsgrad zu korrelieren, denn betrachtet man den Temperaturverlauf (Abb. 15) erkennt man auch hier die Auswirkungen der CASP-OP. Knock-out- und Wildtypiere zeigten nach der CASP Operation eine Hypothermie im Vergleich zu den SHAM Tieren. Nach 2 Stunden zeigten alle operierten Tiere, Sham und WT, einen Knick im Temperaturverlauf. Postoperativ sank die Temperatur der Tiere, trotz verwendeter Wärmeplatte unter der Operation und Rotlichtbehandlung für 30 Minuten postoperativ. Die SHAM Gruppe erholte sich schneller von diesem Temperaturabfall und erreichen nach 6 h meist wieder ihre Ausgangstemperatur. Die CASP-operierte Gruppe hingegen fiel mit ihrer Körpertemperatur weiter ab und entwickelt im Verlauf eine beträchtliche Hypothermie.



**Abb. 16:** Dargestellt ist die absolute Abnahme der Körpertemperatur und der Temperaturverlauf nach CASP/SHAM Operation. Die x-Achse zeigt den Zeitpunkt der Untersuchung nach Op, die y-Achse die Körpertemperatur.

Der Vergleich der Temperaturdifferenz in Prozent, der jeweiligen Tiere zu ihrer Ausgangstemperatur, ergab eine signifikante Hypothermie der CASP operierten WT Tiere zu allen WT SHAM Tieren (\*WT CASP 18 h n = 5  $25,47 \pm 9,531$  vs. Alle WT SHAM n = 24  $2,648 \pm 0,4272$  p < 0,001 und \*\*WT CASP 24 h n = 6  $16,61 \pm 7,486$  vs. alle WT SHAM n = 24  $2,648 \pm 0,4272$  p < 0,05 Bonferroni's Multiple Comparison Test). Aufgrund der breiteren Streuung der Werte bei den Knock-out Tieren ergab sich bei diesen kein signifikanter Unterschied zu den SHAM Tieren. Es lässt sich dennoch die gleiche Tendenz ablesen (Abb. 17).

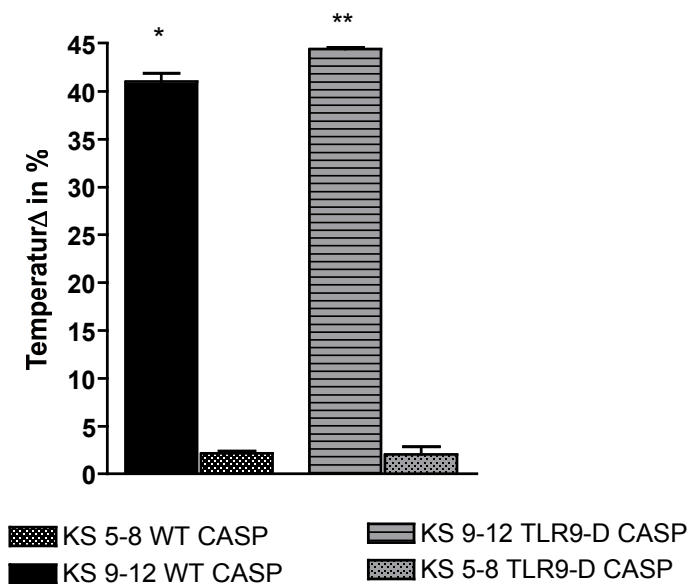


**Abb. 17:** Dargestellt ist die Temperaturdifferenz in % der jeweiligen Versuchsgruppen in Bezug zu ihrer gemessenen Ausgangstemperatur.

### 3.1.3 Temperaturverlauf und Klinischer Score

Anhand des Klinischen Scores lassen sich die CASP Tiere in zwei Gruppen einteilen. Schwer kranke Tiere (KS 9 - 12) gegenüber weniger kranken Tieren (KS 5 - 8) und nicht kranke Tiere (KS 0 - 4), wobei letztere nach CASP Operation praktisch nicht vorkommen. Nach 18 h zeigt sich deutlich, dass Mäuse mit einem hohen KS auch im Durchschnitt eine deutlichere Hypothermie entwickeln als Mäuse mit niedrigerem KS (\*WT CASP 18 h KS 9-12  $41 \pm 0,8704$  vs. WT CASP 18 h KS 5-8  $2,175 \pm 0,205$  p<0,05 Newman-Keuls Multiple Comparison Test und \*\*TLR9-D CASP 18 h KS 9 - 12  $44,4 \pm 0,14$  vs. TLR9-D CASP 18 h KS 5 - 8  $2,03 \pm 0,7895$  p < 0,05). Nach 24 h waren die Werte breiter gestreut und nicht so aussagekräftig wie nach 18 h (Abb. 18, 24 Stunden Daten nicht dargestellt).

### Temperaturdifferenz bei KS 9-12 vs. KS 5-8 18h

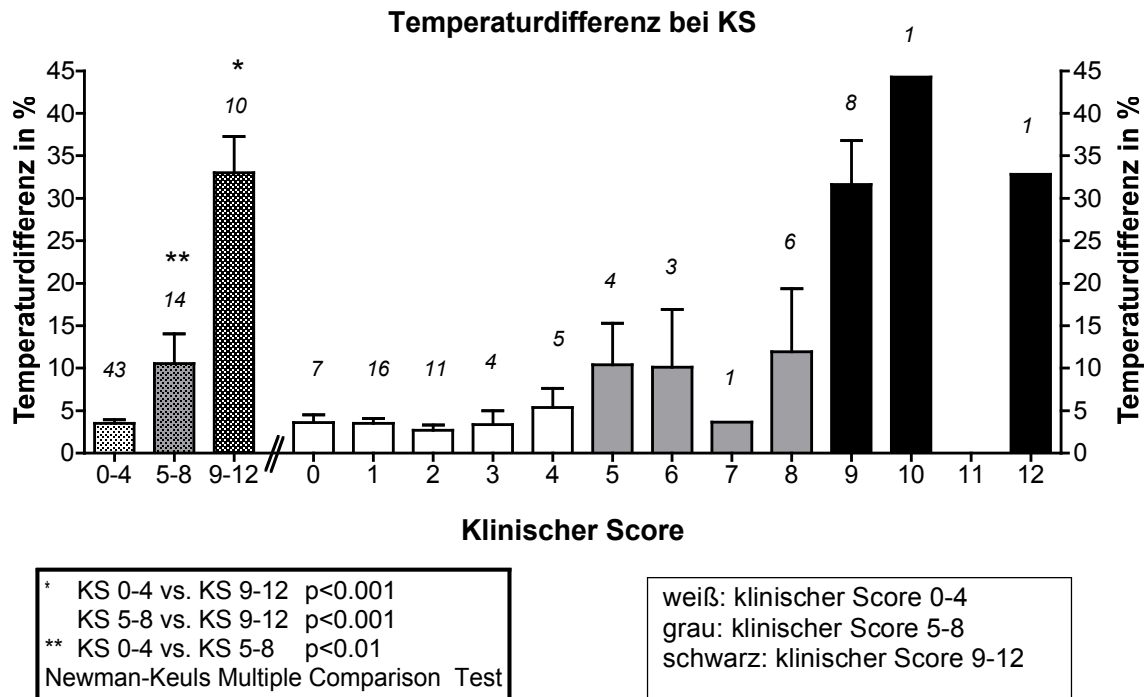


*	KS 5-8 WT CASP 18h vs. KS 9-12 WT CASP 18h	p<0,05
**	KS 5-8 TLR9-D CASP 18h vs. KS 9-12 TLR9-D CASP 18h	p< 0,05
Newman-Keuls Multiple Comparison Test		

**Abb. 18:** Dargestellt ist die Temperaturdifferenz in Prozent bei einem KS von 9 - 12 gegenüber einem KS von 5 - 8 für den Zeitpunkt 18 h nach Operation.

Wird der KS gegenüber der Temperaturdifferenz aufgetragen, fällt auf, dass es ab einem KS von 9 zu einem sprunghaften Anstieg der Temperaturdifferenz kommt. Mit einem Mittelwert von  $11,9 \pm 7,42$  (KS 9) gegenüber einem Mittelwert von  $31,6 \pm 5,18$  (KS 9) (Abb. 18).

In der Gruppe KS 0 - 4 liegt der Mittelwert der Temperaturdifferenz bei  $3,51 \pm 0,417$ , KS 5 - 8 bei  $10,5 \pm 3,54$  und für einen KS von 9 - 12 bei  $33 \pm 4,27$ . Die Temperaturdifferenzen zwischen den drei Gruppen des KS sind signifikant, zwischen KS 0 - 4 vs. KS 9 - 12 und KS 5 - 8 vs. KS 9 - 12 mit  $p < 0,001$  und für \*\*KS 0 - 4 vs. KS 5 - 8 mit  $p < 0,01$  im Newman-Keuls Multiple Comparison Test (Abb. 19).

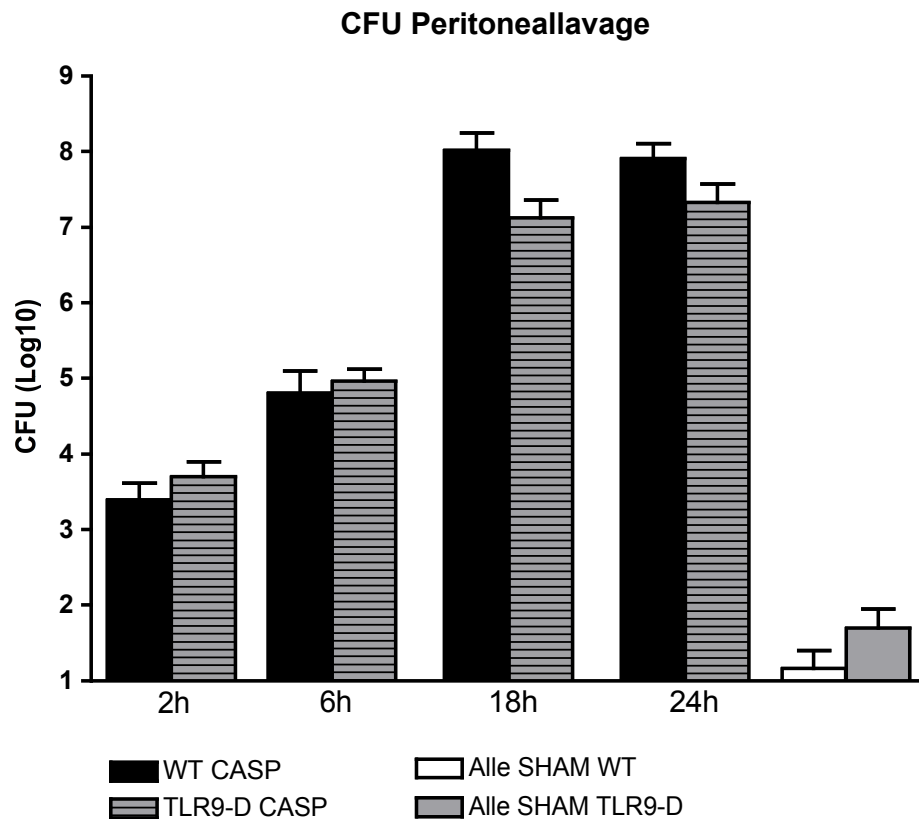


**Abb. 19:** Temperaturdifferenz in % aufgetragen gegen die entsprechenden Klinischen Scores. In Kursiv über den Balken ist die n-Zahl angegeben. Die linken 3 Säulen zeigen den KS in drei Gruppen zusammengefasst. Klinischer Score von 0 – 4, von 5 – 8 und von 9 – 12. Ab dem 4. Balken erfolgt die genaue Aufschlüsselung der einzelnen Scores inklusive der Anzahl der Tiere.

### 3.2 Intraperitoneale Bakterienfreisetzung

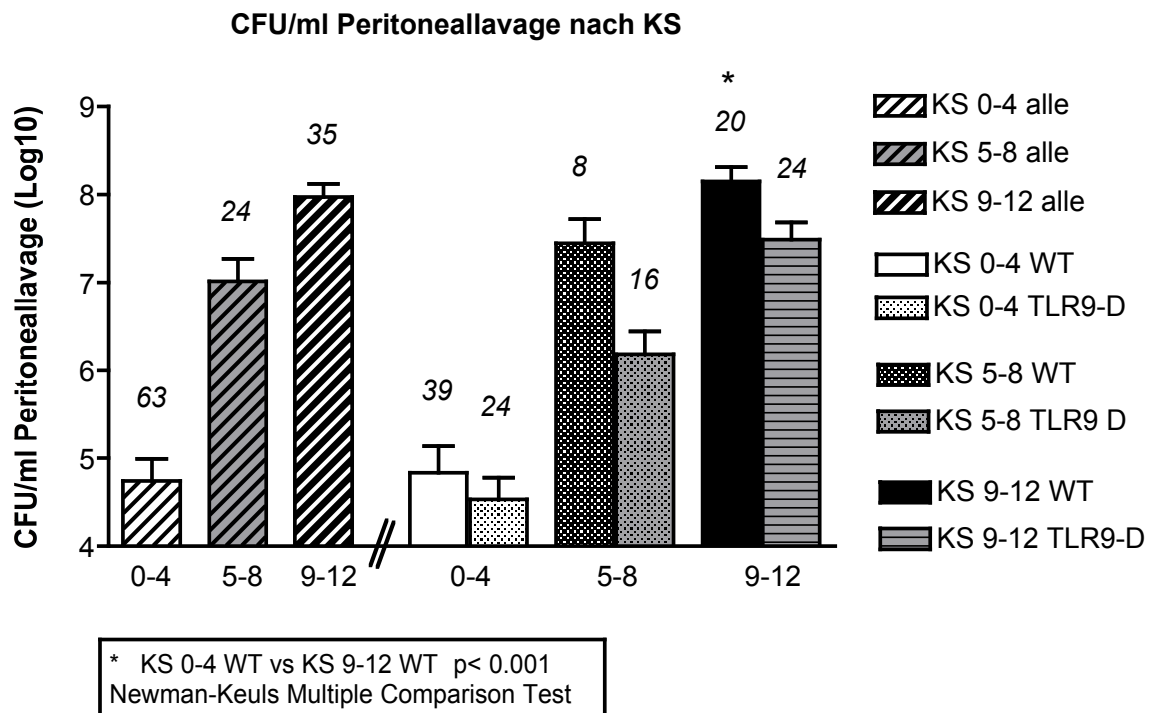
Die CASP führt zu einer stetigen Zunahme der Bakterienzahl in der Peritoneallavage im Zeitraum von 2-24 Stunden in allen Gruppen. Dabei gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den TLR9 Defizienten- und den Wildtyp-Tieren. Nach 18 h ist kein wesentlicher Anstieg der Bakterienmenge in der Lavage mehr feststellbar.





**Abb. 20:** Dargestellt ist die CFU pro ml Peritoneallavage (auf MacConkey-Agarplatten aufgetragen, 48 h inkubiert und anschließend CFUs ausgezählt). Die CFU ist 10er logarithmisch aufgetragen.

Ein ähnliches Bild ergibt sich trägt man die CFU pro ml Peritoneallavage gegen den KS auf. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, abgesehen der WT KS 9-12 gegenüber der WT KS 0-4 Gruppe. (\*KS 9 - 12 WT  $1,417e+008 \pm 6,435e+007$  und KS 0 - 4  $68267 \pm 67678$   $p < 0,001$  Newman-Keuls Multiple Comparison Test) (Abb. 20). Die Vermutung, dass klinisch kränker erscheinende Tiere eine höhere bakterielle Last aufweisen ist tendenziell nachweisbar.



**Abb. 21:** Dargestellt ist die Korrelation zwischen CFU pro ml Peritoneallavage und dem KS. Die kursiven Zahlen über den Balken geben die n-Zahl an. Alle Daten wurden anhand ihres KS in Gruppen eingeteilt. Zum einen alle Tiere mit einem Score von 0 - 4, 5 - 8 oder 9 - 12 und zum anderen aufgeschlüsselt nach WT und TLR9-Tieren mit den Scores von 0 - 4, 5 - 8 und 9 - 12.

### 3.3 Systemische Inflammation

Um die systemische Inflammation der Versuchstiere zu erfassen, analysierten wir Blutproben mittels eines Cytomix-Assays (S. 73) auf unterschiedliche Zytokine. IL-6 findet bereits in der Klinik als Frühmarker einer beginnenden Infektion Verwendung. Neben IL-6 bestimmten wir  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  und IL-10. Bei weiteren Tieren ermittelten wir die Zahl an Monozyten, Granulozyten und Leukozyten im Blut der Tiere mit Hilfe einer Durchflusszytometrie (S. 70).

#### 3.3.1 Zytokine im Serum

Insgesamt zeigte sich bei den Serumzytokinen (IL-6,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  und IL-10), wie beim KS, außer bei  $\text{IFN-}\gamma$  kein signifikanter Unterschied zwischen den WT und den Knock-out Mäusen. Sie reagierten im Rahmen der untersuchten Zytokinausschüttung sehr ähnlich. Weiterhin fiel eine breite Streuung der Zytokinpiegel der

Tiere auf. Die Reaktion auf den Stimulus CASP / SHAM Operation fiel sehr unterschiedlich aus (Abb. 22, 23, 24, 25 und 26) und war nur für einige Zeitpunkte im T-Test signifikant. So zeigten sich signifikante Unterschiede für die Sham zur CASP Gruppe für IL-6, bei WT 2 und 6 Stunden (2 h SHAM WT  $373,5 \pm 47,00$  vs. 2 h CASP WT  $12657 \pm 3793$  und 6 h SHAM WT  $163,7 \pm 41,65$  vs. 6 h CASP WT  $11135 \pm 3431$   $p < 0,05$  t-Test) und für die TLR9-D ebenfalls nach 2 und 6 Stunden (2 h SHAM TLR9-D  $544,9 \pm 140,6$  vs. 2 h CASP TLR9-D  $5346 \pm 1649$  und 6 h SHAM TLR9-D  $96,50 \pm 72,84$  vs. 6 h CASP TLR9-D  $13727 \pm 3039$   $p < 0,05$  t-Test).

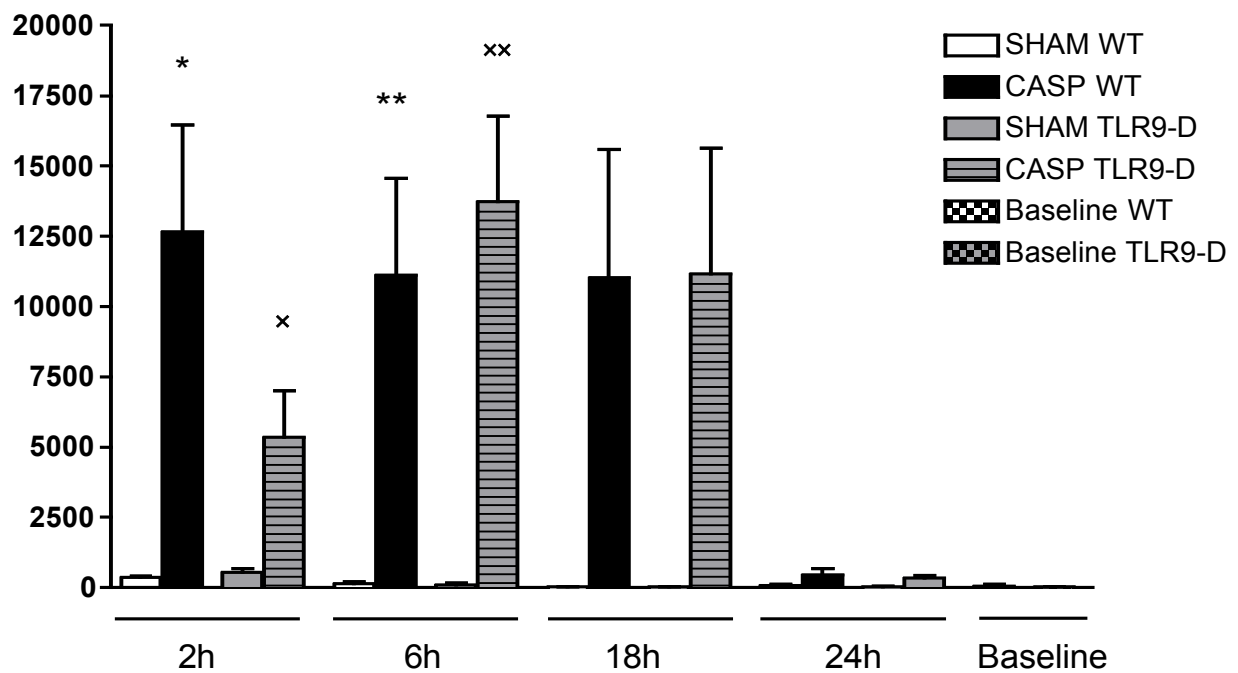
Für TNF- $\alpha$  ergab sich zu den Zeitpunkten 2 und 18 Stunden im t-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den Sham und CASP Gruppen der WT und TLR9-D (2 h SHAM WT  $4,741 \pm 4,741$  vs. 2 h CASP WT  $221,0 \pm 58,42$  und 18 h SHAM WT  $6,555 \pm 4,291$  vs. 18 h CASP WT  $301,0 \pm 117,1$  und 2 h SHAM TLR9-D  $4,370 \pm 4,370$  vs. 2 h CASP TLR9-D  $75,39 \pm 18,02$  und 18 h SHAM TLR9-D  $17,34 \pm 8,235$  vs. 18 h CASP TLR9-D  $170,3 \pm 51,08$   $p > 0,05$  t-Test).

Ebenso für IL-1 $\beta$  nach 18 und 24 Stunden, allerdings nur für die Wildtypiere (18 h SHAM WT  $42,06 \pm 9,920$  vs. 18 h CASP WT  $284,6 \pm 55,52$  und 24 h SHAM WT  $21,08 \pm 13,62$  vs. 24 h CASP WT  $290,8 \pm 78,14$   $p < 0,05$  t-Test).

Weiterhin für IL-10 zum Zeitpunkt 2 Stunden, sowohl für die Knockout-, als auch für die Wildtypiere (2 h SHAM WT  $63,48 \pm 38,61$  vs. 2 h CASP WT  $1763 \pm 477,8$  und 2 h SHAM TLR9-D  $13,85 \pm 13,85$  vs. 2 h CASP TLR9-D  $932,5 \pm 302,0$   $p < 0,05$  t-Test).

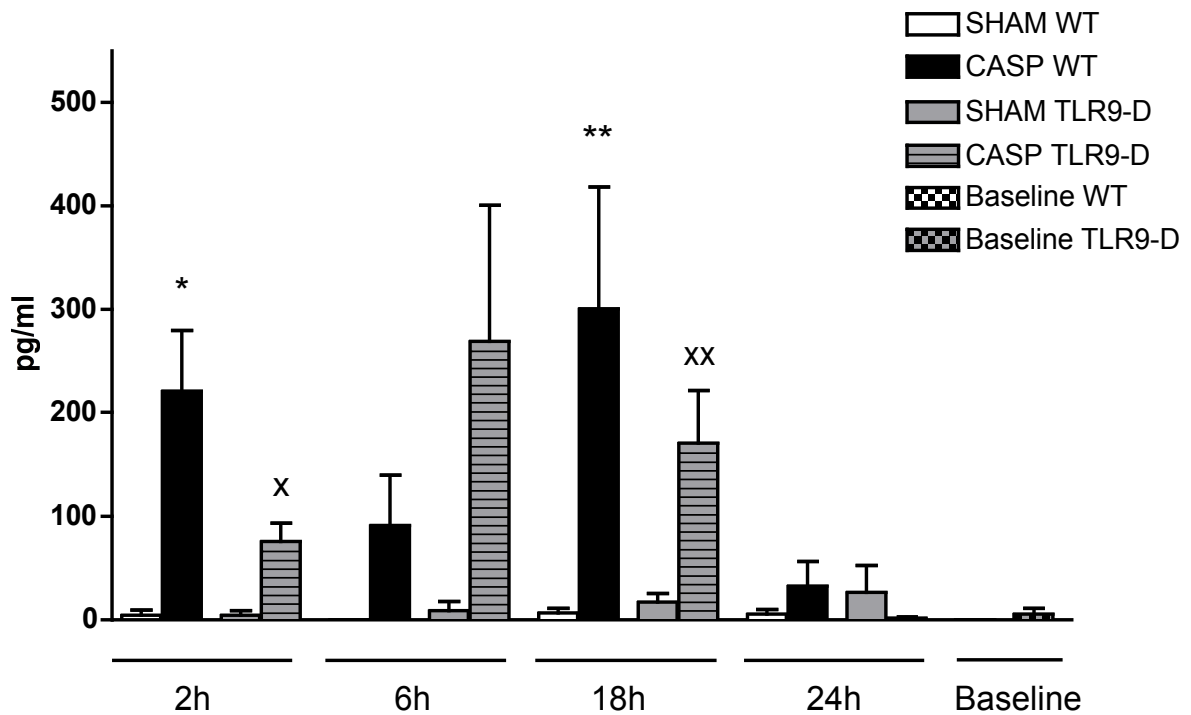
Als einziges Zytokin zeigte IFN- $\gamma$  zum Zeitpunkt 18 Stunden, zusätzlich zum signifikanten Unterschied zwischen dem WT 18 Stunden Werten (18 h SHAM WT  $5,399 \pm 5,399$  vs. 18 h CASP WT  $167,4 \pm 36,66$   $p < 0,05$  t-Test) eine signifikante Differenz zwischen WT und TLR9-D (18 h CASP WT  $167,4 \pm 36,66$  vs. 18 h CASP TLR9-D  $71,23 \pm 28,37$ ).

## Zytokinprofil IL-6



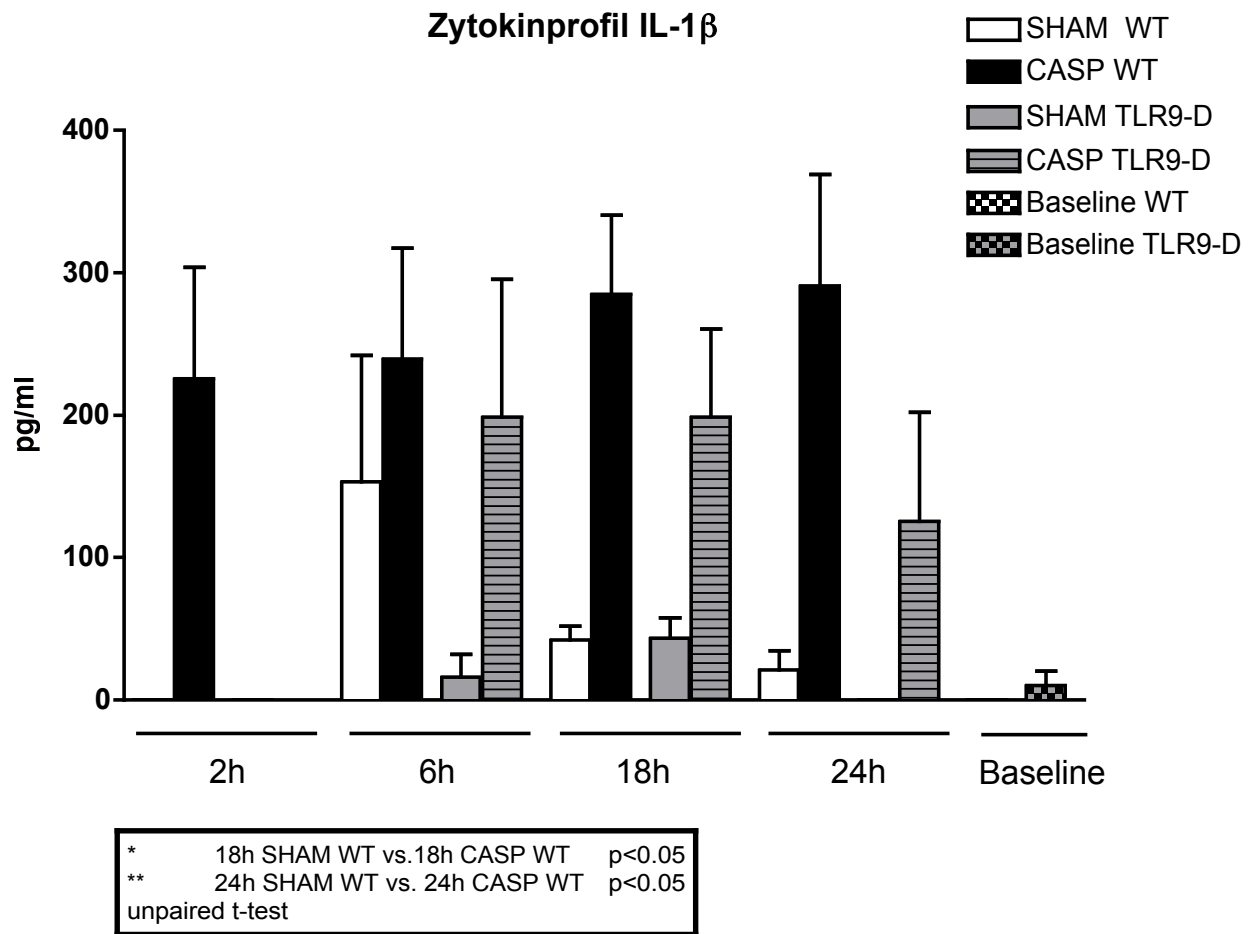
*	2h SHAM WT vs. 2h CASP WT	p<0.05
**	6h SHAM WT vs. 6h CASP WT	p<0.05
x	2h SHAM TLR9-D vs. 2h CASP TLR9-D	p<0.05
xx	6h SHAM TLR9-D vs. 6h CASP TLR9-D	p<0.05
unpaired t-test		

**Abb. 22:** Dargestellt ist die Zytokinkonzentration von IL-6 im Serum nach CASP / SHAM in pg/μl (Fluorescent Bead Immunoassay).

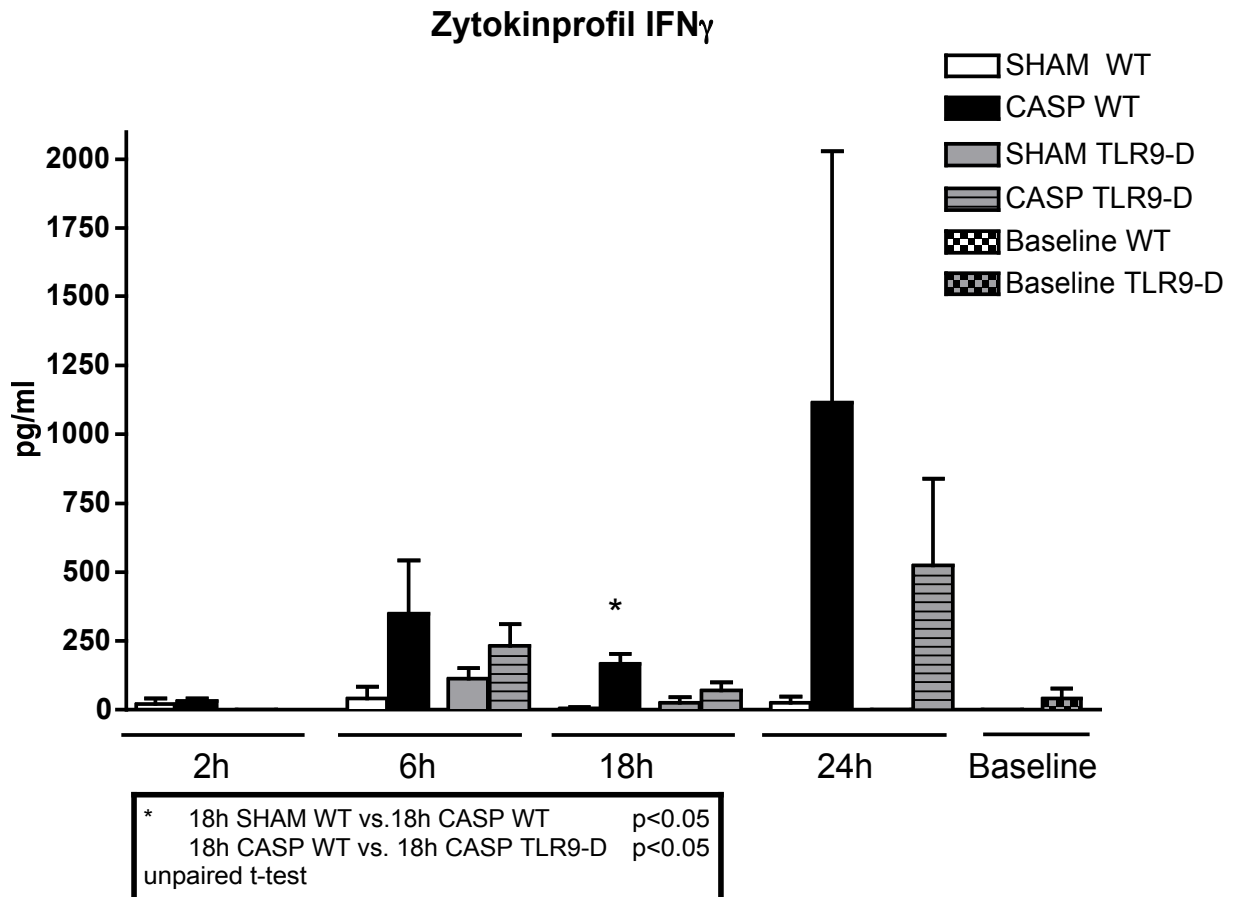
Zytokinprofil TNF- $\alpha$ 

*	2h SHAM WT vs. 2h CASP WT	p<0.05
**	18h SHAM WT vs. 18h CASP WT	p<0.05
x	2h SHAM TLR9-D vs. 2h CASP TLR9-D	p<0.05
xx	18h SHAM TLR9-D vs. 18h CASP TLR9-D	p<0.05
unpaired t-test		

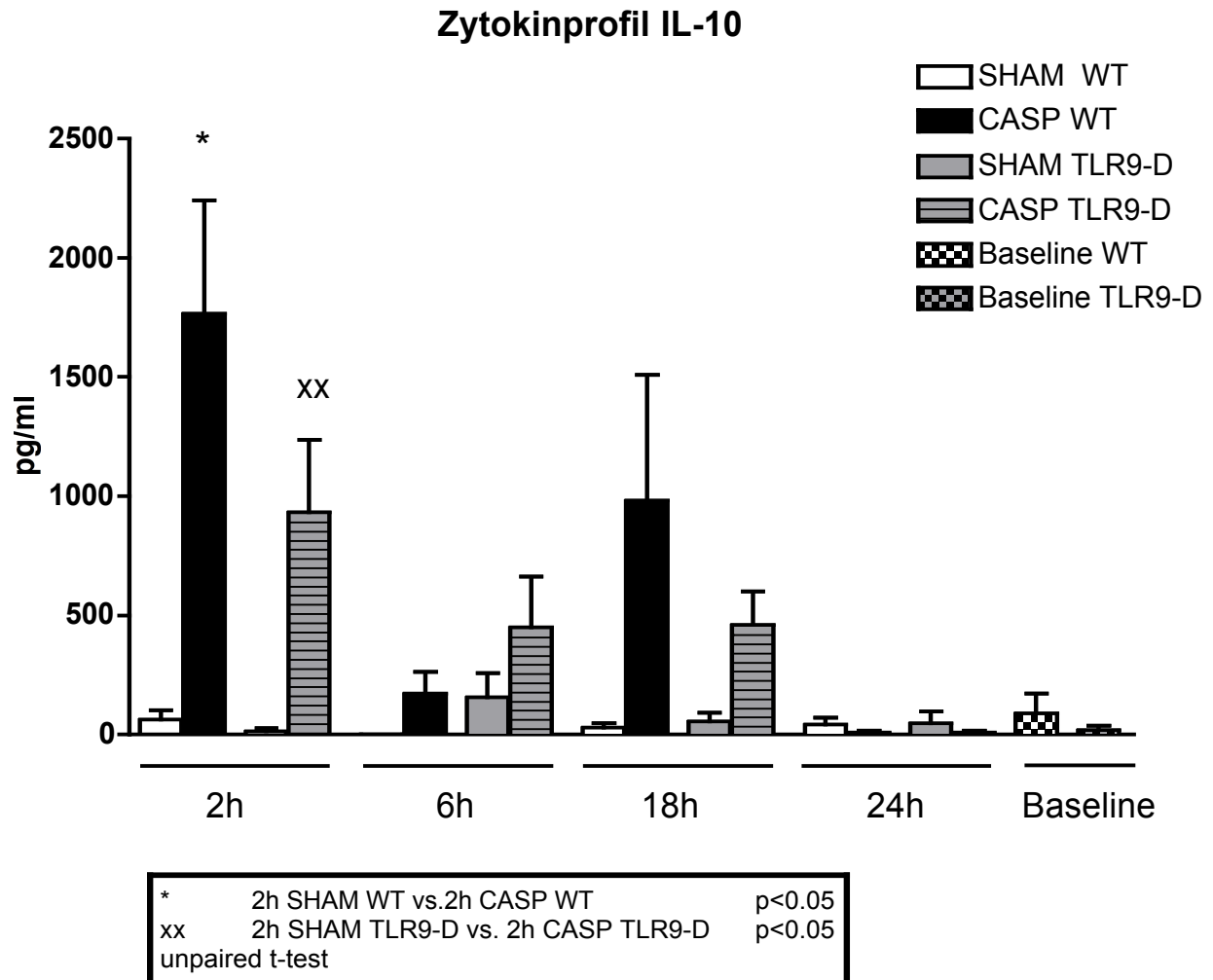
**Abb. 23:** Dargestellt ist die Zytokinkonzentration von TNF- $\alpha$  im Serum nach CASP / SHAM in pg/ $\mu$ l (Fluorescent Bead Immunoassay). A) Säulendiagramm. B) Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung der Werte und der n-Zahl.



**Abb. 24:** Dargestellt ist die Zytokinkonzentration von IL-1 $\beta$  im Serum nach CASP / SHAM in pg/ $\mu$ l (Fluorescent Bead Immunoassay).



**Abb. 25:** Dargestellt ist die Zytokinkonzentration von IFN- $\gamma$  im Serum nach CASP / SHAM in pg/ $\mu$ l (Fluorescent Bead Immunoassay).

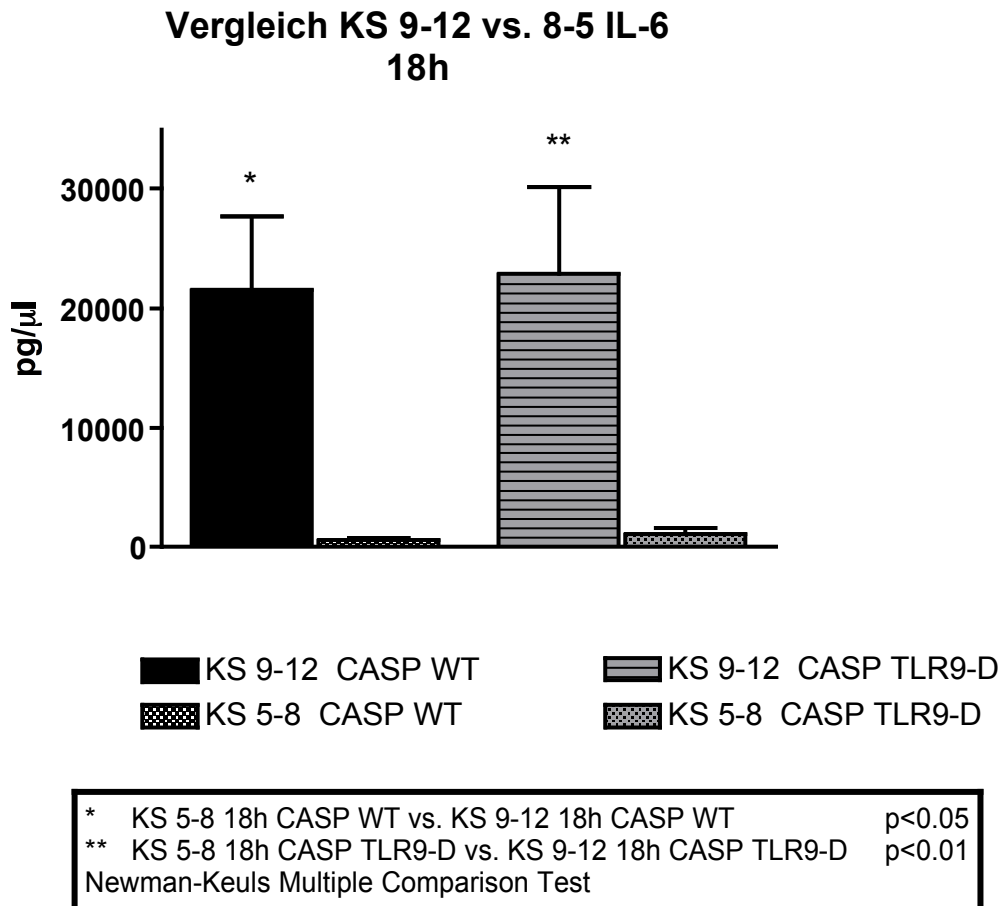


**Abb. 26:** Dargestellt ist die Zytokinkonzentration von IL-10 im Serum nach CASP / SHAM in pg/ $\mu$ l (Fluorescent Bead Immunoassay).

### 3.3.2 Zytokine und Klinischer Score

18 Stunden *post Op* zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Zytokinspiegeln der Tiere. Besonders schwer erkrankten Mäuse mit einem KS von 9-12. Sie zeigten signifikant mehr IL-6 im Serum, als die vergleichbare Gruppe an Mäusen mit einem KS von 5-8. Sowohl bei den WT als auch bei den TLR9-D Tieren (KS 9-12 WT CASP 18 h  $21535 \pm 6141$  vs. KS 5-8 WT CASP 18 h  $3900 \pm 3739$   $p < 0,05$  und KS 9-12 TLR9-D CASP 18 h  $22898 \pm 7227$  vs. KS 5-8 TLR9-D CASP 18h  $1100 \pm 499,2$   $p < 0,01$  Newman-Keuls Multiple Comparison Test) (Abb. 27).

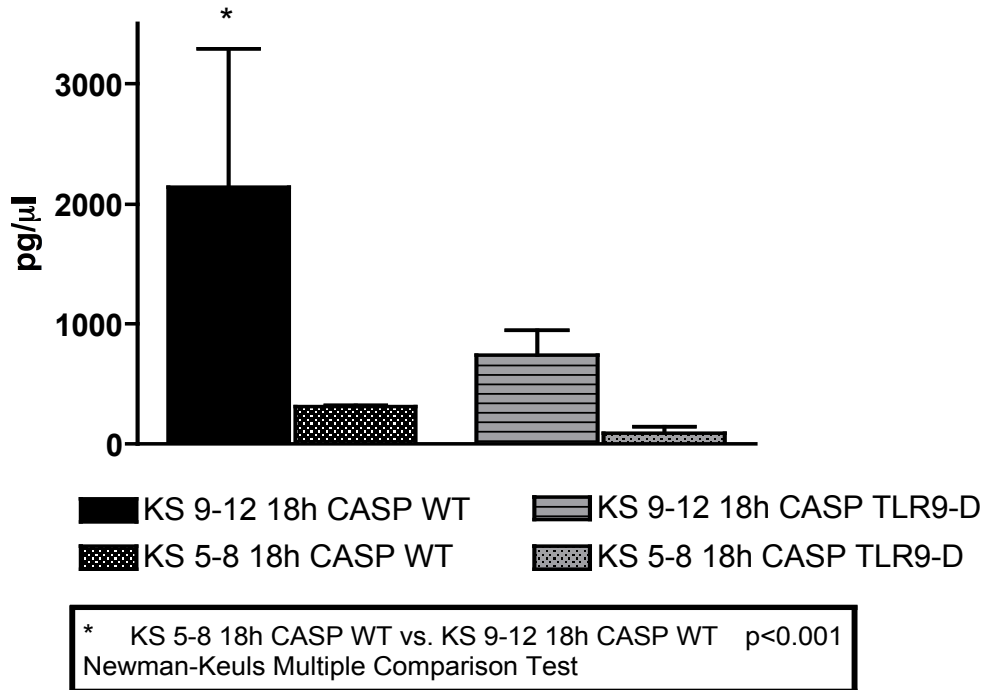




**Abb. 27:** Dargestellt ist die Konzentration von IL-6 im Serum in pg/μl für den Zeitpunkt 18 Stunden nach CASP Operation (Fluorescent Bead Immunoassay). Eingeteilt sind die Versuchstiere in 2 Gruppen. KS 9 - 12 und KS 5 - 8.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für IL-10. Allerdings zeigten hier nur die WT Tiere einen signifikanten Unterschied 18 h *post Op* zwischen den schwerkranken Tieren und den mittelkranken Tieren (KS 9-12 CASP WT 18 h 2143 ± 1145 vs. KS 5-8 CASP WT 18 h 309,6 ± 14,55 p < 0,001 Newman-Keuls Multiple Comparison Test). Auch bei den Knock-out Mäusen erkennt man diese Tendenz nach 18 h (Abb. 28). Zum Zeitpunkt 24 h sind diese Unterschiede nicht mehr feststellbar.

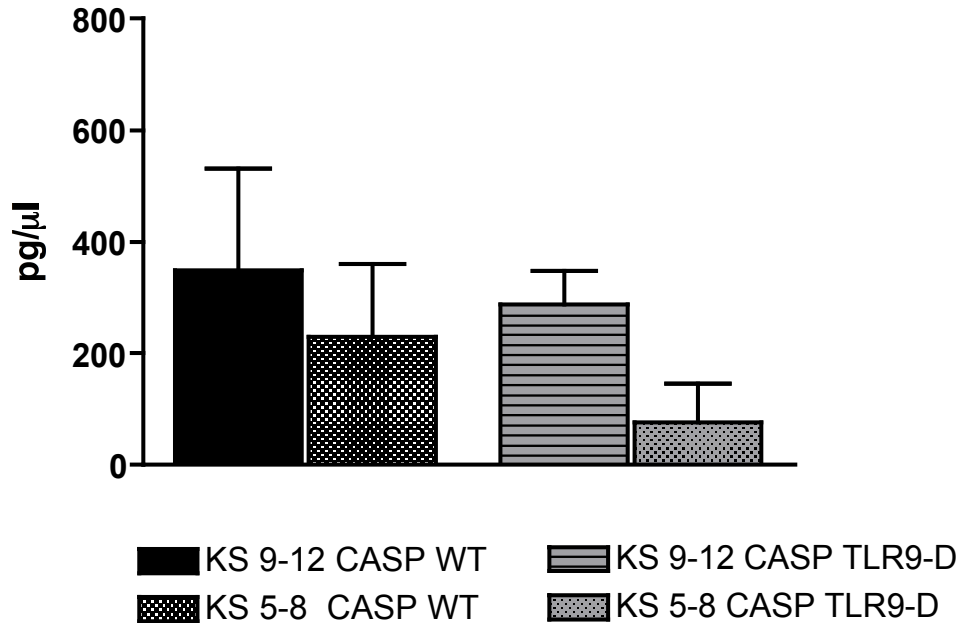
### Vergleich KS 9-12 vs. 8-5 IL-10 18h



**Abb. 28:** Dargestellt ist die Konzentration von IL-10 im Serum in pg/μl für den Zeitpunkt 18 Stunden nach CASP Operation (Fluorescent Bead Immunoassay). Eingeteilt sind die Versuchstiere in 2 Gruppen. KS 9 - 12 und KS 5 - 8.

Bei TNF-α ließen sich keine solchen Effekte darstellen, wie sie bei IL-6 oder IL-10 auftraten (Abb. 29). Alle Versuchstiere schienen ähnliche Mengen an TNF-α zu produzieren, SHAM oder CASP Behandlung, bewirkten keine Änderung der Zytokinmenge.

### Vergleich KS 9-12 vs. 8-5 TNF- $\alpha$ 18h

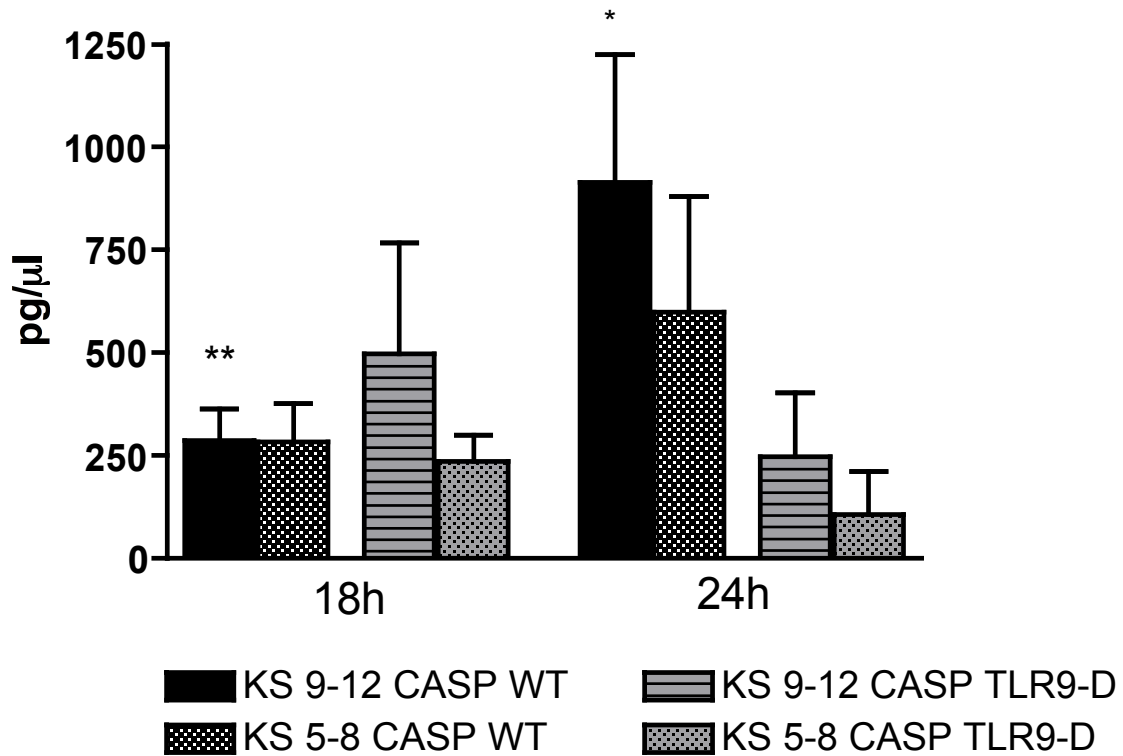


**Abb. 29:** Dargestellt ist die Konzentration von TNF- $\alpha$  im Serum in pg/ $\mu$ l für den Zeitpunkt 18 Stunden nach CASP Operation (Fluorescent Bead Immunoassay). Eingeteilt sind die Versuchstiere in 2 Gruppen. KS 9 - 12 und KS 5 - 8.

Bei dem Vergleich der Zytokine IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  zeigten die Gruppen KS 5 - 8 vs. KS 9 - 12 keine Unterschiede. In der Gruppe KS 9 - 12 WT zeigte sich dagegen ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten 18 h und 24 h, mit einem Anstieg der Zytokinkonzentrationen für IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$ . (IL-1 $\beta$ : KS 9-12 18 h CASP WT 286,6  $\pm$  75,49 vs. KS 9 - 12 24 h CASP WT 915,5  $\pm$  308,7 p < 0,01 und IFN- $\gamma$ : KS 9 - 12 18 h CASP WT 202,9  $\pm$  53,08 vs. KS 9 - 12 24 h CASP WT 3575  $\pm$  2033 p < 0,001 Newman-Keuls Multiple Comparison Test) (Abb. 30 und 31).

Ein weiteres gemeinsames Merkmal dieser beiden Zytokine ist die Signifikanz zwischen den Knock-out-Tieren und den Wildtyp-Tieren nach 24 Stunden. 24 h *post operationem* haben die Wildtypen mit einem KS von 9 - 12 deutliche mehr IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  im Serum als die gleiche Gruppe an TLR9-Defizienten (IL-1 $\beta$ : KS 9 - 12 24 h CASP WT 915,5  $\pm$  308,7 vs. KS 9 - 12 24 h CASP TLR9-D 245,6  $\pm$  156,0 p < 0,05 und IFN- $\gamma$ : KS 9 - 12 24 h CASP WT 3575  $\pm$  2033 vs. KS 9 - 12 24 h CASP TLR9-D 1014  $\pm$  544,8 p < 0,01 Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

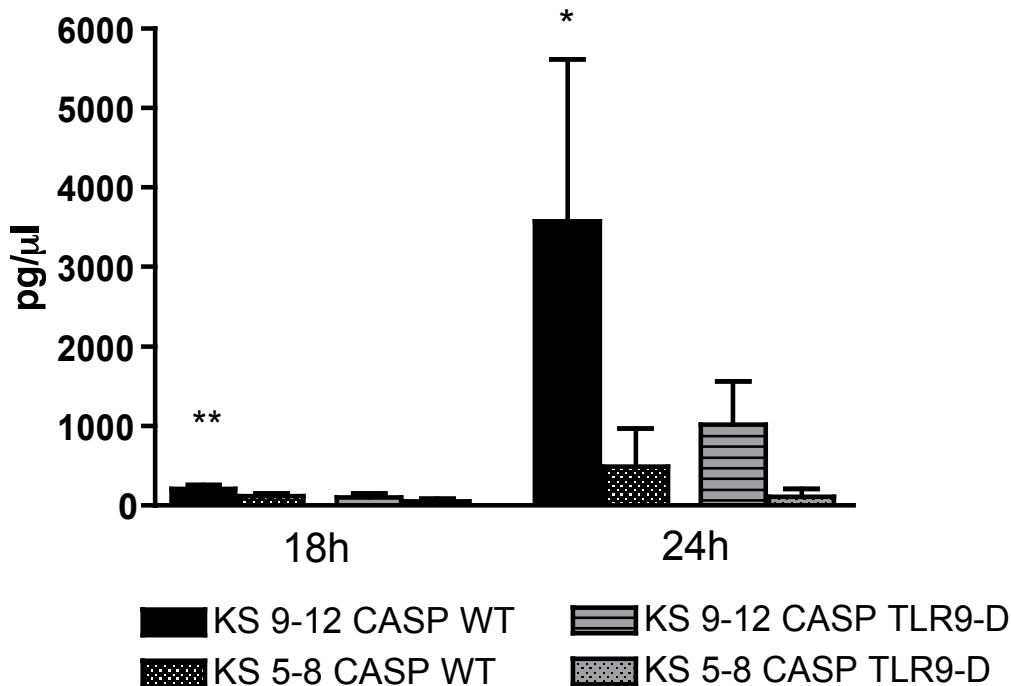
### Vergleich KS 9-12 vs. 8-5 IL-1 $\beta$



\* KS 9-12 24h CASP WT vs. KS 9-12 24h CASP TLR9-D  $p < 0.05$   
 \*\* KS 9-12 18h CASP WT vs. KS 9-12 24h CASP WT  $p < 0.01$   
 Newman-Keuls Multiple Comparison Test

**Abb. 30:** Dargestellt ist die Konzentration von IL-1 $\beta$  im Serum in pg/ $\mu$ l für die Zeitpunkte 18 und 24 Stunden nach CASP Operation (Fluorescent Bead Immunoassay). Eingeteilt wurde in 2 Gruppen. KS 9 - 12 und KS 5 - 8.

### Vergleich KS 9-12 vs. 8-5 IFN $\gamma$



* KS 5-8 24h CASP WT vs. KS 9-12 24h CASP WT	p < 0.01
KS 9-12 24h CASP TLR9-D vs. KS 9-12 24h CASP WT	p < 0.01
** KS 9-12 18h CASP WT vs. KS 9-12 24h CASP WT	p < 0.001
Newman-Keuls Multiple Comparison Test	

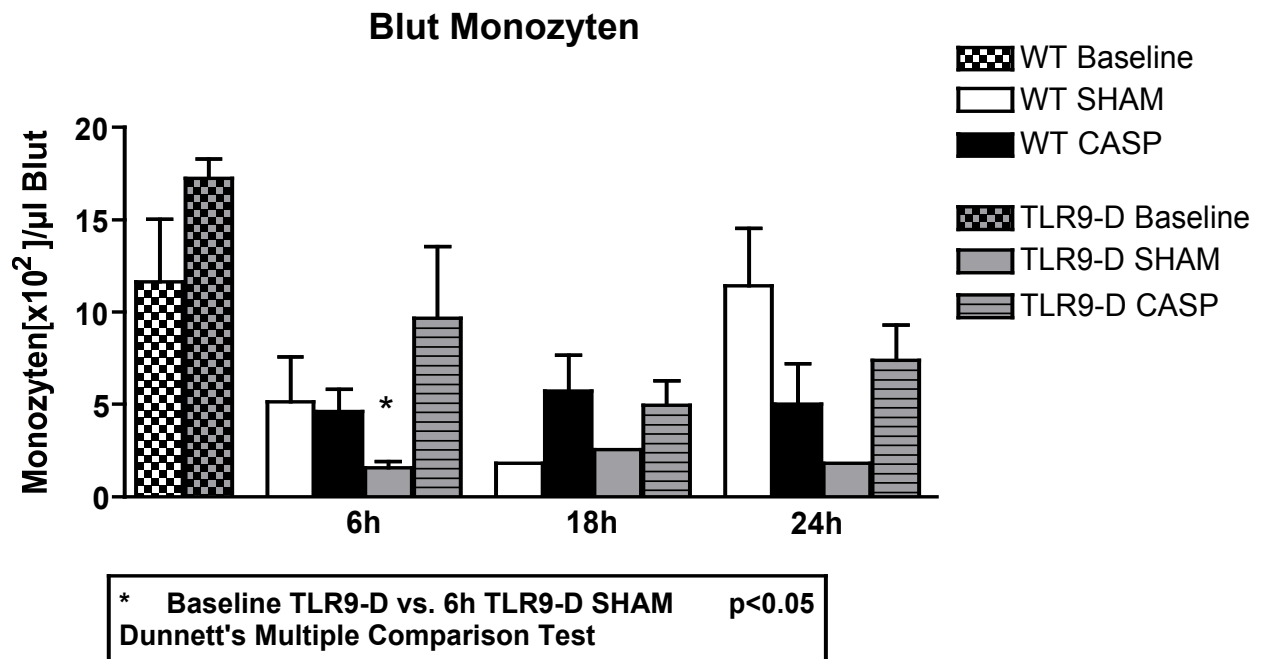
**Abb. 31:** Dargestellt ist die Konzentration von IFN- $\gamma$  im Serum in pg/ $\mu$ l für die Zeitpunkte 18 und 24 Stunden nach CASP Operation (Fluorescent Bead Immunoassay). Eingeteilt sind die Versuchstiere in 2 Gruppen. KS 9 - 12 und KS 5 - 8.

#### 3.3.3 Entzündungszellen im Blut

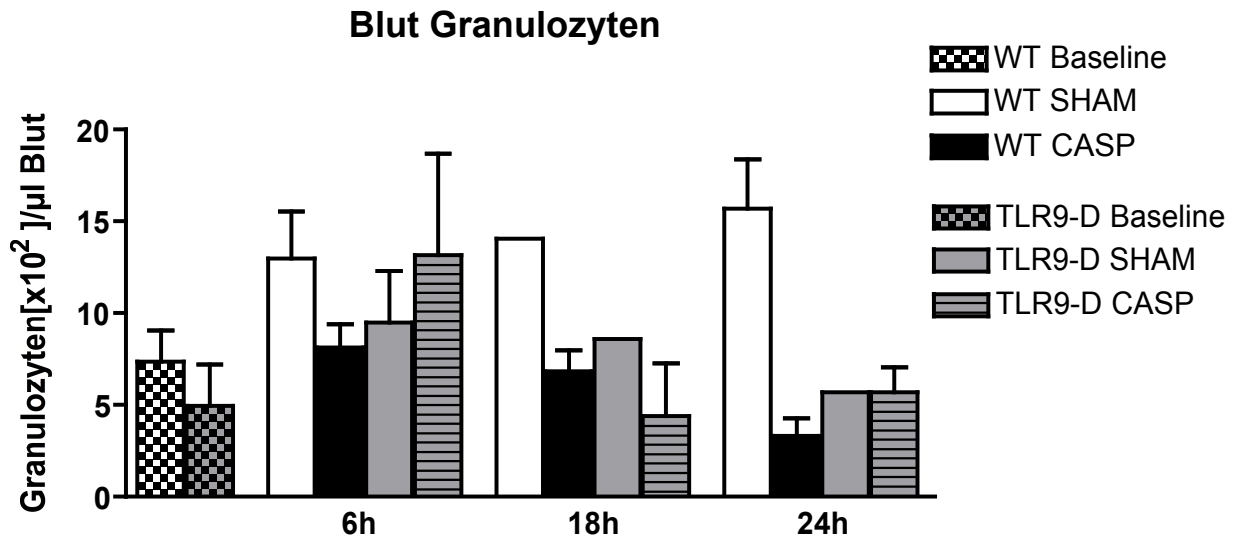
Um die systemische Inflammation weiter zu erfassen, bestimmten wir die Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten unserer Versuchstiere zu den Zeitpunkten 6, 18 und 24 Stunden nach CASP. Die Anzahl, der durch die Durchflusszytometrie ermittelten Entzündungszellen, ergab nur wenige signifikante Veränderungen. Die Monozyten neigten tendenziell eher zu einer Abnahme der Zahlanzahl im Blut nach CASP oder SHAM Operation. Signifikant verringert waren die 6 h TLR9-D SHAM Tiere gegenüber den Baseline TLR9-D Tieren, mit p < 0,05 im Dunnett's Multiple Comparison

Test (Baseline TLR9-D  $17,23 \pm 1,062$  und 6 h TLR9-D SHAM  $1,569 \pm 0,3425$ ) (Abb. 32).

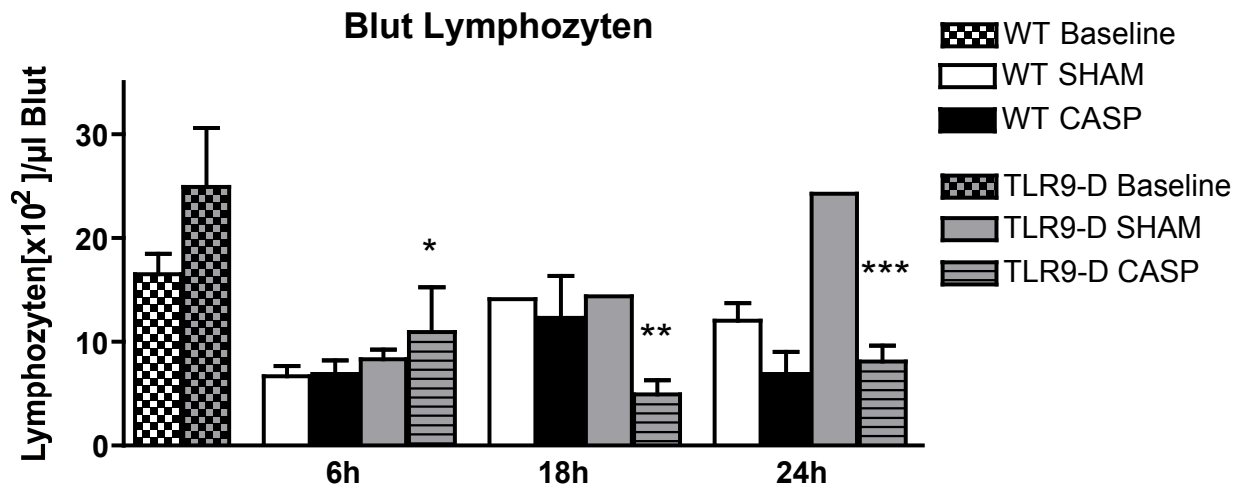
Die Granulozyten zeigten dahingegen kaum eine Änderung (Abb. 33). Anders verhielten sich die Lymphozyten die, wie die Monozyten, ebenfalls eine Abnahme der Zellzahl nach Operation zeigten, insbesondere die Knock-out Tiere im Vergleich zu Baseline TLR9-D nach 6, 18 und 24 Stunden (Baseline TLR9-D  $24,93 \pm 5,704$  vs. 6 h TLR9-D CASP  $10,92 \pm 4,354$  und Baseline TLR9-D  $24,93 \pm 5,704$  vs. 18h TLR9-D CASP  $4,947 \pm 1,353$  und Baseline TLR9-D  $24,93 \pm 5,704$  vs. 24 h TLR9-D CASP  $8,086 \pm 1,558$ ) (Abb. 34).



**Abb. 32:** Dargestellt ist die Anzahl der Monozyten im Blut nach CASP / SHAM, angegeben mal  $10^2$  pro  $\mu\text{l}$  Blut.



**Abb. 33:** Dargestellt ist die Anzahl der Granulozyten im Blut nach CASP / SHAM, angegeben mal  $10^2$  pro  $\mu\text{l}$  Blut.



*	Baseline TLR9-D vs. 6h TLR9-D CASP	p<0.05
**	Baseline TLR9-D vs. 18h TLR9-D CASP	p<0.05
***	Baseline TLR9-D vs. 24h TLR9-D CASP	p<0.01
Dunnnett's Multiple Comparison Test		

**Abb. 34:** Dargestellt ist die Anzahl der Lymphozyten im Blut nach CASP / SHAM, angegeben mal  $10^2$  pro  $\mu\text{l}$  Blut.

### 3.4 Inflammation im Lungengewebe

#### 3.4.1 Zytokinexpression im Lungengewebe

Im Fokus stand die Untersuchung der Auswirkungen einer polymikrobiellen Sepsis auf die Lunge. Aus diesem Grund bestimmten wir die Zytokinexpression im Lungengewebe mittels PCR aus Organproben. Hierbei analysierten wir die gleichen Zytokine, wie schon im Serum. IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Ebenso eruierten wir die Expression von Toll-like-Rezeptor 9 im Lungengewebe und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), die besonders von Immunzellen zur Abtötung von Bakterien gebildet wird (Feihl et al., 2001).

Im Gegensatz zur systemischen Inflammation konnten wir bei der Inflammation im Lungengewebe deutliche Unterschiede zwischen TLR9 defizienten Tieren und Wildtyptieren beobachten. 2 h nach CASP Operation exprimieren WT Tiere deutlich mehr Zytokine als die Knock-out Tiere.

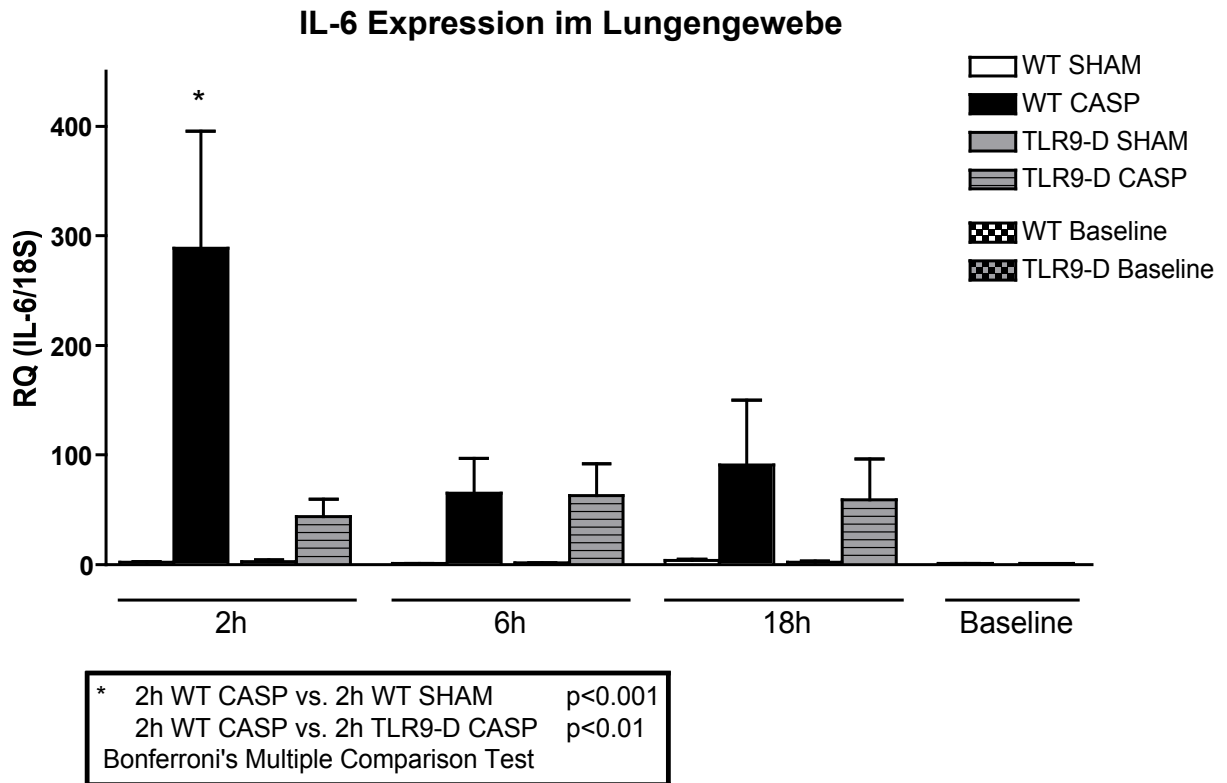
Die TNF- $\alpha$  Expression im Lungengewebe verhielt sich anders, als die TNF- $\alpha$ -Level im Serum der Versuchstiere. Konnten wir systemisch keine Differenzen im Anstieg der TNF- $\alpha$  Menge beobachten, so fällt im Lungengewebe eine gesteigerte Expression nach 2 h für die WT CASP Tiere auf, nicht aber für die Knock-out-Tiere (2 h WT CASP  $196,2 \pm 51,19$  vs. 2 h WT SHAM  $2,979 \pm 0,6701$   $p < 0,001$  und 2 h WT CASP  $196,2 \pm 51,19$  vs. 2 h TLR9-D CASP  $27,26 \pm 5,197$   $p < 0,001$  Bonferroni's Multiple Comparison Test) (Abb. 36).

Ebenso verhält es sich bei der IL-6 Expression im Lungengewebe. Auch hier zeigt sich, anders als im Serum, dass WT mehr IL-6 exprimieren als TLR-D zum Zeitpunkt 2 h *post* OP (2 h WT CASP  $289,0 \pm 106,6$  vs. 2 h WT SHAM  $2,145 \pm 0,2453$   $p < 0,001$  und 2 h WT CASP  $289,0 \pm 106,6$  vs. 2 h TLR9-D CASP  $43,73 \pm 15,73$   $p < 0,01$  Bonferroni's Multiple Comparison Test) (Abb. 35).

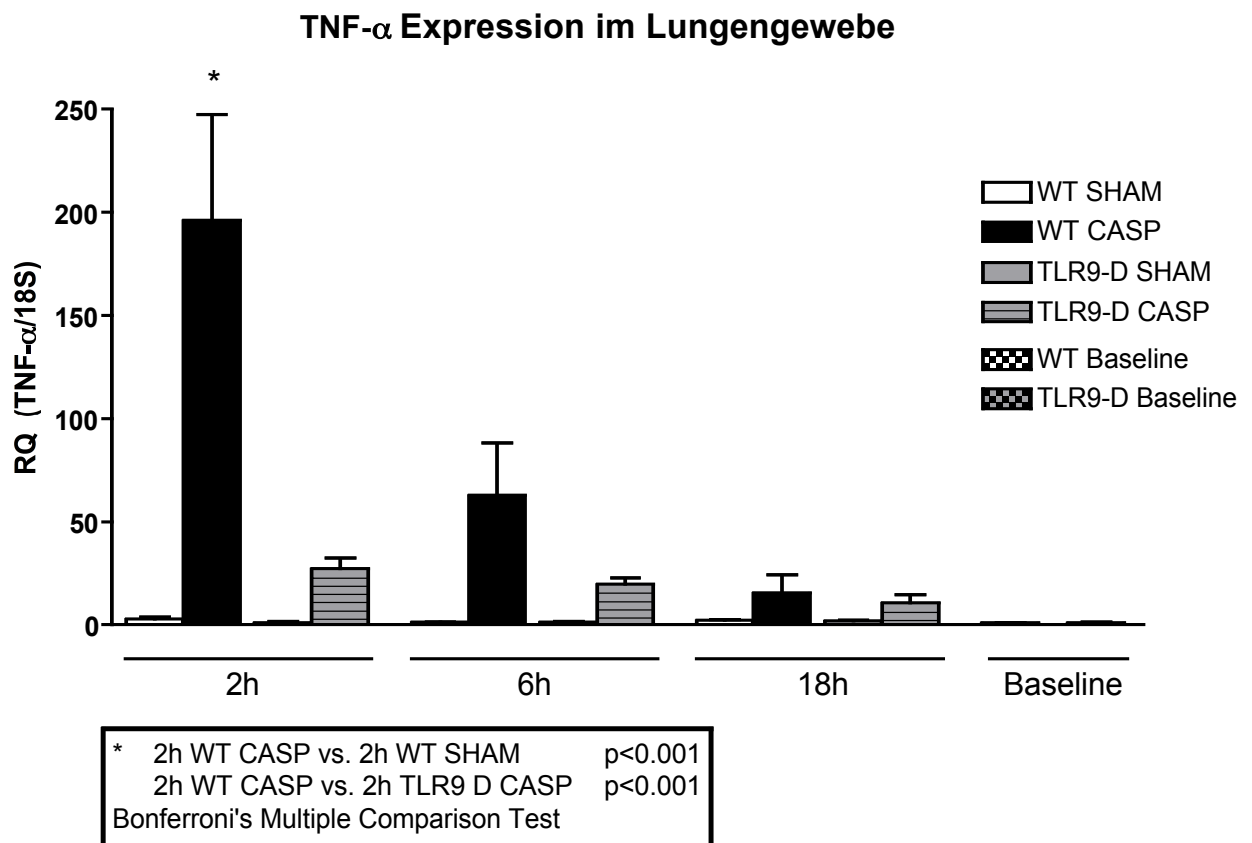
Das gleiche Bild ergibt die IL-1 $\beta$  Expression. Das Zytokinlevel im Serum war relativ homogen verteilt, sowohl zwischen den Gruppen, als auch im zeitlichen Verlauf. Bei der IL-1 $\beta$  Expression im Lungengewebe sahen wir allerdings signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt 2 h *post* OP, zwischen den WT und den TLR9 Knock-out Tieren. WT Tiere produzieren mehr mRNA als die Knock-outs (2 h WT CASP  $292,1 \pm 40,17$  vs. 2 h WT SHAM  $24,96 \pm 3,716$   $p < 0,001$  und 2 h WT CASP  $292,1 \pm 40,17$  vs.



2 h TLR9-D CASP  $55,75 \pm 6,845$   $p < 0,001$  Bonferroni's Multiple Comparison Test)  
(Abb. 37).

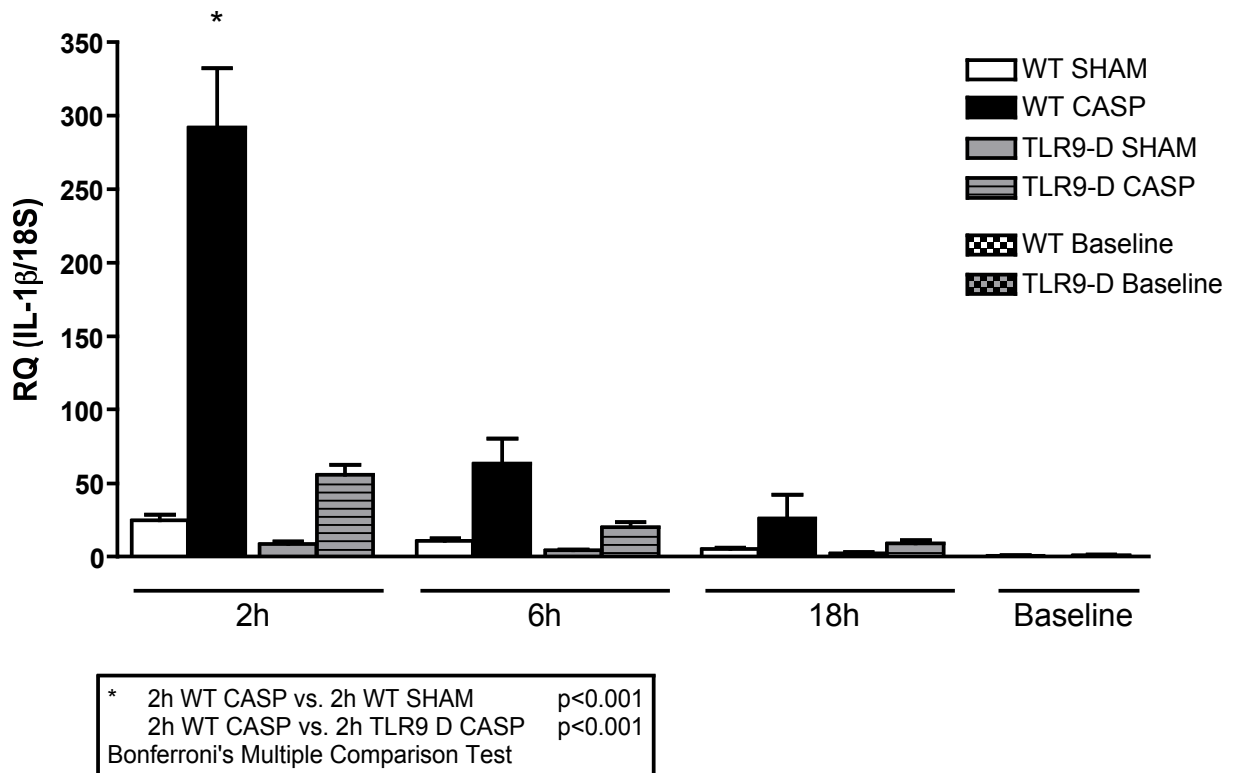


**Abb. 35:** Dargestellt ist die IL-6 Expression im Lungengewebe anhand des *Relativen Quotienten* (RQ) zum *Houskeeping Gen* 18S (IL-6/18S).



**Abb. 36:** Dargestellt ist die TNF- $\alpha$  Expression im Lungengewebe anhand des Relativen Quotienten (RQ) zum *Houskeeping* Gen 18S (TNF- $\alpha$ /18S).

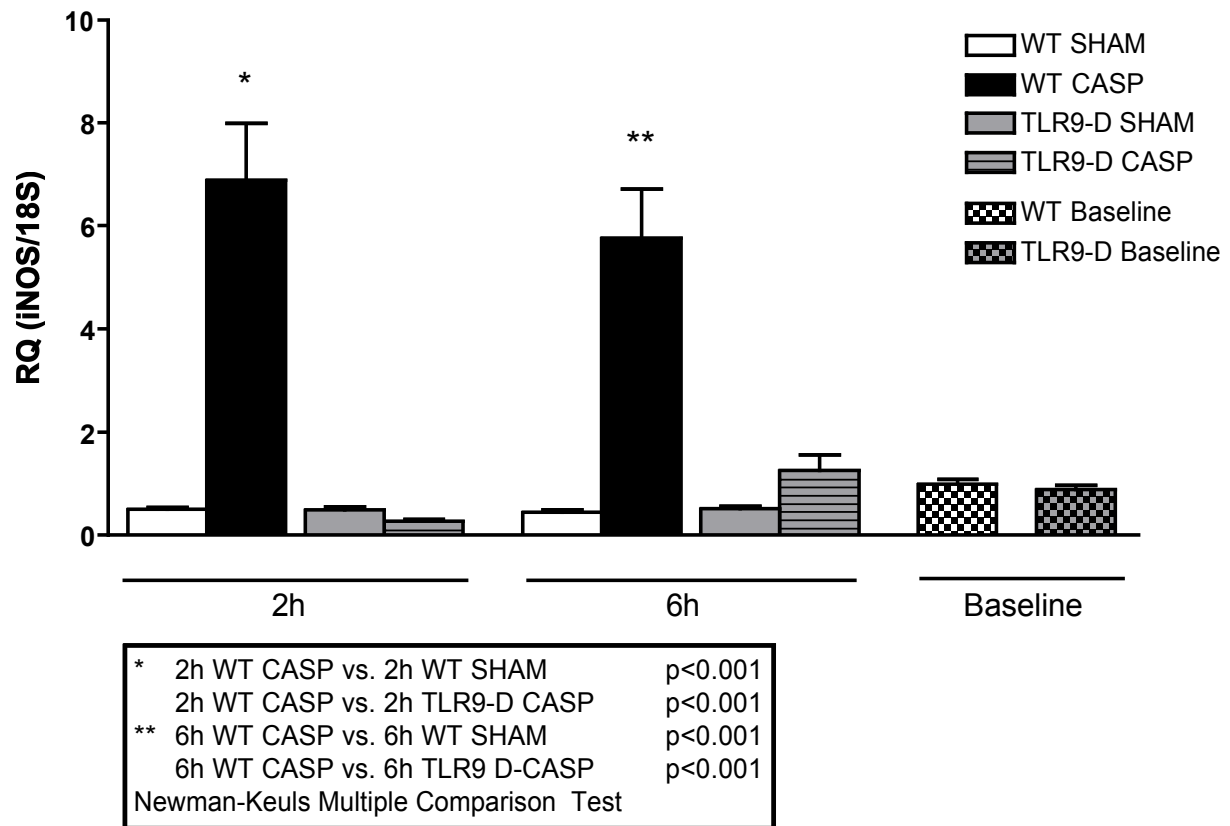
### IL-1 $\beta$ Expression im Lungengewebe



**Abb. 37:** Dargestellt ist die IL-1 $\beta$  Expression im Lungengewebe anhand des *Relativen Quotienten* (RQ) zum *Houskeeping* Gen 18S (IL-1 $\beta$ /18S).

Das Expressionsmuster von iNOS zeigte nicht nur eine signifikante Ungleichverteilung im zeitlichen Verlauf, sondern auch zwischen den WT und TLR9-D Tieren, sowohl zu den Zeitpunkten 2 als auch 6 Stunden postoperativ. Eine deutlichen Induktion von iNOS manifestierte sich nur bei den WT Tieren nach 2 Stunden und fiel nach 6 h wieder auf Baseline Niveau ab (2 h: 2 h WT CASP  $6,881 \pm 1,100$  vs. 2 h WT SHAM  $0,4981 \pm 0,03742$   $p < 0,001$  und 2 h WT CASP  $6,881 \pm 1,100$  vs. 2 h TLR9-D CASP  $0,2711 \pm 0,03550$   $p < 0,001$  6 h: 6 h WT CASP  $5,761 \pm 0,9511$  vs. 6 h WT SHAM  $0,4402 \pm 0,05276$  und 6 h WT CASP  $5,761 \pm 0,9511$  vs. 6 h TLR9-D CASP  $1,262 \pm 0,2930$   $p < 0,001$  Newman-Keuls Multiple Comparison Test) (Abb. 38).

### iNOS Expression im Lungengewebe

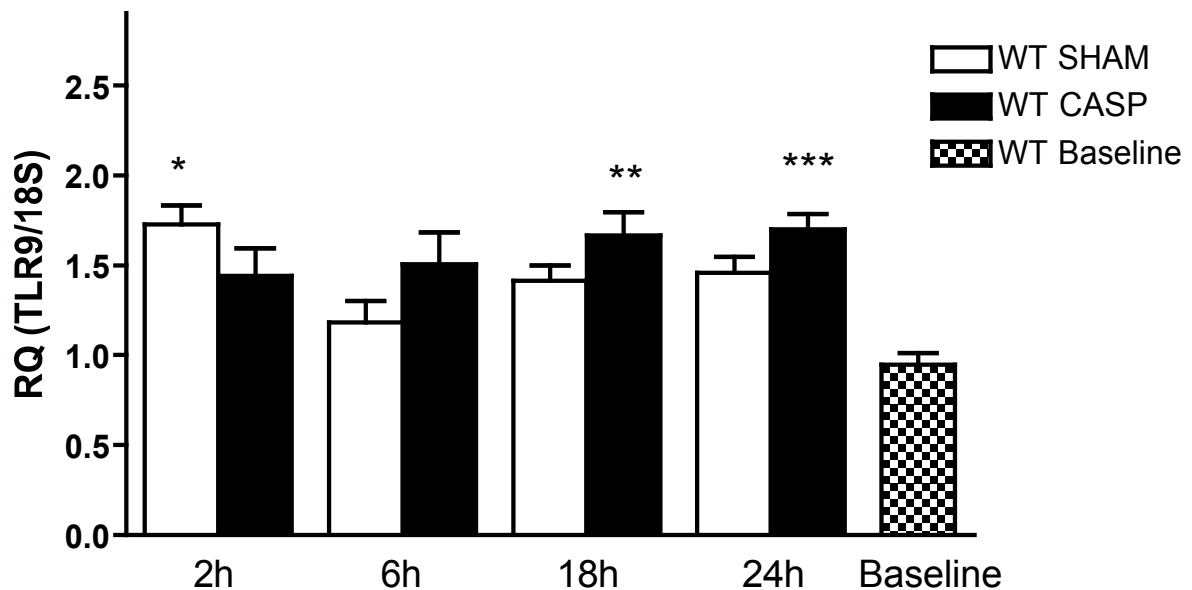


**Abb. 38:** Dargestellt ist die iNOS Expression im Lungengewebe anhand des Relativen Quotienten (RQ) zum *Houskeeping* Gen 18S (iNOS/18S).

Die TLR9 Expression wurde kaum verändert (Abb. 39). Lediglich der Vergleich zur Baseline der WT-Tiere ergab signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen. Die Werte der 2 h WT SHAM ( $p < 0,05$ ), der 18h WT CASP ( $p < 0,05$ ) und der 24 h WT CASP ( $p < 0,01$ ) waren Signifikant zur WT Baseline Gruppe. (Baseline WT  $0,9476 \pm 0,06175$  vs. 2 h WT SHAM  $1,726 \pm 0,1065$   $p < 0,05$  und Baseline WT  $0,9476 \pm 0,06175$  vs. 18 h WT CASP  $1,667 \pm 0,1265$   $p < 0,05$  und Baseline WT  $0,9476 \pm 0,06175$  vs. 24 h WT CASP  $1,702 \pm 0,08268$   $p < 0,01$  Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

Dabei zeigten auch die jeweiligen SHAM-Gruppen einen ähnlich hohen Anstieg, wie die jeweilige CASP-Gruppe. Es kommt demnach bei allen Gruppen zu keiner bedeutsamen Induktion von TLR9.

## TLR9 Expression im Lungengewebe



*	WT Baseline vs. 2h WT SHAM	p < 0.01
**	WT Baseline vs. 18h WT CASP	p < 0.05
***	WT Baseline vs. 24h WT CASP	p < 0.01
Dunnett's Multiple Comparison Test		

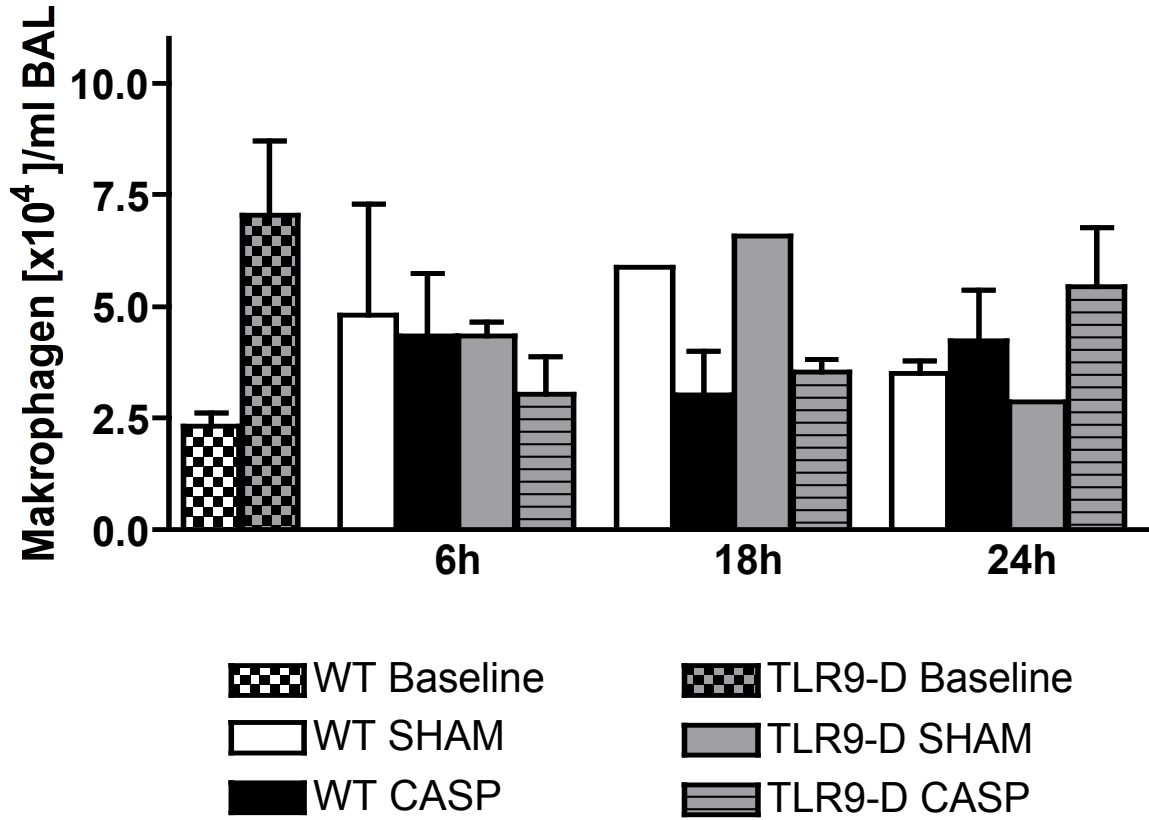
**Abb. 39:** Dargestellt ist die TLR9 Expression im Lungengewebe anhand des Relativen Quotienten (RQ) zum *Houskeeping* Gen 18S (TLR9/18S).

### 3.4.2 Entzündungszellen in der Bronchioalveolären Lavage

Weiterhin überprüften wir die Einwanderung von Entzündungszellen in die Alveolen, die auf ein entzündliches Geschehen hinweisen würden. Dafür analysierten wir die gewonnenen Bronchioalveoläre Lavageflüssigkeit mittels Durchflusszytometrie auf Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten.

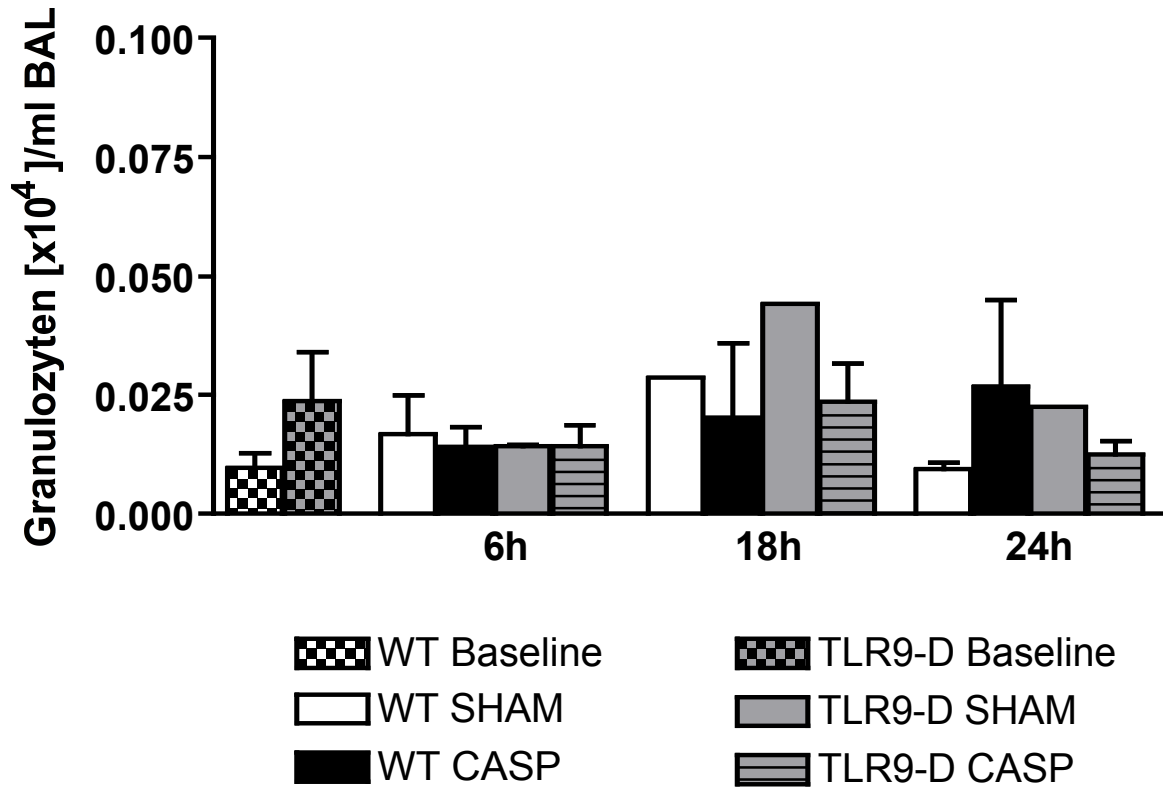
Dabei stellten wir auch hier keine signifikanten Veränderungen zwischen den Gruppen fest. Die Makrophagen-Anzahl in der BAL nahm weder zu noch ab, sondern blieb über die Zeit gesehen in allen Gruppen weitgehend konstant (Abb. 40). Analog verhielten sich die Anzahlen der Granulozyten und Lymphozyten (Abb. 41 und 42).

## BAL Makrophagen



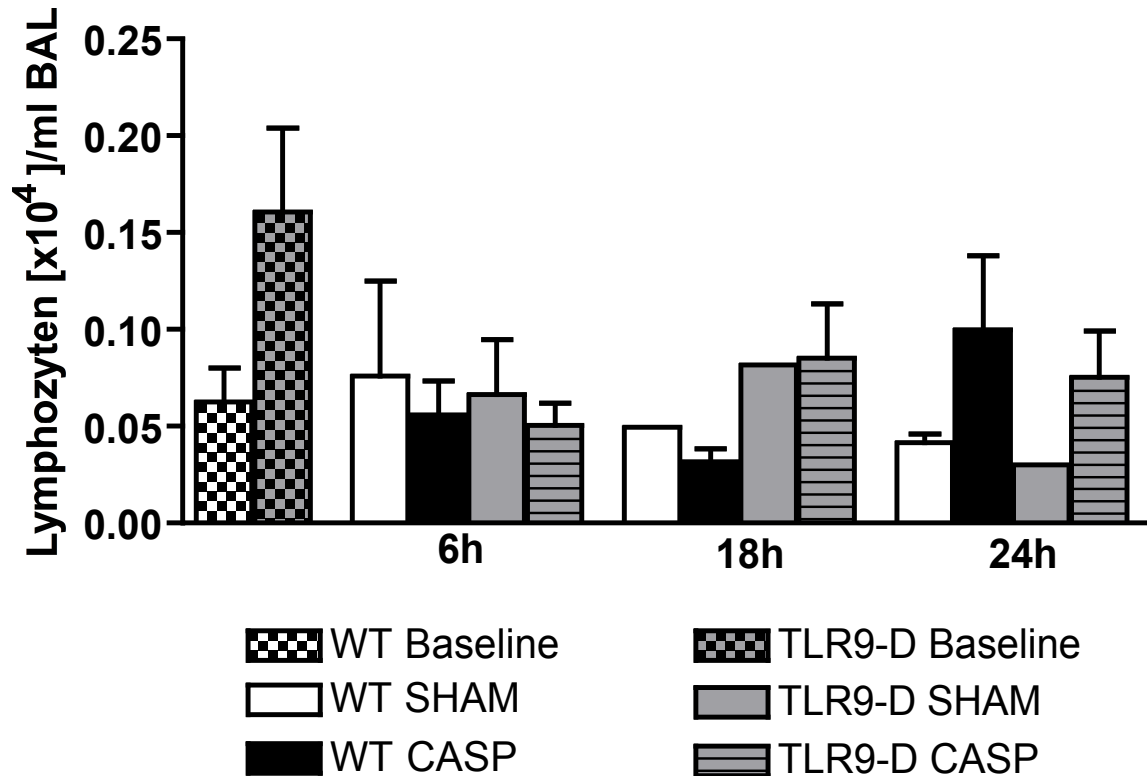
**Abb. 40:** Dargestellt ist die Anzahl der Makrophagen in der Bronchioalveolären Lavageflüssigkeit (mal  $10^4$  pro ml BALF), analysiert mittels Durchflusszytometrie.

## BAL Granulozyten



**Abb. 41:** Dargestellt ist die Anzahl der Granulozyten in der Bronchioalveolären Lavageflüssigkeit (mal  $10^4$  pro ml BALF), analysiert mittels Durchflusszytometrie.

## BAL Lymphozyten



**Abb. 42:** Dargestellt ist die Anzahl der Makrophagen in der Bronchioalveolären Lavageflüssigkeit (mal  $10^4$  pro ml BALF), analysiert mittels Durchflusszytometrie.

### 3.5 Lungenfunktionsparameter

Im folgenden Teil untersuchten wir die Auswirkungen der CASP induzierten Sepsis, auf die Lungenfunktion der Versuchstiere. Dafür bestimmten wir die *Compliance*, *Resistance* und *Permeabilität* wie im Methodenteil beschrieben (S. 55).

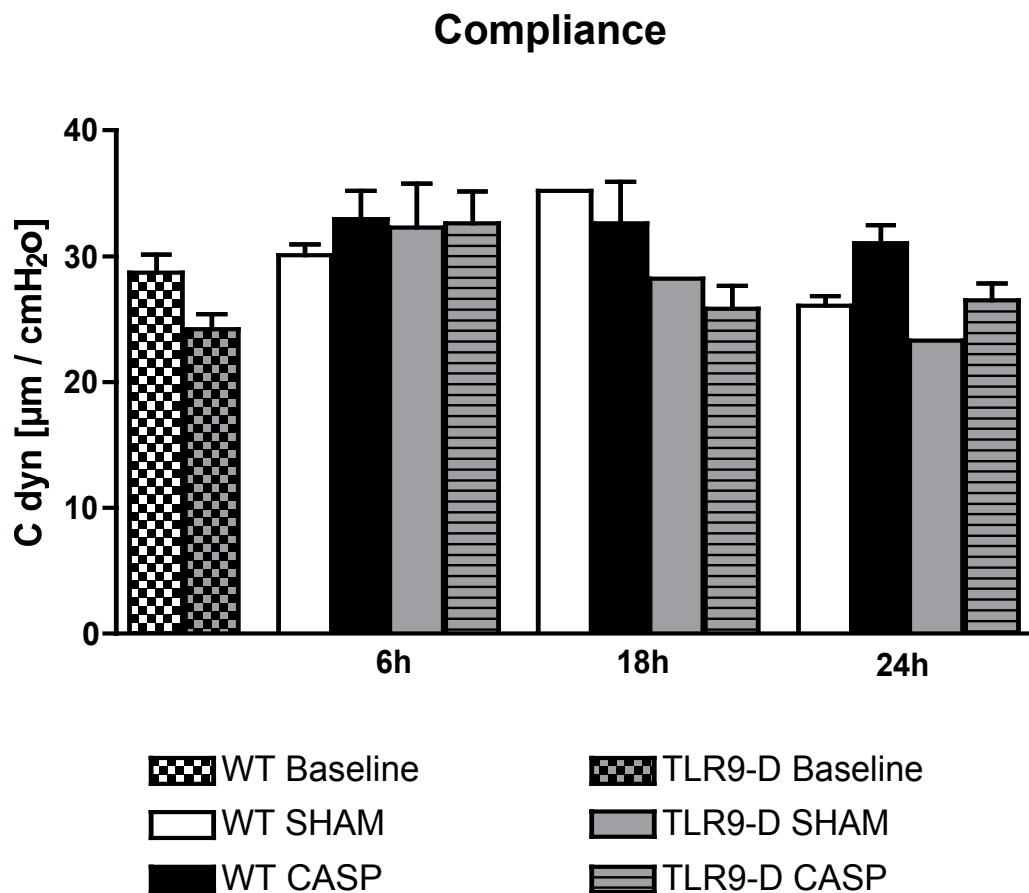
Insgesamt stellte sich kein Einfluss der Sepsis auf einen der drei bestimmten Parameter in unserem Tiermodell dar.

Die *Compliance* lag zwischen einem Minimal-Mittelwert von 23,28 [ $\mu\text{m}/\text{cmH}_2\text{O}$ ] (24 h TLR9-D SHAM) bis zu einem Maximal-Mittelwert von 35,2 [ $\mu\text{m}/\text{cmH}_2\text{O}$ ] (18 h WT SHAM). Es ließen sich keine Trends erkennen und alle Mittelwerte lagen in einer normalen Abweichung zur Baselinekontrolle (WT Baseline  $28,69 \pm 1,455$  und TLR9-D Baseline  $24,17 \pm 1,220$ ) (Abb. 43).

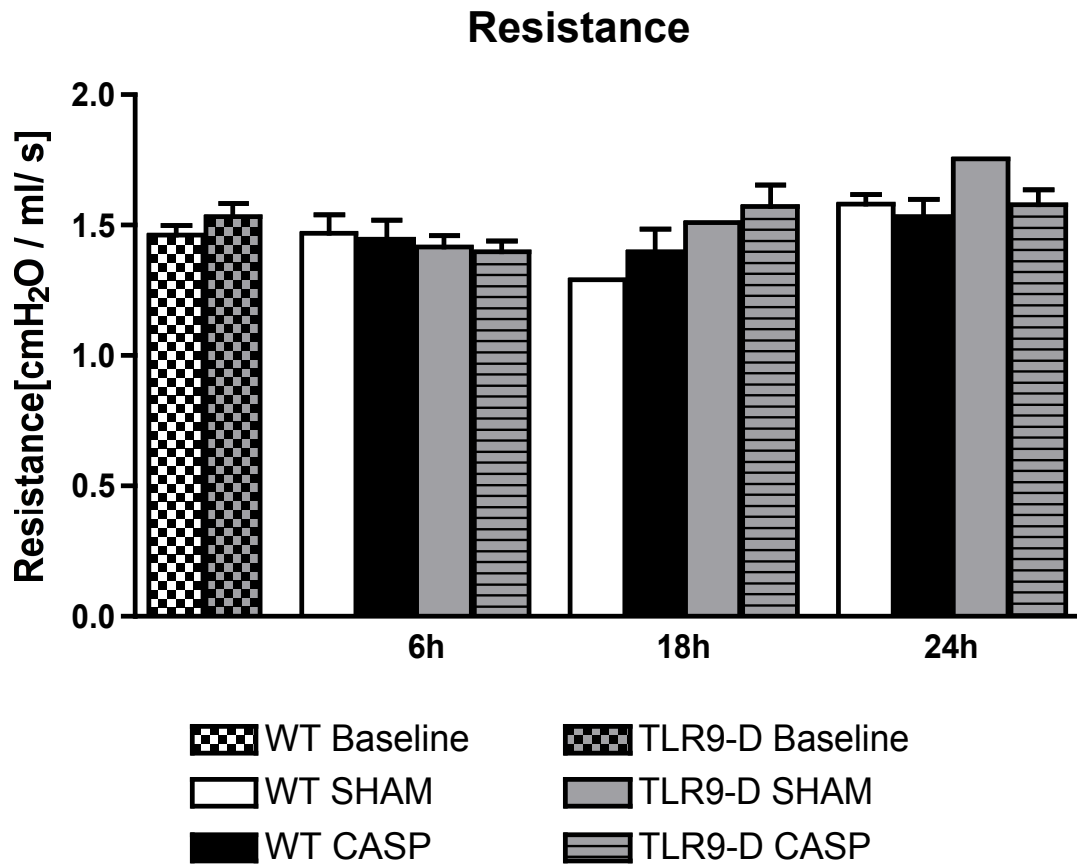


In gleicher Weise verhielt sich die *Resistance* der Versuchstiere. Auch hier fanden sich die Mittelwerte der einzelnen Gruppen im Rahmen einer normalen Abweichung zu den Baseline Kontroll-Tieren wieder (WT Baseline  $1,461 \pm 0,03742$  [cmH<sub>2</sub>O/ml/s] und TLR9-D Baseline  $1,530 \pm 0,05206$  [cmH<sub>2</sub>O/ml/s], Maximum MW  $1,754$  [cmH<sub>2</sub>O/ml/s] (24 h TLR9-D SHAM), Minimum MW  $1,289$  [cmH<sub>2</sub>O/ml/s] (18 h WT SHAM) ) (Abb. 44).

Die *Permeabilität* der Lunge der Mäuse verhielt sich sehr ähnlich. Hier kam es, aufgrund der breiten Streuung der Werte, zu keinen relevanten Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen. Des Weiteren lagen die Mittelwerte relativ nah an denen der Baseline Kontroll-Gruppen, die die physiologische *Permeabilität* der Lunge dieser Versuchstiere widerspiegelt (Baseline WT  $0,2289$  HSA [BAL/Plasma x 1000]  $\pm 0,02284$ , Baseline TLR9-D  $0,3495$  HSA [BAL/Plasma x 1000]  $\pm 0,1206$ ) (Abb. 45)

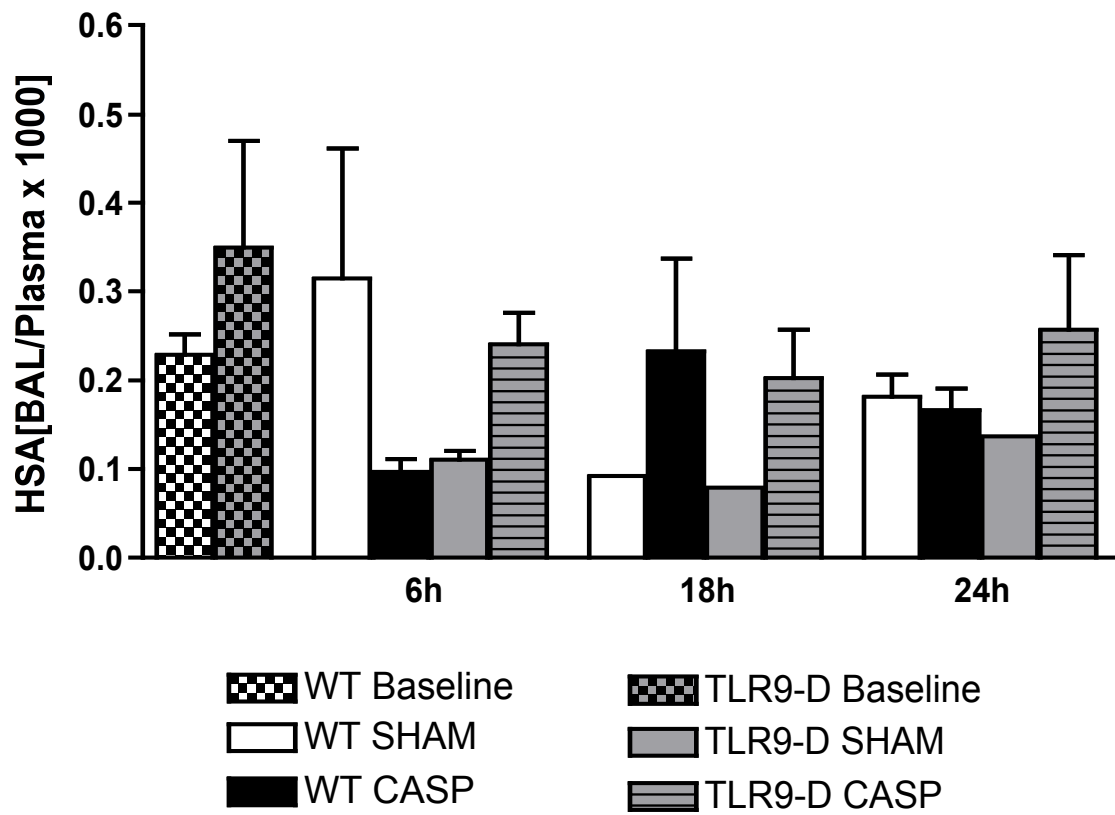


**Abb. 43:** Dargestellt ist die *Compliance* der Lunge (C dyn) in [ $\mu\text{m}/\text{cmH}_2\text{O}$ ] der jeweiligen Versuchsgruppen. A) Balkendiagramm. B) Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung und der Endzahl.



**Abb. 44:** Abgebildet ist die *Resistance* der Lunge in  $[\text{cmH}_2\text{O/ml/s}]$  der jeweiligen Versuchsgruppen. A) Balkendiagramm. B) Dotplot-Diagramm zur Veranschaulichung der Streuung und der Endzahl.

## Permeabilität



**Abb. 45:** Abgebildet ist die Permeabilität der Lunge in Form des HSA-Quotienten der BALF zum Plasma x 1000 der jeweiligen Versuchsgruppen.

## 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle von TLR9 für die Entstehung einer pulmonalen Inflammation im Rahmen der polymikrobiellen Sepsis *in vivo*.

### 4.1 Interpretation und Diskussion der Ergebnisse

#### 4.1.1 Verifizierung der polymikrobiellen Sepsis

##### 4.1.1.1 Die Klinische Bewertung der Versuchstiere

Das Vorliegen einer Sepsis und auch die weitere Unterteilung der Schweregrade dieser Erkrankung wird mit Hilfe von Messgrößen wie Herzfrequenz, Leukozytenzahl etc. definiert. Analog zu diesem Vorgehen wurden auch für murine Sepsismodelle Scoring-Systeme entwickelt, die den Zustand der Tiere beurteilen können. So beruht der Sepsis-Score von Zantl auf Messgrößen wie Herz- und Atemfrequenz und dem Gewichtsverlust und der Aktivität der Tiere (Zantl et al., 1998). Lustig et al. zeichneten den arteriellen Druck, den Blutdruck und die Herzfrequenz im CASP-Modell für Ratten auf. Für beide Vorgehensweisen sind invasive Messmethoden notwendig, deren Anwendung z.T. erst in Vollnarkose möglich ist und Narkose-abhängig bestimmte Parameter verfälschen kann (Lustig et al., 2007). Vorteile bieten hier alternativ nicht-invasive Scoring Systeme, z. B. wie der von Barkhausen benutzte Aktivitäts-Score, der allerdings wichtige Parameter wie den leicht zu evaluierenden Gewichtsverlust der Tiere und den Fellzustand nicht mit einschließt und somit für die Gesamtbeurteilung des Krankheitszustandes etwas zu kurz greift (Barkhausen et al., 2011). Auch die isolierte Angabe des Überlebens im Sepsismodell liefert zwar einen wichtigen Endpunkt, um einen Erfolg möglicher Interventionen zu beurteilen, er gibt aber keine relevanten Informationen über den Krankheitsverlauf selbst und erlaubt oft keine Rückschlüsse auf das individuelle Versuchstier (Al-Banna et al., 2013).

Eine Anfang dieses Jahres veröffentlichte Publikation beschreibt dagegen einen Score, *mouse clinical assessment score for sepsis* (M-CLASS), der die klinischen Ausprägung der Sepsis bei Mäusen bewerten soll (Huet et al., 2013). Dabei wird besonders auf die Fellpflege, die Aktivität und Körperhaltung, das Augen öffnen,

Thoraxbewegungen, zirpende Thoraxgeräusche und einem Gewichtsverlust der Versuchstiere geachtet. Sie werden je nach Ausprägung einem Zahlenwert von 1 (normal) bis 4 (moribund) zugeordnet. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, dass sich die Tiere nicht nur klinisch voneinander unterscheiden, sondern auch in der Ausprägung ihrer Zytokinlevel im Serum. Moribunde Tiere haben signifikant höhere Level an IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 als Tiere mit einem Score von 2 oder 3.

Einen ähnlichen Score entwickelten wir für unsere Versuchsreihe, den klinischen Score für septische Mäuse (KS-SM) und kommen zu ähnlichen Ergebnissen wie Huet et al. (2013) der vorgestellte Klinische Score liefert nicht-invasiv und einfach durchführbar umfassende Informationen zum klinischen Zustand der Tiere und korrelierte zudem positiv mit der Stärke der systemischen Inflammation. Zudem bietet er den Vorteil, dass eine Beurteilung der Versuchstiere auch über einen längeren Zeitraum möglich ist. So konnten wir klar kranke Tiere 18 h und 24 h nach CASP von nicht kranken Tieren unterscheiden ohne invasive Messungen vorzunehmen. Das von uns eingesetzte Scoring-Verfahren ist somit nicht allein auf die CASP beschränkt, sondern auch in anderen murinen Sepsis-Modellen anwendbar.

Die Arbeitsgruppe um Miao et al. (2012) unterstreichen die Wichtigkeit der Normothermie als Outcome-Faktor im CASP-Modell. Eine Hypothermie größer 32 °C wurde mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 0 % angegeben. Allerdings wird in dieser Publikation auf keine weiteren Kriterien zur Krankheitsbeschreibung der Versuchstiere eingegangen. Auch in unseren Versuchen zeigten Tiere im Verlauf nach der CASP Operation eine z.T. schwere Hypothermie. Diese korrelierte zudem mit dem von uns verwendeten Klinischen Score: Mäuse mit einem hohen KS-Wert zeigten auch deutlichere Hypothermien als mit einem KS von 0 - 4 oder 5 - 8. Nach 18 h war dieser Effekt besonders deutlich erkennbar (Abb. 18) und konnte sowohl in WT- als auch in TLR9-D Mäusen demonstriert werden. Aufgrund dieser Daten ist geplant, die Körpertemperatur direkt in den von uns entwickelten Klinischen Score einfließen zu lassen.

Die Anwendung des Klinischen Scores ermöglicht außerdem die Überwachung der Operationsqualität: CASP-operierte Tiere zeigten im Gegensatz zu Sham operierten Tieren eindeutige Krankheitszeichen mit einem durchschnittlichen KS von 8 - 9 18 und 24 Stunden nach dem Eingriff. Dies konnte sowohl für WT als auch für TLR9-D

Mäuse gezeigt werden (Abb. 14). Zeigten Tiere diesen typischen Verlauf nicht und verhielten sich wie die Sham-Gruppe (KS MW 1,344), wies dies auf ein technisches Problem, wie z. B. eine Verlegung des eingenähten Stents hin: eine Liberation von Bakterien war in diesen Tieren nicht möglich und sie entwickelten keine Sepsiszeichen.

#### 4.1.1.2 Intraperitoneale Bakterienfreisetzung

Neben diesem indirekten Hinweis auf eine erfolgreiche Bakterienfreisetzung durch den Klinischen Score wurde in der vorliegenden Arbeit die intraperitoneale Bakterienlast durch Nachweis der CFU's auf MacConkey Agar direkt bestimmt. So konnte zum einen eine ausreichende Qualität des operativen Eingriffs überprüft werden: erst ein kontinuierlicher Anstieg der Bakterienzahl spiegelt das klinische Bild einer von der Peritonealhöhle ausgehenden polymikrobiellen Sepsis wider (Dejager et al., 2011). Zum anderen hängt die Interpretation der systemischen und pulmonalen inflammatorischen Effekte nach CASP entscheidend von der Zusammensetzung des Sepsis-induzierenden Stimulus ab. In Vorarbeiten unserer eigenen Arbeitsgruppe (Lohner et al. 2013) konnte bereits eine Differenzierung der Darmflora in den von uns verwendeten Mäusen durchgeführt werden. Hierbei ergab sich kein Unterschied in der Menge von gramnegativen und grampositiven Bakterien im Darm von WT- und TLR9-D Mäusen: die Fäzes von WT Mäusen enthielten kleinere Mengen von *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum* und *Lactobacillus*. In TLR9-D Tieren wurden geringere Mengen von *Staphylococcus simulans*, *Lactobacillus*, und *Enterococcus casseliflavus/gallinarum* dokumentiert. Sowohl im Darm von WT als von TLR9-D Mäusen fand sich somit zum größten Teil eine Besiedelung mit Gram-negativen Bakterien und nur geringe Unterschiede in den bakteriellen Subpopulationen. Zur Vereinfachung wurde in der hier vorliegenden Arbeit entsprechend der Nachweis von gramnegativen aeroben Bakterien als beweisend für eine CASP-induzierte bakterielle Besiedelung der Peritonealhöhle festgelegt, d.h. lediglich ein Nachweis mit MacConkey Agar durchgeführt. Wir konnten eine stetige Zunahme der Bakterienzahl in der Peritoneallavage zwischen 2 und 24 Stunden zeigen. WT-Tiere und TLR9-D Mäuse zeigten hierbei ähnliche Ergebnisse. Wir bestätigen somit die

Vorergebnisse von Lohner et al. (2013). Zusätzlich konnten wir einen signifikanten Unterschied zwischen der Bakterienlast stark erkrankter WT-Tiere (KS 9 - 12) im Vergleich zu nicht erkrankten WT-Mäusen (KS 0 - 4) zeigen (Abb. 21). Tendenziell galt dies auch für TLR9-D Mäuse, wenn auch nicht signifikant (Abb. 21).

Insgesamt widersprechen diese Ergebnisse, wie auch die Daten von Lohner et al., sowie Ehrentraut et al. der Arbeit von Plitas et al., in der in einem murinen Modell der polymikrobiellen Sepsis in TLR9-D Tieren weniger CFU's in der Peritoneallavage nachweisbar waren (Ehrentraut et al., 2012; Plitas et al., 2008). Diese Unterschiede lassen sich durch die unterschiedlichen verwendeten Sepsismodelle (CLP vs. CASP) oder Nährmedien (*brain-heart infusion* (BHI) Agar vs. MacConkey Agar) erklären: Die von Plitas et al. verwendete CLP-Operation führt häufig zu einer raschen Abszessbildung mit Lokalisierung der Entzündung, die einen weiteren CFU Anstieg verhindert (Maier et al., 2004). Auf der anderen Seite ist es somit vorstellbar, dass geringe Unterschiede in der abdominalen bakteriellen *Clearance* nach der CLP-induzierten kurzzeitigen Bakterienfreisetzung einfacher zu detektieren sind als die kumulative Bakterienlast nach CASP-Operation. Die zeitlich begrenzte Bakterienliberation nach CLP spiegelt sich in der dort zu beobachtenden frühen Induktion von Zytokinen wider, die Williams et al. in ihrer Publikation bereits beschrieben haben (Williams et al., 1999). Dies hat dazu geführt, dass Sepsis-induzierte Effekte im CLP-Modell zu früheren Zeitpunkten untersucht worden sind als nach einer CASP Operation (Gao et al., 2013; Ha et al., 2010).

Wie bereits oben erwähnt erfolgt auch der Nachweis der bakteriellen Last in Modellen der polymikrobiellen Sepsis auf sehr unterschiedliche Weise und kann so falsch unterschiedliche Ergebnisse bei eigentlich gleichem Stimulus zur Folge haben. So verwenden Maier et al. lediglich Columbia Blut Agar (Maier et al., 2004) andere zusätzlich MacConkey Agar zum Abdecken des negativen Spektrums (Ehrentraut et al., 2012; Lohner et al., 2013; Zantl et al., 1998). Interessanterweise finden sich nahezu keine Arbeiten, die in murinen Modellen der polymikrobiellen Sepsis auch das anaerobe Keimspektrum genauer untersuchen. Eine Erklärung hierfür ist der enorme Aufwand bei der Probengewinnung und anschließenden Analyse der Keime. Fuchs (2010) analysierte im Rahmen der *Toxoplasma gondii* induzierten Ileitis auch die natürliche Darmflora von C57BL/6 Mäusen, die im Rahmen unserer Experimente

ebenfalls verwendet wurden. Dabei zeigte sich ein breites Bakterienspektrum: aerobe gramnegative Stäbchen, die ausschließlich aus *E.coli* bestanden, grampositive aerobe Bakterien, hauptsächlich Lactobacillen und *Enterococcus spp.*, aber auch ein großer Anteil an anaeroben Keimen, wie die gramnegative *Bacterioides spp.*, *Prevotella spp.* und einer Gruppe grampositiver, wie *Clostridium spp.* und *Eubacterium spp.* Dies zeigt, dass tatsächlich ein erheblicher Anteil von anaeroben Bakterien in der murinen Darmflora vorhanden ist, der *bis dato* in nahezu allen Verfahren zum Nachweis des polymikrobiellen Stimulus keine Rolle gespielt hat. Gerade diese „Lücke“ im Keimnachweis könnte aber die Beobachtung erklären, dass einige Tiere nach CASP-Operation klinische Zeichen einer schweren Erkrankung aufwiesen, ein Keimnachweis mit MacConkey Agar jedoch nicht gelang. In Anschlussversuchen prüft unsere Arbeitsgruppe deshalb auch das fakultativ anaerobe Erregerspektrum im Darm der Mäuse, um den Stimulus der CASP noch genauer zu definieren. Zusätzlich bleibt zu bedenken, dass auch andere Einflüsse wie die Nahrung, Haltung, Alter und Geschlecht der Tiere u. v. a. zu differenter Bakterienflora führen können. Diese Einflussgrößen wurden in der hier vorgelegten Arbeit nicht berücksichtigt und sind ebenfalls Gegenstand laufender Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe.



### **4.1.1.3 Systemische Inflammation**

#### **4.1.1.3.1 Zytokine**

Die CASP-Operation induzierte zu den gemessenen Zeitpunkten sowohl im Serum von WT-Mäusen als auch in TLR9-D Tieren signifikant höhere Zytokin Proteinspiegel als in Sham-operierten Tieren (Kap. 3.3.1.). Die CASP löste somit zuverlässig eine systemische Entzündungsreaktion in beiden Mauslinien aus. Ähnliche Beobachtungen konnten auch andere Arbeitsgruppen machen (Maier et al., 2004; Traeger et al., 2010), allerdings waren in diesen Studien die Zytokinmengen für IL-10 und TNF- $\alpha$  deutlich höher. Eine Erklärung hierfür könnte die Verwendung größerer Stents mit schnellerer Freisetzung von Fäzes in die Peritonealhöhle sein, d.h. der Stimulus war möglicherweise stärker (16 G vs. 18 G).

Die durch die CASP induzierte systemische Inflammation zeigte zusätzlich einen Zusammenhang mit der Schwere des klinischen Erkrankungsbildes. Wurden die Tiere in Gruppen mit unterschiedlichem KS zusammengefasst, dann zeigte sich für IL-6 (Abb. 27) und IL-10 (Abb. 28) ein signifikant größerer Proteinspiegel in den schwer kranken Gruppen (KS 9 - 12) im Vergleich zu den geringer kranken Tieren (KS 5 - 8). Die wichtige Rolle von IL-6 im Rahmen einer polymikrobiellen Sepsis wurde so schon von mehreren Arbeitsgruppen belegt. Hohe Konzentrationen an IL-6 gelten auch in der klinischen Praxis schon länger als prädiktiver Wert für die Mortalität des Patienten (Groeneveld et al., 2003; Spittler et al., 2000). Ähnliches konnte auch im polymikrobiellen Tiermodell gezeigt werden (Remick et al., 2002; Turnbull et al., 2004).

Ebenso wurde die zentrale Rolle von IL-10 im Rahmen der Sepsis auch von anderen während der polymikrobiellen Sepsis beschrieben (Maier et al., 2004; Traeger et al., 2010). Ociun et al. (2011) konnten zeigen, dass von neutrophilen Granulozyten freigesetztes IL-10 während einer Peritonitis Peritonealmakrophagen hemmt und somit ein wichtiges Regulator-Zytokin in der Sepsis darstellt.

Analog zu den hier gezeigten Ergebnissen konnten auch Miao et al. (2012) einen Zusammenhang zwischen Zytokinkonzentration und Schwere der Erkrankung darstellen. Bei deutlich geringerer Streuung der Messwerte veränderte sich allerdings auch die TNF- $\alpha$  Konzentration in dieser Studie signifikant.

Interessanterweise konnte in unserer Studie lediglich bei IFN $\gamma$  im Serum ein signifikanter Unterschied zwischen WT- und TLR9-D Tieren gezeigt werden, mit einem deutlich niedrigeren IFN $\gamma$  Spiegel in den TLR9-D Mäusen 18 h nach CASP Operation. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 zeigten im Verlauf lediglich nicht-signifikant niedrigere Zytokinspiegel in den TLR9-D Mäusen zu den späteren Untersuchungszeitpunkten. Dies war auf eine sehr starke Streuung der Werte zurückzuführen. Auch nach Gruppierung nach klinischem Schweregrad ließen sich 18 h nach CASP Operation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mauslinien feststellen. Die Arbeit von Plitas et al. (2008) zeigte eine verringerte Konzentration von TNF bei TLR9-D Tieren im Vergleich zur WT-Gruppe, ebenso wie ein verbessertes Überleben, eine erhöhte Anzahl an dendritischen Zellen im Peritoneum und einer geringer CFU in der Peritoneallavage. Diese Ergebnisse konnten wir zumindest für die TNF- $\alpha$  Konzentration im Serum und die CFU's in der Peritoneallavage nicht bestätigen. Ein wesentlicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse, nämlich die Anwendung eines CLP Modells bei Plitas et al., wurde bereits oben diskutiert.

24 Stunden nach CASP konnten wir im Serum von schwer erkrankten WT-Tieren (KS 9-12) signifikant höhere IL-1 $\beta$  und IFN $\gamma$  Proteinkonzentrationen feststellen als in den entsprechenden TLR9-D Mäusen. Diese Ergebnisse ließen sich in anderen Modellen der polymikrobiellen Sepsis ebenfalls zeigen: So zeigte sich in einem CLP Modell an der Ratte ein signifikanter Anstieg von IL-1 $\beta$  nach 16 Stunden bis 200 pg/ml (Albayrak et al., 2013) auch in der Maus konnte die Induktion dieses Zytokins nach CLP demonstriert werden (Yun et al., 2009).

Das von uns gemessene erhöhte IFN $\gamma$  konnte in anderen Untersuchungen zur polymikrobiellen Sepsis nicht nachgewiesen werden. So fanden Zantl et al. im CLP-Modell keinen Anstieg von IFN $\gamma$  im Serum (Zantl et al., 1998) und interessanterweise zeigten auch IFN $\gamma$ -Knockout Mäuse keine erhöhte Sterblichkeit nach einer CLP im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Echtenacher et al., 2001). Letzteres konnten andere Arbeitsgruppen bestätigen und zusätzlich nachweisen, dass ein IFN $\gamma$ -Knockout im Rahmen einer akuten intra-abdominellen Sepsis zur verringerten Freisetzung und Bildung von proinflammatorischen Zytokinen führt (Romero et al., 2010). Diese divergenten Ergebnisse lassen sich erneut durch das unterschiedliche Operationsmodell mit einer konsekutiv anderen Kinetik für die Zytokinfreisetzung erklären und

sind nicht ohne Widerspruch. So konnten Miles et al. z. B. eine IFN $\gamma$ -abhängige Sterblichkeit im CLP-Modell der Maus zeigen (Miles et al., 1994). Dies lässt sich dadurch erklären, dass IFN $\gamma$  indirekt durch die Induktion von Transkriptionsfaktor-Inhibitoren wie IRF3 und IRF7 die inflammatorische Immunantwort moduliert. Im Rahmen einer Präkonditionierung kann dies organprotektive Folgen haben (Boehm et al., 2013; Stevens et al., 2011; Velten et al., 2012), die überschießende IFN $\gamma$  Freisetzung/Applikation hingegen kann das Überleben ungünstig beeinflussen (Miles et al., 1994).

#### 4.1.1.3.2 Entzündungszellen im Blut

Das Verteilungsmuster der Entzündungszellen im Blut hat sich in unseren Analysen nur wenig verändert. Für die Monozytenpopulation im Blut konnten wir eine tendenzielle Abnahme der Anzahl an Monozyten pro  $\mu$ l Blut feststellen. Nur die TLR9-D Sham Gruppe war gegenüber der Baseline Kontrolle (TLR9-D) signifikant verringert. Die Granulozyten veränderten ihre Konzentration nur wenig, lediglich in der WT Sham Gruppe war ein nicht signifikanter Anstieg zu beobachten. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu dem von Chandra et al. (2013) beschriebenen Anstieg von CD11b<sup>+</sup> Granulozyten im Blut nach CLP. Denkbar ist, dass bei der CASP die stetig anwachsende Bakterienlast zu einem Abwandern von Immunzellen aus dem Blut in das Peritoneum führt. Allerdings wurde in der vorliegenden Studie keine Untersuchung der Peritoneallavage durchgeführt. Auf ähnliche Weise ließe sich auch die beobachtete Abnahme der Monozytenzahl im Blut nach der CASP Operation erklären: für Monozyten ist seit langem bekannt, dass sie im Fall einer Infektion in das periphere Gewebe transmigrieren und dort zu Makrophagen- und DC-Vorläuferzellen ausreifen, die die Keime schließlich vor Ort bekämpfen (Serbina et al. 2008). Eine erhöhte Anzahl an dendritischen Zellen, Makrophagen und Granulozyten im Peritoneum nach CLP oder CASP konnte somit von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Plitas et al., 2008; Zhu et al., 2012).

Der Einwanderung von Granulozyten in das inflammatorische Gewebe, ausgelöst z.T. durch aktivierte DCs, kommt dabei wohl die größte Bedeutung zu (Guo et al., 2005). Auch für andere Peritonitis Modelle, wie der Injektion von *Enterococcus faecium* in das Peritoneum, konnte eine entscheidende Rolle von Granulozyten für die

*Clearance* der Bakterien gezeigt werden. Neutropenische Versuchstiere zeigten eine verlängerte Bakteriämie im Gegensatz zu Kontrolltieren (Leendertse et al., 2009).

Die Lymphozytenzahl im Blut unserer Versuche nahm bei großer Streuung der Messwerte tendenziell nach der Sham oder CASP Intervention ab. Eine signifikanten Abfall zeigte aber nur die TLR9-D CASP Gruppe. In der Sham Gruppen stieg sie über den gemessen Zeitraum tendenziell wieder an. Ein ähnliches Bild wurde 24 Stunden nach CLP Operation auch von Huang et al. (2013) beobachtet, die eine Reduktion der Zahl an B-Lymphozyten (CD19+) und T-Lymphozyten (CD3+) nach CLP Operation beobachteten. Hotchkiss et al. fanden einen prozentual verringerten Anteil an Lymphozyten im Blut von septischen Patienten in Bezug auf die Gesamt-Leukozytenpopulation (Hotchkiss et al., 2005). Zudem stellten sie eine Korrelation zwischen der Apoptose von Lymphozyten zur Schwere der Sepsis fest, die ebenfalls die verringerte Lymphozyten Anzahl erklären würde.

Die Verringerung der Lymphozytenanzahl nach CASP und die tendenziell weniger stark ausgeprägte Abnahme in Sham-operierten Tieren decken sich somit mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen.

## **4.2.1 Auswirkung der polymikrobiellen Sepsis auf die Lunge und die Lungenfunktion**

### **4.2.1.1 Inflammation im Lungengewebe**

#### **4.2.1.1.1 Zytokine**

Im Lungengewebe konnten wir für alle Zytokine einen Anstieg der mRNA-Expression nachweisen. 2 Stunden nach CASP stieg die Zytokinexpression der WT stark an und nahm anschließend wieder ab. Im Gegensatz zur bakteriellen Last, der klinischen Erkrankung und der systemischen Inflammation, fiel hier eine signifikante Differenz zu TLR9-D Tieren auf. Dies weist auf einen TLR9-abhängigen Mechanismus der pulmonalen Entzündungsreaktion hin. Eine lokale pulmonale Inflammation als Folge der CASP konnte bereits auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden: so wiesen Traeger et al. in der Lunge eine erhöhte Konzentration von IL-6 und TNF- $\alpha$  12 Stunden nach CASP-Operation nach (Traeger et al., 2010). Diese „Fernschädigung“ eines Organs durch die CASP-Operation konnte unsere Arbeitsgruppe auch am Herzen zeigen: hier führt die polymikrobielle Sepsis zu einer deutlich nachweisbaren

kardialen Inflammation und Dysfunktion, die in TLR9-defizienten Tieren vollständig ausblieb (Lohner et al., 2013). Auf gleiche Weise ließ sich eine TLR9-Abhängigkeit der vaskulären Inflammation und Dysfunktion nach CASP nachweisen (Ehrentraut et al., 2012).

Auch andere polymikrobielle Stimuli sind in der Lage, eine pulmonale Inflammation zu induzieren: Im CLP-Modell konnten andere Arbeitsgruppen ebenfalls eine zeitlich-dynamisch gesteigerte IL-6 und IL-10 mRNA Expression im Lungengewebe und in der Milz 6 bis 20 h nach der Operation nachweisen (Chandra et al., 2013; Mostafa Anower et al., 2012).

Die iNOS Expression war in unseren Experimenten bei den Wildtypen signifikant erhöht nach 2 und 6 h gegenüber der Sham- und der TLR9-D Gruppe. Eine solche erhöhte iNOS mRNA Expression in der Lunge, nach der Induktion einer polymikrobiellen Sepsis wurde auch von Farley et al. (2006) beschrieben. Die induzierbare NOS wird insbesondere in der Akutphase der inflammatorischen Antwort gebildet und kann dosisabhängig das Überleben beeinflussen (Hickey, 2001). Die von unserer Arbeitsgruppe gezeigte vaskuläre Dysfunktion nach CASP war ebenfalls iNOS abhängig (Ehrentraut et al., 2012). Auch beim Menschen konnte eine hohe Expression von iNOS in Alveolar Makrophagen bei ARDS Patienten gezeigt werden (Sittipunt et al., 2001).

#### **4.2.1.1.2 Entzündungszellen in der BALF**

Im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen, die erhöhte Entzündungszellzahlen in der BALF in anderen Sepsis-Modellen nachweisen konnten, gelang uns dies für das CASP-Modell nicht. Für die polymikrobielle Sepsis nach CLP zeigten Li et al. in der FACS Analyse einen erhöhten prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten 24 h nach CLP in der BALF, im Gegensatz zur Sham Gruppe (Li et al., 2012). Auch andere Arbeitsgruppen demonstrierten in der mikroskopischen Auszählung 24 Stunden nach CLP einen Anstieg der Leukozytenzahl in der BALF (Gong et al., 2013; Hwaiz et al., 2013). Sogar im CASP Model konnte ein Anstieg der Entzündungszellzahlen im Lungengewebe bereits 3 Stunden nach CASP nachgewiesen werden (Neumann et al., 1999) und war bis 12 h nach CASP erhöht. Neumann et al. (1999) verwendeten allerdings auch einen größeren Stent zur Auslösung der Sepsis (14 G),

der mit einem stärkeren Krankheitsgeschehen einhergeht und es wurde nicht die BAL Flüssigkeit untersucht, sondern das gesamte Lungengewebe. Unsere eigene Arbeitsgruppe zeigte, dass intraperitoneal appliziertes CpG-ODN, ein TLR9 Agonist, 4 Stunden nach Injektion, zu einer erhöhten Zellzahl, insbesondere der neutrophilen Granulozyten führte (Knuefermann et al., 2007).

Bei der Betrachtung der Zellzahl in der BALF ist besonders darauf zu achten, wie die BALF gewonnen wurde, da dies einen entscheidenden Einfluss auf die Zellzahl haben kann. Werden die Blutgefäße der Lunge vor Gewinnung der BAL nicht gespült, so vermuten wir, dass unter der Durchführung die feine Struktur der Alveolen zerstört wird und auch Entzündungszellen und Erythrozyten aus den Kapillaren in die BALF gelangen. Wir vermuten, dass so falsch hohe Werte an Zellzahlen in der BALF zustanden kommen könnten. Aus diesem Grund wurden in unseren jetzigen Versuchen vor Gewinnung der BALF die *A. pulmonalis* kanüliert und mit einem stetigen Fluss von 1 ml/min, mit einer Elektrolytlösung, perfundiert.

Auch die Wahl des Anästhesieverfahrens kann erheblichen Einfluss auf die pulmonale Inflammation haben. So konnte im CLP Modell von Ratten gezeigt werden, dass Sevofluran und Isofluran dosisabhängig die Produktion von Zytokinen und NO sowie die Infiltration von neutrophilen Granulozyten modulieren können (Bedirli et al., 2012). Zusätzlich kann auch die Beatmungsform über eine Druckschädigung der Lunge die pulmonale Entzündung stark beeinflussen (Gattinoni et al., 2010; Parker et al., 1993).

#### **4.2.1.2 Lungenfunktion**

Um zu untersuchen, ob die systemische und pulmonale Inflammation der Mäuse einen Einfluss auf die Lungenfunktion hat, führten wir zusammen mit unserem Kooperationspartner, der AG Witzernath and der Charité in Berlin eine Prüfung dynamischer pulmonaler Parameter und der Permeabilität durch. Die Untersuchung der Lungenfunktion bei Mäusen ist hierbei seit einiger Zeit mit dem Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge möglich (von Bethmann et al., 1998). Bisher wurden aber weitestgehend der Ventilator bedingte Lungenschaden, *Ventilator-induced lung injury* (VILI) (Muller-Redetzky et al., 2012) und die Pneumokokken

Pneumonie (Witzenrath et al., 2006) untersucht. Wie sich eine polymikrobielle Sepsis auf die Lungenfunktion der Mäuse auswirkt wurde bisher nicht dargestellt.

In unseren Versuchen konnten wir nach der CASP Operation überraschenderweise mit dem Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge keine Veränderungen der pulmonalen *Compliance* und *Resistance* im Vergleich zur Baseline feststellen.

Die *Resistance* der Tiere betrug etwa 1,5 cmH<sub>2</sub>O /ml /s in allen untersuchten Gruppen und zu allen untersuchten Zeitpunkten (Baseline-Kontrolle, CASP, Sham in WT- und TLR9-D Tieren) Dieser Wert entspricht in etwa dem Baseline Kontrollwert für Mäuse, der bereits beschrieben wurde (Witzenrath et al., 2008). Auch die dynamische *Compliance* änderte sich im Vergleich zur Baseline kaum und blieb mit Werten um die 30 µm/cmH<sub>2</sub>O im Bereich von gesunden Kontrollgruppen, die auch in anderen Versuchen nachgewiesen wurde (Witzenrath et al., 2009). Schwere Erkrankungen der Lunge, die durch einen direkten in die Lunge eingebrachten bakteriellen Stimulus ausgelöst wurden, zeigten in anderen Arbeiten deutliche Veränderungen sowohl von *Resistance* als auch *Compliance* (Witzenrath et al., 2009). Die indirekte Stimulation der Lunge durch die CASP-Operation in Form einer „Fernschädigung“ zeigte also einen wesentlich geringeren Einfluss auf die gemessene Lungenfunktion als ein direkter tracheal applizierter Stimulus.

Ein wesentliches Zeichen der pulmonalen Inflammation ist im Verlauf die Störung der alveo-kapillären Barriere mit der Entstehung eines massiven Lungenödems/-infiltrats (Matthay et al., 2012). Um diese Permeabilitätsstörung zu erfassen, bestimmten wir die BAL/Serum HSA Ratio. Auch hier konnten wir nach CASP-Operation in keiner der untersuchten Gruppen eine signifikant veränderte *Permeabilität* der Lunge nachweisen, die gemessenen Werte blieben mit ca. 0,23 (WT) und 0,35 (TLR9-D) nahe bei der Kontrollgruppe. Somit war der CASP-abhängige inflammatorische Stimulus für die Lunge zwar nachweisbar, zeigte aber keinen Effekt auf die alveolo-kapilläre Barriere. Diese Ergebnisse stehen in klarem Gegensatz zu Daten aus Modellen der direkten Lungenschädigung: Hier konnte von Witzenrath et al. (2009) klar gezeigt werden, dass bei einer Ratio von 0,5 oder höher ein mikrovaskuläres Leckage-Syndrom ähnlich wie beim ARDS auftritt.

Allerdings konnten andere Arbeiten sowohl nach CLP (Wang et al., 2012) als auch nach CASP-Operation (Neumann et al., 1999) eine erhöhte pulmonale Permeabilität nachweisen. Hierbei wurde jedoch eine andere Nachweismethode, der Evans Blue Permeabilität Assay, verwendet und die gewählten Untersuchungszeitpunkte waren im CASP-Versuch früher gewählt (3-12 h vs. 18 h).

Neben dem weniger starken Stimulus der CASP als Induktor der pulmonalen Dysfunktion im Vergleich zu direkter, trans-trachealer Stimulation lassen sich die negativen Ergebnisse der Funktionsuntersuchungen in der vorliegenden Studie auch durch die z.T. zu geringe n-Zahl einzelner Gruppen erklären. Bei starker Streuung der Messwerte wäre auch bei diesen Versuchen eine Gruppierung nach unterschiedlichen KS Klassen hilfreich gewesen, um mögliche Unterschiede herauszuarbeiten. Weitere Versuche waren jedoch aufgrund des Arbeitens an zwei Standorten (Bonn und Berlin) und der damit verbundenen Begrenzung von operativen Kapazitäten nicht möglich.

#### **4.3.1 Rolle von TLR9 für die pulmonale Inflammation nach CASP**

Die hier vorliegende Studie sollte in einem weiteren, für den Verlauf einer Sepsis zentralen Organ die bereits von unserer Arbeitsgruppe zentrale Rolle von TLR9 für die Vermittlung der Inflammation und Dysfunktion überprüfen. Die CASP-Operation induzierte hierbei in WT-Mäusen eine systemische und pulmonale Inflammation, die in TLR9-D Tieren deutlich attenuiert ablief. Allerdings hatte die beobachtete pulmonale Inflammation in keiner der untersuchten Gruppen einen Einfluss auf die Lungenfunktion.

Somit decken sich die gemachten Ergebnisse z.T. mit den von unserer Arbeitsgruppe demonstrierten Untersuchungen zur kardialen und vaskulären Inflammation und Dysfunktion (Ehrentraut et al., 2012; Lohner et al., 2013).

Die CASP Operation führte analog zu der in dieser Studie gesehenen CASP-induzierten systemischen und organ-spezifischen Inflammation in WT-Mäusen, die jeweils in TLR9-D Tieren ausblieb. Allerdings hatte diese Inflammation im Herzen sowohl *in vitro* an isolierten WT Kardiomyozyten als auch *in vivo* einen erheblichen suppressiven Einfluss auf die Funktion, der ebenfalls in den TLR9-D Mäusen nicht zu beobachten war. Versuche an isolierten Gefäßringen aus CASP-operierten WT-



Mäusen zeigten eine NO-abhängige Kontraktilitätsstörung, in Aortenringen aus TLR9-D Tieren blieb die Kontraktion erhalten und wie auch nach Einsatz des TLR9 Antagonisten H154-Thioat.

Im Gegensatz zum Herzen (Lohner et al., 2013) konnten wir in der Lunge nur eine minimal gesteigerte TLR9 mRNA Expression in WT-Tieren 18 und 24 h nach CASP beobachten. Diese Beobachtung deckt sich mit weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die nach Stimulation mit unterschiedlichen TLR Agonisten eine differenzierte Regulation unterschiedlicher systemischer und pulmonaler PRR beobachtete, mit nur gering ausgeprägter TLR9 Induktion (Ehrentraut et al., 2011). Auch in einer anderen Studie zeigte die intraperitoneale Injektion des TLR9 Agonisten CpG-ODN keinen signifikanten Anstieg der TLR9 mRNA (Knuefermann et al., 2007). Dabei zeigte sich dort aber, wie in der hier vorliegenden Studie eine CpG-ODN abhängige pulmonale signifikante Zytokininduktion bei WT-Mäusen, allerdings in Kombination mit einer leicht erhöhten Zahl an neutrophilen Granulozyten in der BAL. Die Rolle von TLR9 wurde auch in direkten pulmonalen Modellen der Inflammation untersucht. So führte die intranasale Injektion von *Streptococcus pneumoniae* in TLR9-D Tiere zu einer höheren Anfälligkeit gegenüber *S. pneumoniae* (Albiger et al., 2007). Dies ging einher mit einer verminderten bakteriellen Clearance und einer verringerten Aktivität der alveolären Makrophagen. Die Autoren schlussfolgerten, dass bei einer Pneumokokken Infektion TLR9 ein wichtiger Vermittler der Aktivierung gewebsständiger Makrophagen zu sein scheint, der zu einer frühen Bakterien-Clearance in den Alveolen führt.

Auch die direkte transtracheale Applikation von gramnegativen *Klebsiella pneumoniae* zeigte in TLR9-D Mäusen eine schlechtere Clearance, eine geringere Anzahl von pulmonalen DC und eine verringerte Aktivität von Lungen Makrophagen (Bhan et al., 2007). Interessanterweise gingen diese Veränderungen hier mit einer erhöhten Sterblichkeit einher. Diese Beobachtung widerspricht unseren und auch Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die einer verringerten Mortalitätsrate für TLR9-D Mäuse nach CLP und CASP, sowie der Applikation des TLR9-Agonisten 168-Thioat zeigten (Knuefermann et al., 2007; Plitas et al., 2008). Somit scheint der Verlauf der Erkrankung nicht nur vom Stimulus selbst abhängig zu sein, sondern auch vom Applikationsweg.

#### 4.4.1 CASP: Das richtige Modell für indirektes ALI/ARDS?

In dem von uns verwendeten CASP Modell konnten wir eine „Fernschädigung“ der Lunge in Form einer inflammatorischen Antwort induzieren. Allerdings ohne Einfluss auf die funktionellen Parameter der Lunge oder die Lungenpermeabilität.

Andere polymikrobielle Sepsismodelle wie die CLP waren ebenfalls in der Lage in der Lage, eine Remoteschädigung der Lunge mit erhöhter Proteinmenge und erhöhter Leukozytenzahl in der BALF, Nachweis eines Lungenödems durch *wet-to-dry ratio*, histologisch-pathologisch verifizierte Lungenveränderungen und erhöhte NO Produktion in der Lunge zu induzieren (Gong et al., 2013; Hegde et al., 2007; Li et al., 2012). Insgesamt bleibt fest zu halten, dass der Einfluss der polymikrobiell induzierten Fernschädigung ein weniger effektiver Stimulus für eine starke pulmonale Inflammation und Dysfunktion zu sein scheint.

Als besonders effektive Induktoren einer Fernschädigung haben sich sog. „2-Hit“-Modelle bewährt, um ein indirektes ALI zu induzieren. Grundgedanke ist hierbei die Erkenntnis, dass für die Auslösung eines voll ausgebildeten ALI/ARDS ein *Priming* der neutrophilen Granulozyten stattgefunden haben muss (Perl et al., 2011). So konnte die Kombination aus hämorrhagischen Schock (First Hit) ausgelöst 24 h vor einer nachfolgenden CLP (Second Hit) sehr zuverlässig im Verlauf ein Lungenversagen herbeiführen (Ayala et al., 2002; Lomas-Neira et al., 2013; Lomas-Neira et al., 2004; Perl et al., 2005; Venet et al., 2010). In diesen Arbeiten führte das „2-Hit“-Modell zur Ausbildung eines Lungenödems, erhöhter Zytokinmenge und PMN-Anzahl in der Lunge und histologisch-pathologischen Lungenveränderungen. Hierbei konnten die Autoren zeigen, dass weder eine CLP, noch ein hämorrhagischer Schock alleine konsequent zur Ausbildung eines ALI führten (Ayala et al., 2002; Lomas-Neira et al., 2013; Lomas-Neira et al., 2004; Perl et al., 2005; Venet et al., 2010). Allerdings verwendeten die Autoren auch eine kleinere Nadel als Gruppen, die erfolgreich mit der CLP alleine eine Lungenschädigung verursachen konnten (Gong et al., 2013). Ob allerdings die Anwendung eines „2-Hit“ Modells im Zusammenhang mit der CASP auch eine Einschränkung der Lungenfunktion induzieren kann, müssen zukünftige Studien zeigen.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle von TLR9 für die Entstehung einer pulmonalen Inflammation im Rahmen der polymikrobiellen Sepsis *in vivo*.

Die induzierte polymikrobielle Sepsis durch Colon-aszendens-Stent-Peritonitis (CASP) zeigte sich zum einen klinisch mit hohen Werten eines für diese Arbeit entwickelten Klinischen Scores für septische Mäuse (KS-SM). Dieser ergab zum einen nicht-invasiv umfassende Informationen zum klinischen Zustand der Tiere und korrelierte mit dem Grad der systemischen Inflammation (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und IL-10) im Plasma der CASP operierten WT und TLR9-D Mäuse. Weiterhin präsentierten stark erkrankte WT Tiere eine höhere Anzahl an Bakterien in der Peritoneallavage, als nicht erkrankte WT Tiere. Tendenziell galt dies auch für TLR9-D Tiere. Es ergab sich allerdings kein signifikanter Unterschied in der Zytokinausschüttung im Serum zwischen WT und TLR9-D Mäusen. Lediglich die IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  Konzentration war in TLR9-D Tieren 24 h nach CASP signifikant im Blut verringert. Dies stand durchaus im Widerspruch zu einigen anderen Arbeiten (Plitas et al., 2008; Zantl et al., 1998) und konnte am ehesten durch unterschiedliche Stimuli und abweichender Operationsmodelle mit abweichender Kinetik diskutiert werden. Die Zahlen der Entzündungszellen im Blut änderten sich in unseren Untersuchungen im Gegensatz zu den Zytokinen kaum. Die Monozytenpopulation nahm tendenziell ab, was durch eine Abwanderung der Monozyten in das Peritoneum erklärt werden kann und durch andere Arbeitsgruppen bereits nachgewiesen wurde (Plitas et al., 2008; Zhu et al., 2012). Ebenso fiel die Lymphozytenzahl im Blut, was sich mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen deckt (Huang et al., 2013).

Nach dem Nachweis einer systemischen Infektion folgte die Untersuchung der Inflammation im Lungengewebe und die Auswirkungen auf die Lungenfunktion und pulmonalen Permeabilität. Wie auch schon von anderen Arbeitsgruppen demonstriert zeigte sich eine lokale pulmonale Inflammation in Form einer Zytokininduktion bei WT Tieren (Traeger et al., 2010) mit einer signifikanten Differenz zu TLR9-D Tieren. Ferner verhielt sich die iNOS-Expression im Lungengewebe ähnlich mit signifikant geringeren Expression in der TLR9-D Gruppe. Im Gegensatz zu der nachgewiesenen lokalen Inflammation im Lungengewebe fanden wir kein Korrelat auf Zellebene. In der

BALF war keine erhöhte Entzündungszellzahl feststellbar. Weiterhin konnten weder eine Veränderung der Permeabilität im Lungengewebe, noch ein Einfluss auf die Lungenfunktionsparameter *Compliance / Resistance* gezeigt werden. Dies steht im Widerspruch zu Neumann et al. (1999), die nach CASP mit einem größeren 14G Stent erhöhte Entzündungszellzahlen in der BALF nachwies und Li et al. (2012), die dies für das CLP Modell zeigten. Gerade die Zellzahlen in der BALF sind aber vermutlich sehr von der Art ihrer Gewinnung abhängig, sodass sich alleine hieraus unterschiedlich Ergebnisse erklären könnten.

TLR9 spielt demnach zwar eine Rolle in der systemischen Inflammation scheint jedoch keinen bedeutenden Einfluss auf die Lungenfunktion im CASP Modell zu haben. Dabei ist zu bedenken, dass eine CASP Operation möglicherweise alleine eine zu geringe „Fernschädigung“ der Lunge verursacht und so die Lungenfunktion oder die Permeabilität nur geringfügig beeinflusst. „2-Hit“-Modelle scheinen deutlich zuverlässiger ein indirektes ALI zu induzieren (Ayala et al., 2002; Venet et al., 2010). Welche Rolle TLR9 in einem solchen Szenario spielt, müssen aber zukünftige Studien zeigen.

## 6. Literaturverzeichnis

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511

Al-Banna NA, Pavlovic D, Bac VH, Utpatel K, Janke E, Rippke JN, Borowiak M, Cerny V, Spasov A, Johnston B, Issekutz TB, Lehmann CH. Acute administration of antibiotics modulates intestinal capillary perfusion and leukocyte adherence during experimental sepsis. *Int J Antimicrob ag* 2013; 41: 536-543

Albayrak A, Halici Z, Polat B, Karakus E, Cadirci E, Bayir Y, Kunak S, Karcioğlu SS, Yigit S, Unal D, Atamanalp SS. Protective effects of lithium: a new look at an old drug with potential antioxidative and anti-inflammatory effects in an animal model of sepsis. *Int Immunopharmacol* 2013; 16: 35-40

Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H, Akira S, Normark S, Henriques-Normark B. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol* 2007; 9: 633-644

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615

Andrades ME, Morina A, Spasic S, Spasojevic I. Bench-to-bedside review: sepsis - from the redox point of view. *Crit Care* 2011; 15: 230-235

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: 1303-1313

Ayala A, Chung CS, Lomas JL, Song GY, Doughty LA, Gregory SH, Cioffi WG, LeBlanc BW, Reichner J, Simms HH, Grutkoski PS. Shock-induced neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice: divergent effects of TLR-4 and TLR-4/FasL deficiency. *Am J Pathol* 2002; 161: 2283-2294

Barkhausen T, Tschernig T, Rosenstiel P, van Griensven M, Vonberg RP, Dorsch M, Mueller-Heine A, Chalaris A, Scheller J, Rose-John S, Seegert D, Krettek C, Waetzig GH. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit Care Med* 2011; 39: 1407-1413

Bedirli N, Demirtas CY, Akkaya T, Salman B, Alper M, Bedirli A, Pasaoglu H. Volatile anesthetic preconditioning attenuated sepsis induced lung inflammation. *J Surg Res* 2012; 178: 17-23

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 Resp Crit Care* 1994; 149: 818-824

Bhan U, Lukacs NW, Osterholzer JJ, Newstead MW, Zeng X, Moore TA, McMillan TR, Krieg AM, Akira S, Standiford TJ. TLR9 is required for protective innate immunity in Gram-negative bacterial pneumonia: role of dendritic cells. *J Immunol* 2007; 179: 3937-3946

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukocyte Biol* 2007; 81: 1-5

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. *Mediat Inflamm* 2013; 2013: 1-9

Bone R, Balk R, Cerra F, Dellinger R, Fein A, Knaus W, Schein R, Sibbald W. 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

Brunkhorst FM. Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet). *AINS* 2006; 41: 43-44

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 854-865

Carbajal-Guerrero J, Cayuela-Dominguez A, Fernandez-Garcia E, Aldabo-Pallas T, Marquez-Vacaro JA, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J. Epidemiology and long-term outcome of sepsis in elderly patients. *Med Intensiva* 2014; 38: 21-32

Celes MR, Prado CM, Rossi MA. Sepsis: going to the heart of the matter. *Pathobiology* 2013; 80: 70-86

Chandra R, Federici S, Bishwas T, Nemeth ZH, Deitch EA, Thomas JA, Spolarics Z. IRAK1-Dependent Signaling Mediates Mortality in Polymicrobial Sepsis. *Inflammation* 2013; 36: 1503-1512

Clec'h C, Fosse JP, Karoubi P, Vincent F, Chouahi I, Hamza L, Cupa M, Cohen Y. Differential diagnostic value of procalcitonin in surgical and medical patients with septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34: 102-107

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002; 420: 885-891

Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Immunology* 2008; 180: 5771-5777

Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock* 2005; 24: 19-23

Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* 2011; 19: 198-208

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *New Engl J Med* 2000; 343: 37-49

Diacovich L, Gorvel JP. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 117-128

Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 519-550

Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007; 35: 1244-1250

Dorge H, Schondube FA, Dorge P, Seipelt R, Voss M, Messmer BJ. Procalcitonin is a valuable prognostic marker in cardiac surgery but not specific for infection. *Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 51: 322-326

Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissieres P, Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*. 2013; 41: 820-832

Echtenacher B, Freudenberg MA, Jack RS, Mannel DN. Differences in innate defense mechanisms in endotoxemia and polymicrobial septic peritonitis. *Infect Immun* 2001; 69: 7271-7276

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. *Mediat Inflamm* 2011; 746532: 1-12

Ehrentraut SF, Dorr A, Ehrentraut H, Lohner R, Lee SH, Hoefft A, Baumgarten G, Knuefermann P, Boehm O, Meyer R. Vascular dysfunction following polymicrobial sepsis: role of pattern recognition receptors *PLoS ONE* 2012; 7: e44531

Eisner MD, Thompson T, Hudson LD, Luce JM, Hayden D, Schoenfeld D, Matthay MA. Efficacy of low tidal volume ventilation in patients with different clinical risk factors for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Resp Crit Care* 2001; 164: 231-236

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. *Intens Care Med* 2007; 33: 606-618



Farley KS, Wang LF, Razavi HM, Law C, Rohan M, McCormack DG, Mehta S. Effects of macrophage inducible nitric oxide synthase in murine septic lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: 1164-1172

Feihl F, Waeber B, Liaudet L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacol Therapeut* 2001; 91: 179-213

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-2095

Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 2001; 22: 556-560

Fuchs D. Die Rolle der kommensalen Darmflora bei der *T. gondii*-induzierten Ileitis der C57BL/6-Maus. Inaugural-Dissertation, Medizinische Fakultät, Carité Universitätsmedizin Berlin, 2010: 68-118

Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Brit J Anaesth* 2011; 107: 57-64

Gao M, Ha T, Zhang X, Wang X, Liu L, Kalbfleisch J, Singh K, Williams D, Li C. The Toll-like receptor 9 ligand, CpG oligodeoxynucleotide, attenuates cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis, involving activation of both phosphoinositide 3 kinase/Akt and extracellular-signal-related kinase signaling. *J Infect Dis* 2013; 207: 1471-1479

Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Muller-Newen G, Grotzinger J, Rose-John S, Scheller J. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth F R* 2012; 23: 85-97

Gattinoni L, Protti A, Caironi P, Carlesso E. Ventilator-induced lung injury: the anatomical and physiological framework. *Crit Care Med* 2010; 38: 539-548

Gebhart GF, Basbaum AI, Bird SJ, Flecknell P, Goodly LJ, Karas AZ, Kelley ST, Lacher J, Mason G, Sneddon LU, Soriano SG. Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals: Washington, D.C. The National Academies Press, 2009

Geerts L, Jorens PG, Willems J, De Ley M, Slegers H. Natural inhibitors of neutrophil function in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2001; 29: 1920-1924

Girardin E, Dayer JM. Cytokines and antagonists in septic shock. *Schweiz Med Wschr* 1993; 123: 480-491

Gong X, Zhang L, Jiang R, Ye M, Yin X, Wan J. Anti-inflammatory effects of mangiferin on sepsis-induced lung injury in mice via up-regulation of heme oxygenase-1. *J Nutr Biochem* 2013; 24: 1173-1181

Graf J, Brunkhorst, FM, Reinhart, K. Sepsis – Langzeitfolgen und sozioökonomische Bedeutung. *Ärzteblatt Thüringen* 2007; 18: 423 - 426

Groeneveld AB, Tacx AN, Bossink AW, van Mierlo GJ, Hack CE. Circulating inflammatory mediators predict shock and mortality in febrile patients with microbial infection. *Clin Immunol* 2003; 106: 106-115

Guo Z, Zhang M, Tang H, Cao X. Fas signal links innate and adaptive immunity by promoting dendritic-cell secretion of CC and CXC chemokines. *Blood* 2005; 106: 2033-2041

Gutbier B. Die Bedeutung von Pneumolysin für die Entstehung des akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie. Inaugural-Dissertation, Institut für Veterinär-Physiologie, Freie Universität Berlin, 2008: 55-55

Ha T, Lu C, Liu L, Hua F, Hu Y, Kelley J, Singh K, Kao RL, Kalbfleisch J, Williams DL, Gao X, Li C. TLR2 ligands attenuate cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis via a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298: 984-991

Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, Vadas L, Pugin J. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 396-402

Hasper D, Schefold JC, Baumgart DC. Management of severe abdominal infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2009; 4: 57-65

Hausfater P, Garric S, Ayed SB, Rosenheim M, Bernard M, Riou B. Usefulness of procalcitonin as a marker of systemic infection in emergency department patients: a prospective study. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 895-901

Hawkins P. Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. *Lab Anim* 2002; 36: 378-395

Hegde A, Zhang H, Moochhala SM, Bhatia M. Neurokinin-1 receptor antagonist treatment protects mice against lung injury in polymicrobial sepsis. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 678-685

Hickey MJ. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leucocyte recruitment. *Clin Sci* 2001; 100: 1-12

Horner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Role of the innate immune response in sepsis. *Anaesthesist* 2004; 53: 10-28

Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol* 2005; 174: 5110-5118

Hu X, Ivashkiv LB. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity* 2009; 31: 539-550

Huang N, Wang F, Wang Y, Hou J, Li J, Deng X. Ulinastatin improves survival of septic mice by suppressing inflammatory response and lymphocyte apoptosis. *J Surg Res* 2013; 182: 296-302

Huet O, Ramsey D, Miljavec S, Jenney A, Aubron C, Aprico A, Stefanovic N, Balkau B, Head GA, de Haan JB, Chin-Dusting JP. Ensuring animal welfare while meeting scientific aims using a murine pneumonia model of septic shock. *Shock* 2013; 39: 488-494

Hwaiz R, Hasan Z, Rahman M, Zhang S, Palani K, Syk I, Jeppsson B, Thorlacius H. Rac1 signaling regulates sepsis-induced pathologic inflammation in the lung via attenuation of Mac-1 expression and CXC chemokine formation. *J Surg Res* 2013; 183: 798-807

Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 2012; 32: 23-63

Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. General principles of signal transduction. In: Janeway CA, Hrsg. *Janeway's Immunobiology* 7th Edition. New York: Garland Science, 2008; 219-227

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216

Kelchtermans H, Biliau A, Matthys P. How interferon- $\gamma$  keeps autoimmune diseases in check. *Trends Immunol* 2008; 10: 479-486

Kirkeboen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43: 275-288

Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 2010; 22: 347-352

Knuefermann P, Baumgarten G, Koch A, Schwederski M, Velten M, Ehrentraut H, Mersmann J, Meyer R, Hoefft A, Zacharowski K, Grohe C. CpG oligonucleotide activates Toll-like receptor 9 and causes lung inflammation in vivo. *Respir Res* 2007; 8: 72-80

Krause K, Metz M, Makris M, Zuberbier T, Maurer M. The role of interleukin-1 in allergy-related disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12: 477-484

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388: 621-625

Lamkanfi M, Walle LV, Kanneganti TD. Deregulated inflammasome signaling in disease. *Immunol Rev* 2011; 243: 163-173

Lee CC, Chen SY, Tsai CL, Wu SC, Chiang WC, Wang JL, Sun HY, Chen SC, Chen WJ, Hsueh PR. Prognostic value of mortality in emergency department sepsis score, procalcitonin, and C-reactive protein in patients with sepsis at the emergency department. *Shock* 2008; 29: 322-327

Leendertse M, Willems RJ, Giebelen IA, Roelofs JJ, Bonten MJ, van der Poll T. Neutrophils are essential for rapid clearance of *Enterococcus faecium* in mice. *Infect Immun* 2009; 77: 485-491

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003; 31: 1250-1256

Li J, Zhang Y, Lou J, Zhu J, He M, Deng X, Cai Z. Neutralisation of peritoneal IL-17A markedly improves the prognosis of severe septic mice by decreasing neutrophil infiltration and proinflammatory cytokines. *PLoS ONE*. 2012; 7: e46506

Lichtenstern C, Brenner T, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Predictors of survival in sepsis: what is the best inflammatory marker to measure? *Current opinion in infectious diseases*. 2012; 25: 328-336

Lim KH, Staudt LM. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: a011247

Llewelyn MJ, Berger M, Gregory M, Ramaiah R, Taylor AL, Curdt I, Lajaunias F, Graf R, Blincko SJ, Drage S, Cohen J. Sepsis biomarkers in unselected patients on admission to intensive or high-dependency care. *Crit Care* 2013; 17: R60

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 of inflammation* 2013; 261049: 1-13

Lomas-Neira J, Venet F, Chung CS, Thakkar R, Heffernan D, Ayala A. Neutrophil-Endothelial Interactions Mediate Angiopoietin-2 Associated Pulmonary Endothelial Cell Dysfunction in Indirect ALI in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; 50: 193-200

Lomas-Neira JL, Chung CS, Grutkoski PS, Miller EJ, Ayala A. CXCR2 inhibition suppresses hemorrhage-induced priming for acute lung injury in mice. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 58-64

Lustig MK, Bac VH, Pavlovic D, Maier S, Grundling M, Grisk O, Wendt M, Heidecke CD, Lehmann C. Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock* 2007; 28: 59-64

Luzzaro F, Ortisi G, Larosa M, Drago M, Brigante G, Gesu G. Prevalence and epidemiology of microbial pathogens causing bloodstream infections: results of the OASIS multicenter study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69: 363-369

Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Häuser N, Holzmann B, Stier A, Pfeffer K, Heidecke CD. Cecal Ligation and Puncture Versus Colon Ascendens Stent Peritonitis: Two Distinct Animal Models for Polymicrobial Sepsis. *Shock* 2004; 21: 505-512

Martin G, Mannino D, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-1554

Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 2012; 122: 2731-2740

Miao P, Kong Y, Ma Y, Zeng H, Yu Z. Hypothermia predicts the prognosis in colon ascendens stent peritonitis mice. *J Surg Res* 2013; 181: 129-135

Miles RH, Paxton TP, Dries DJ, Gamelli RL. Interferon-gamma increases mortality following cecal ligation and puncture. *J Trauma* 1994; 36: 607-611

Morton DB, Griffiths PH. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* 1985; 116: 431-436

Mostafa Anower AK, Shim JA, Choi B, Sohn S. Pretreatment with interleukin-6 small interfering RNA can improve the survival rate of polymicrobial cecal ligation and puncture mice by down regulating interleukin-6 production. *Eur J Pharmacol* 2012; 688: 76-83

Muller-Redetzky HC, Kummer W, Pfeil U, Hellwig K, Will D, Paddenberg R, Tabeling C, Hippenstiel S, Suttorp N, Witzenrath M. Intermedin stabilized endothelial barrier function and attenuated ventilator-induced lung injury in mice. *PLoS ONE*. 2012; 7: e35832

Muller-Werdan U, Engelmann H, Werdan K. Cardiodepression by tumor necrosis factor-alpha. *Eur Cytokine Netw* 1998; 9: 689-691

Nemzek JA, Hugunin KM, Opp MR. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comp Med* 2008; 58: 120-128

Neumann B, Zantl N, Veihelmann A, Emmanuilidis K, Pfeffer K, Heidecke CD, Holzmann B. Mechanisms of acute inflammatory lung injury induced by abdominal sepsis. *Int Immunol* 1999; 11: 217-227

Ocuin LM, Bamboat ZM, Balachandran VP, Cavnar MJ, Obaid H, Plitas G, DeMatteo RP. Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis. *J Leukoc Biol.* 2011; 89: 423-432

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

Parker JC, Hernandez LA, Peevy KJ. Mechanisms of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med.* 1993; 21: 131-143

Perl M, Chung CS, Lomas-Neira J, Rachel TM, Biffi WL, Cioffi WG, Ayala A. Silencing of Fas, but not caspase-8, in lung epithelial cells ameliorates pulmonary apoptosis, inflammation, and neutrophil influx after hemorrhagic shock and sepsis. *Am J Pathol.* 2005; 167: 1545-1559

Perl M, Lomas-Neira J, Venet F, Chung CS, Ayala A. Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury. *Expert Rev Respir Med* 2011; 5: 115-126

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

Raghavendran K, Willson D, Notter RH. Surfactant therapy for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Clin* 2011; 27: 525-559

Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, Shin J, Nemzek JA. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock* 2002; 17: 463-467

Romero CR, Herzig DS, Etogo A, Nunez J, Mahmoudizad R, Fang G, Murphey ED, Toliver-Kinsky T, Sherwood ER. The role of interferon-gamma in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. *J Leukoc Biol* 2010; 88: 725-735

Rubinfeld GD CE, Peabody E. Incidence and Outcomes of Acute Lung Injury. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1685-1693



Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine* 2010; 50: 1-14

Salomao R, Brunialti MK, Rapozo MM, Baggio-Zappia GL, Galanos C, Freudenberg M. Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. *Shock* 2012; 38: 227-242

Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 170-181

Scarpati EM, Sadler JE. Regulation of endothelial cell coagulant properties. Modulation of tissue factor, plasminogen activator inhibitors, and thrombomodulin by phorbol 12-myristate 13-acetate and tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 1989; 264: 20705-20713

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 163-189

Shelley O, Murphy T, Paterson H, Mannick JA, Lederer JA. Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. *Shock* 2003; 20: 123-129

Sielenkämper A, Fischer L, Freise H, Van Aken H. Pathophysiologie der Sepsis. *Intensivmedizin up2date*. 2005; 1: 9-20

Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT, Myles C, Zhu S, Goodman RB, Hudson LD, Matalon S, Martin TR. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 503-510

Spittler A, Razenberger M, Kupper H, Kaul M, Hackl W, Boltz-Nitulescu G, Fugger R, Roth E. Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties, and cytokine production. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1338-1342

Sprung CL, Sakr Y, Vincent JL, Le Gall JR, Reinhart K, Ranieri VM, Gerlach H, Fielden J, Groba CB, Payen D. An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence In Acutely Ill Patients (SOAP) study. *Intensive Care Med* 2006; 32: 421-427

Stevens JH, Raffin TA. Adult respiratory distress syndrome--I. Aetiology and mechanisms. *J Postgrad Med* 1984; 60: 505-513

Stevens SL, Leung PY, Vartanian KB, Gopalan B, Yang T, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Multiple preconditioning paradigms converge on interferon regulatory factor-dependent signaling to promote tolerance to ischemic brain injury. *J Neurosci* 2011; 31: 8456-8463

Sturge CR, Benson A, Raetz M, Wilhelm CL, Mirpuri J, Vitetta ES, Yarovinsky F. TLR-independent neutrophil-derived IFN-gamma is important for host resistance to intracellular pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 10711-10716

Sukhithasri V, Nisha N, Biswas L, Anil Kumar V, Biswas R. Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. *Microbiol Rev* 2013; 168: 396-406

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

Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420: 853-859

Traeger T, Mikulcak M, Eipel C, Abshagen K, Diedrich S, Heidecke CD, Maier S, Vollmar B. Kupffer cell depletion reduces hepatic inflammation and apoptosis but decreases survival in abdominal sepsis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22: 1039-1049

Tsushima K, King LS, Aggarwal NR, De Gorordo A, D'Alessio FR, Kubo K. Acute Lung Injury Review. *Internal Med* 2009; 48: 621-630

Turnbull IR, Javadi P, Buchman TG, Hotchkiss RS, Karl IE, Coopersmith CM. Antibiotics improve survival in sepsis independent of injury severity but do not change mortality in mice with markedly elevated interleukin 6 levels. *Shock* 2004; 21: 121-125

Velten M, Duerr GD, Pessies T, Schild J, Lohner R, Mersmann J, Dewald O, Zacharowski K, Klaschik S, Hilbert T, Hoefft 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; 96: 422-432

Venet F, Huang X, Chung CS, Chen Y, Ayala A. Plasmacytoid dendritic cells control lung inflammation and monocyte recruitment in indirect acute lung injury in mice. *Am J Pathol* 2010; 176: 764-773

Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 2013; 381: 774-775

von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R, Vogt K, Volk HD, Muller KM, Wendel A, Uhlig S. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 263-272

Wang L, Taneja R, Razavi HM, Law C, Gillis C, Mehta S. Specific role of neutrophil inducible nitric oxide synthase in murine sepsis-induced lung injury in vivo. *Shock* 2012; 37: 539-547

Wang L, Taneja R, Wang W, Yao LJ, Veldhuizen RA, Gill SE, Fortin D, Inculet R, Malthaner R, Mehta S. Human alveolar epithelial cells attenuate pulmonary microvascular endothelial cell permeability under septic conditions. *PloS one* 2013; 8: e55311

Ware LB, Matthay MA. The Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342: 1334- 1349

Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock -- a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29: 189-201

Williams DL, Ha T, Li C, Kalbfleisch JH, Ferguson DA, Jr. Early activation of hepatic NFkappaB and NF-IL6 in polymicrobial sepsis correlates with bacteremia, cytokine expression, and mortality. *Ann Surg* 1999; 230: 95-104

Willson DF, Notter RH. The future of exogenous surfactant therapy. *Respir Care* 2011; 56: 1369-1386

Witzenrath M, Ahrens B, Schmeck B, Kube SM, Hippenstiel S, Rosseau S, Hamelmann E, Suttorp N, Schutte H. Rho-kinase and contractile apparatus proteins in murine airway hyperresponsiveness. *Exp Toxicol Pathol* 2008; 60: 9-15

Witzenrath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, Mitchell TJ, de los Toyos JR, Rosseau S, Suttorp N, Schutte H. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 2006; 34: 1947-1954

Witzenrath M, Gutbier B, Schmeck B, Tenor H, Seybold J, Kuelzer R, Grentzmann G, Hatzelmann A, van Laak V, Tschernig T, Mitchell TJ, Schudt C, Rosseau S, Suttorp N, Schutte H. Phosphodiesterase 2 inhibition diminished acute lung injury in murine pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 2009; 37: 584-590

Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, Double JA, Everitt J, Farningham DA, Glennie MJ, Kelland LR, Robinson V, Stratford IJ, Tozer GM, Watson S, Wedge SR, Eccles SA. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Brit J Cancer* 2010; 102: 1555-1577

Yun N, Lee CH, Lee SM. Protective effect of Aloe vera on polymicrobial sepsis in mice. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 1341-1348

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

Zantl N, Uebe A, Neumann B, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B, Heidecke CD, Pfeffer K. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun* 1998; 66: 2300-2309

Zhu J, Wang J, Sheng Y, Zou Y, Bo L, Wang F, Lou J, Fan X, Bao R, Wu Y, Chen F, Deng X, Li J. Baicalin improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis via suppressing inflammatory response and lymphocyte apoptosis. *PloS one* 2012; 7: e35523

## 7. Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler, mir ans Herz gewachsener Menschen nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Univers.-Prof. Dr. Hoeft für die Herstellung des Kontaktes zur Arbeitsgruppe Perimmune, sowie seinem Einsatz als ein entscheidender Mentor und Ratgeber, nicht nur in wissenschaftlichen Fragen. Seine Unterstützung und sein väterlicher, wohlwollender Rat haben sehr zu meiner persönlichen Entwicklung und zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen!

Bei Herrn Prof. Dr. Pascal Knüfermann und Herrn Prof. Dr. Georg Baumgarten möchte ich mich für die Überlassung des Themas, ihren kompetenten Rat und konstruktiven Gespräche und Kritik bei diesem Projekt bedanken. In diesem Sinne gilt mein Dank auch Herrn Prof. Dr. Witzenrath aus der Charité Berlin, ohne dessen bereitwillige Kooperation dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Bei einem weiteren Mentor, Herrn Priv.-Doz. Dr. Olaf Boehm, möchte ich mich ebenfalls ganz besonders bedanken: sowohl für die zahlreichen Stunden, die er mit meinen Fragen, den Korrekturen und organisatorischen Unwegsamkeiten beschäftigt war, als auch für sein Vertrauen in meine Fähigkeiten und die Freiheit, die er mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährt hat. Seine Motivation hat maßgeblich zum Gelingen beigetragen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Witzenrath an der Charité in Berlin herzlichen Dank für die freundliche Aufnahme in das Team während des Kooperationsprojektes. Besonders herzlich bedanke ich mich bei meiner Betreuerin vor Ort Frau Dr. med. vet. Birgitt Gutbier für die freundliche, professionelle Anleitung und uneingeschränkte und geduldige Bereitschaft auch am Wochenende mit mir Versuche durchzuführen.

Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Stilla Frede vielen Dank für das allseits tatkräftige und herzliche Entgegenkommen bei allen fachlichen Fragen und Problemen. Ohne ihre Erfahrung und wertvolle Unterstützung hätte diese Arbeit um einiges länger gedauert.

Dem gesamten Laborteam danke ich für seine freundliche, humorvolle und professionelle Unterstützung. Ganz besonders bei Frau Susanne Schulz möchte ich mich neben ihrer unermüdlichen Geduld bei meiner Einarbeitung in PCR & Co. vor allem für ihre Freundschaft bedanken.

Danke an meine größten Fans, meine Eltern, die immer an mich geglaubt haben, für ihre immerwährende Unterstützung.

Danke an meinen Mann, Grigorij Schleifer, für die zahllosen Stunden im Labor, für seinen stetigen Zuspruch auch bei Zeitdruck und Stress.