

**Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der polymikrobiellen
Sepsis und dessen Auswirkungen auf die arterielle Kontraktilität**

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

Anne Catrin Dörr
aus Neunkirchen/Saar

2016

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. R. Meyer
2. Gutachter: Apl.-Prof. Dr. G. Baumgarten

Tag der Mündlichen Prüfung: 30. 6. 2016

Aus dem Institut für Physiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Swandulla

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1 Sepsis	10
1.2 Angeborene Immunabwehr	12
1.3 Toll-like Rezeptoren	13
1.4 TLR2 Signaltransduktion	18
1.5 TLR4 Signaltransduktion	18
1.6 TLR9 Signaltransduktion	19
1.7 TLR9-Antagonist H154-ODN	19
1.8 CD14 Signaltransduktion	20
1.9 Funktion proinflammatorischer Zytokine	21
1.10 Arterielle Kontraktilität in der Sepsis	22
1.11 Sepsismodell	24
1.12 Ziele dieser Arbeit	25
2. Material und Methoden	27
2.1 Versuchstiere	27
2.2 Modell der polymikrobiellen Sepsisinduktion durch eine Colon ascendens stent peritonitis	27
2.2.1 Initialeingriff	27
2.2.2 ODN H154-Injektion	30

2.2.3	Klinische Verlaufskontrolle und Explantation der Aorta	30
2.3	Messung der arteriellen Kontraktilität	31
2.4	Organentnahme für die molekularbiologische Untersuchung	36
2.5	RNA-Isolation	36
2.6	cDNA Synthese	37
2.7	Quantitative Real-time PCR	38
2.8	Geräte	40
2.9	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	41
2.10	Statistische Auswertung der Daten	42
3.	Ergebnisse	43
3.1	Tierzahlen und Mortalitätsrate	43
3.2	Kontraktilitätsmessungen	43
3.3	Molekularbiologie	51
3.3.1	Zytokine	51
3.3.2	iNOS	53
3.3.3	PRRs	54
3.4	TLR9 Antagonist H154-ODN	55
3.4.1	Kontraktilitätsmessungen	55
3.4.2	iNOS	56
3.4.3	Zytokine	56
4.	Diskussion	58

4.1	Mausmodell und Sepsis	58
4.2	Einfluss der CASP auf die arterielle Kontraktilität	60
4.3	Einfluss der CASP auf TLR2-defiziente Tiere	61
4.4	Einfluss der CASP auf TLR4-defiziente Tiere	63
4.5	Einfluss der CASP auf TLR9-defiziente Tiere	64
4.6	Einfluss der CASP auf CD14-defiziente Tiere	65
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis	67
7.	Danksagung	83
8.	Lebenslauf	84

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivatorprotein-1
CD14	cluster of differentiation 14
CpG	Cytidin-Phosphorsäure-Guanosin-Motiv
DAG	Diacylglycerol
DNA	deoxyribonucleic acid
DC	dendritic cells
ER	endoplasmatisches Retikulum
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HZV	Herzzeitvolumen
IKK	I κ B-Kinase
IFN	Interferon
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IRAK	IL-1R-associated kinase
IRF-3	interferon regulatory transcription factor
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LPB	LPS binding protein
LRR	leucine-rich-repeat
MAP	mitogen activated protein
MD-2	MD-2 protein
MODS	Multi organ dysfunction syndrom
mRNA	messenger RNA
MyD88	myeloider Differentierungsfaktor 88
n	Stichprobenumfang
NEMO	IKK-g/NF- κ B essential modulator
NF- κ B	nuclear transcription factor- κ B
NLR	NOD like receptors
N.N.	nomen nescio
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
NOD	nucleotide-binding oligomerizaton domain
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

PAMP	pathogen associated molecular pattern
PRR	pattern recognition receptor
RNA	ribonukleinacid
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
ssRNA	single stranded RNA
TAB	TAK1 binding protein
TAK1	TGF β activated kinase 1
TBK-1	TANK (TRAF-family-member associated NF- κ B activator) binding kinase 1
TIR	Toll/IL-1- receptor domain
TIRAP	Toll/IL-1- receptor domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TPR	total peripheral resistance
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	Toll/IL 1R-domain containing adapter inducing IFN β
UBC13	Ubiquitin-conjugating enzyme 13
UEV1a	Ubiquitin-conjugating enzyme variant 1a

1. Einleitung

1.1 Sepsis

In Deutschland stellt die Sepsis mittlerweile die dritthäufigste, auf nicht kardialen Intensivstationen sogar die häufigste, Todesursache dar (Poeze et al., 2004) und ist damit für mindestens 60.000 Todesfälle im Jahr verantwortlich (Brunkhorst, 2006). Da die Zahl der Eingriffe mit Verwendung von Fremdmaterial zunimmt, aber auch wegen einer steigenden Anzahl immunsupprimierter Patienten und einer ansteigenden Zahl an Erregerresistenzen, ist mit einer weiteren Zunahme der Inzidenz der Sepsis zu rechnen (Graf et al., 2010).

Bei einer Sepsis handelt es sich um eine komplexe inflammatorische Antwort des Immunsystems auf eine Infektion. Diese wird in der Regel von infektiösen Mikro-organismen hervorgerufen und ist anfangs meist lokal begrenzt. Die Invasion dieser Erreger oder von deren Toxinen in den Blutkreislauf und die systemische Freisetzung von Entzündungsmediatoren, sogenannter Zytokine, münden in das sogenannte „Systemic Inflammatory Response Syndrom“ (SIRS). Die Effekte dieser Zytokine sind im Rahmen einer Infektion sehr nützlich. Kommt es aber zu einer überschießenden, nicht physiologischen Antwort des Immunsystems auf Pathogene, kann die systemische Ausschüttung der Zytokine fatale Folgen für den Organismus haben. So bewirken sie eine generalisierte Vasodilatation, daraus folgend einen erniedrigten totalen peripheren Widerstand (TPR) und eine hieraus resultierende Hypotension (Bone et al., 1992). Gleichzeitig ist die Permeabilität der Gefäßwände stark erhöht, es kommt zur Ausbildung eines interstitiellen Ödems und somit erhöhtem Volumenverlust. Zusätzlich ist durch die erhöhte NO Synthese die Kontraktilität des Myokards deutlich herabgesetzt (Baumgarten et al., 2006). Die daraus folgende verminderte Auswurfleistung des Herzens kann so wiederum eine bestehende Organminderperfusion verstärken. Es kommt zur fulminanten Sepsis, zum septischen Schock, zur Minderdurchblutung peripherer Organe und letztendlich zum Multiorganversagen, „Multi Organ Dysfunction Syndrome“ (MODS) (Bone et al., 1992).

Der septische Schock verläuft in zwei hämodynamisch wirksamen Phasen: Die initiale, hyperdynamische Phase ist geprägt von einer Zunahme der Herzfrequenz und einem erhöhten Herzzeitvolumen (HZV), mit dem Ziel einem Blutdruckabfall, bedingt durch die Verringerung des TPRs, entgegenzuwirken.

In der folgenden hypodynamischen Phase kommt es zu einem erheblichen Blutdruckabfall, welcher im weiteren Verlauf durch die entstehende Kardiomyopathie begünstigt wird. Der

septische Schock zeichnet sich somit durch eine unzureichende Steigerung der myokardialen Pumpfunktion im Verhältnis zum Abfall des TPRs aus.

Damit per definitionem eine Sepsis vorliegt, müssen mehrere Kriterien gemeinsam vorliegen. Das erste Kriterium ist die Diagnose einer Infektion im Blut über einen mikrobiologischen Nachweis. Zu Kriterium zwei gehören die typischen Symptome einer inflammatorischen Immunantwort (SIRS):

- Fieber oder Hypothermie
- Tachykardie
- Tachypnoe oder Hyperventilation
- Leukozytose oder Leukopenie.

Sind zwei dieser Kriterien erfüllt und der Nachweis der Erreger im Blut positiv spricht man von Sepsis. Kommt noch ein Organversagen mindestens eines Organsystemes hinzu, sind die Kriterien der schweren Sepsis erfüllt (Reinhart et al., 2010).

Wichtige Ausgangspunkte für die Entwicklung einer bakteriellen Sepsis sind vor allem die Atemwege, aber auch das Keimreservoir des Darmes stellt einen solchen Stimulus dar. Viele Erkrankungen, wie auch Entzündungen oder Ischämien des Gastrointestinaltraktes (GIT), sowie eine Pankreatitis, können in der Klinik über eine Infektion der Bauchhöhle zum Bild der abdominalen Sepsis führen (Herold et al., 2009). Hierbei handelt es sich in der Regel um Mischinfektionen durch grampositive und gramnegative Erreger entsprechend der Flora des Gastrointestinaltraktes (Astiz und Rackow, 1998; Bartels und Siewert, 1991; Martin et al., 2003). Im Dickdarm eines Erwachsenen befinden sich bis zu 10^{12} Keime/g, wobei die überwiegende Anzahl, etwa 95-99 %, der Bakterien im Colon zu den Anaerobiern gehört (Tabelle 1) (Mims et al., 2006). Ebenso werden einige Protozoen, wie z. B. *Entamoeba coli*, und *Mykoplasmen* zur normalen Darmflora gezählt.

Tab. 1: Bakterien der Darmflora (+++: bei 100 % der Bevölkerung vorhanden, ++: bei 25 % d.B., +: bei < 5 % d.B.), nach Mims et al., 2006: die physiologische Darmflora des Menschen besteht aus grampositiven und gramnegativen Bakterien.

grampositiv	Häufigkeit	gramnegativ	Häufigkeit
<i>Staphylokokkus epidermidis</i>	++	<i>Enterobacteriaceae (Escherichia coli)</i>	+++
<i>Staphylokokkus aureus</i>	+++	<i>Proteus species</i>	++
<i>Streptokokkus mitis</i>	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++
<i>Enterokokkus faecalis</i>	+++	<i>Bacteroides species</i>	+++
<i>Streptokokkus pyogenes</i>	+	<i>Clostridium species</i>	+++
<i>Bifidobakterium bifidum</i>	+++	<i>Clostridium tetani</i>	+
<i>Laktobazillus species</i>	+++	<i>Spirocheten</i>	+++
<i>Corynebakterien</i>	++		
<i>Mykobakterien</i>	++		

1.2 Angeborene Immunabwehr

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Körper vor infektiösen Mikroorganismen und deren toxischen Bestandteilen, sowie vor körpereigenen entarteten und fremden Zellen zu schützen. Es lässt sich in die angeborene und die erworbene Immunabwehr unterteilen. Dies gilt sowohl auf zellulärer, als auch auf humoraler Ebene.

Das angeborene Immunsystem ist ein phylogenetisch hoch konserviertes System, welches durch Phagozyten (Makrophagen, dendritische Zellen) kommuniziert. Es besitzt eine Reihe sogenannter Mustererkennungsrezeptoren, die „Pattern Recognition Receptors“ (PPRs), die ihrerseits spezifische Virulenzmuster, sogenannte „Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) erkennen (Akira et al., 2006). Im Gegensatz dazu hat das erworbene Immunsystem die Aufgabe, eingedrungene Pathogene durch die aktive Bildung von Antikörpern zu eliminieren und ist zusätzlich verantwortlich für die Ausbildung sogenannter Gedächtniszellen, die es erlauben, spätere, gleichartige Infektionen schneller zu bekämpfen (Akira et al., 2006).

Eine erste natürliche Barriere bilden die inneren und äußeren Epithelien wie Epidermis und Mukosa. In den Körper eingedrungene Pathogene werden zuerst von Gewebsmakrophagen erkannt, welche in der Lage sind, Erreger sofort aufzunehmen und zu vernichten. Damit

diese Erreger erkannt werden, besitzen Makrophagen PRRs an ihrer Oberfläche, wie alle Zellen der angeborenen Immunabwehr. Diese erkennen bestimmte Muster von Pathogenen (Medzhitov und Janeway, 2000b). PAMPs werden nur von Erregern exprimiert, weshalb das Immunsystem aus deren Vorhandensein darauf schließen kann, ob es sich um eine körpereigene oder körperfremde Struktur handelt. Da diese Merkmale auch wichtig für das Überleben der Pathogene sind, es daher schwierig für den Erreger ist, sie zu ändern, stellen sie einen optimalen Angriffspunkt dar. Außerdem ist es den einzelnen PRRs möglich, verschiedene Pathogenkomponenten zu erkennen, welche untereinander strukturell unterschiedlich sind. Somit kann eine limitierte Anzahl von PRRs zahlreiche Arten von Erregern erkennen (Akira, 2009; Medzhitov, 2001). Das angeborene Immunsystem kann mithilfe der PRRs Pathogene für das Komplementsystem markieren (opsonieren), Makrophagen können die Erreger phagozytieren oder es werden Signalkaskaden aktiviert, die die erworbene Abwehr einschalten (Medzhitov und Janeway, 2000a).

Wichtige Vertreter aus der Gruppe der PRRs sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs). Sie werden auf unterschiedlichen Immunzellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten, exprimiert. Aber auch auf nicht immunkompetenten Zellen, wie Fibroblasten oder Epithelzellen, kommen sie vor (Zarembek und Godowski, 2002). Die TLRs detektieren unterschiedliche PAMPs an der Zelloberfläche oder intrazellulär und lösen in der Folge verschiedene Signalkaskaden zur Induktion proinflammatorischer Gene aus. Weitere PRRs sind „Cluster of differentiation“ 14 (CD14) und „Nucleotide-binding Oligomerization Domain“ (NOD)–Rezeptoren.

1.3 Toll-like Rezeptoren

Die Familie der Toll-like Rezeptoren spielt eine bedeutende Rolle für die Erkennung von mikrobiellen Pathogenen (Takeda und Akira, 2003). TLRs induzieren die Ausschüttung von Zytokinen, die Aktivierung von dendritischen Zellen und sind zudem wichtig für die Interaktion mit dem erworbenen Immunsystem.

Bisher wurden 13 verschiedene TLRs beschrieben (Takeda und Akira, 2005; Zhang et al., 2004) (Tabelle 2). Diese können in die zwei Gruppen membranständige- und intrazelluläre TLRs unterteilt werden. Die TLR2 und 4 sitzen auf der Zelloberfläche und detektieren Strukturen der Zellmembran, wie Proteine oder Lipide. Die anderen, nämlich die TLR3, 7, 8

und 9 sind intrazellulär in Endosomen und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und erkennen virale und bakterielle DNA oder RNA (Takeda und Akira, 2005).

Bei den Toll-like Rezeptoren handelt es sich um transmembranäre Glykoproteine, bestehend aus einer extrazellulären, leucinreichen Liganden-Bindungsdomäne (Leucine-rich-repeats, LRR) und einem zytoplasmatischen Teil, der große Ähnlichkeit zum Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) zeigt und deshalb Toll/IL-1-Rezeptor (TIR) genannt wird (Akira et al., 2006). Bindet ein passender Ligand an seinen entsprechenden Rezeptor, werden über Signalkaskaden die Transkriptionsfaktoren „Nuclear transkription factor- κ B“ (NF- κ B) und „Aktivatorprotein-1“ (AP-1) aktiviert (Takeda und Akira, 2004), welche nach Translokation in den Zellkern eine Vielzahl von unter anderem inflammatorisch wirksamen Genen aktivieren.

Es existieren zwei verschiedene Signalwege für Toll-like Rezeptoren: Die MyD88-abhängige und die MyD88-unabhängige Signaltransduktion (Abbildung 1). Bei dem MyD88-abhängigen Signalweg verbindet sich das Adaptormolekül MyD88 nach Bindung eines Liganden mit der zytoplasmatischen TIR-Domäne des TLRs (Kawai et al., 1999; Medzhitov et al., 1998; Takeuchi et al., 2000a). Hierzu wird zusätzlich ein Molekül namens „Toll/IL-1- receptor domain containing adaptor protein“ (TIRAP) oder Mal benötigt (Horng et al., 2001; Horng et al., 2002; Yamamoto et al., 2002a). Anschließend lagern sich IRAK-4 (IL-1R-associated kinase 4) und IRAK-1 an, wobei IRAK-1 von IRAK-4 phosphoryliert wird (Li et al., 2002).

Die phosphorylierte IRAK-1 rekrutiert „TNF-receptor associated factor 6“ (TRAF6) (Arch et al., 1998) und zusammen dissoziieren sie vom Rezeptor ab. IRAK-1 verbleibt in der Membran und wird abgebaut, während TRAF6 nun mit „TGF β activated kinase 1“ (TAK1), „TAK1 binding protein 1“ (TAB1) und TAB2 interagiert. Dieser Komplex wiederum formt nun einen Größeren mit den E2 Ligasen Ubc13 und Uev1A, was dann die Aktivierung von TAK1 einleitet (Deng et al., 2000).

Die aktivierte TAK1 phosphoryliert den IKK-Komplex, bestehend aus IKK α , IKK β und NEMO/IKK γ sowie MAP Kinasen, wie zum Beispiel JNK. Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert I κ B, wodurch nun der Transkriptionsfaktor NF- κ B frei wird und in den Zellkern translozieren kann, wo er zuständig ist für die Induktion proinflammatorischer Zytokine (Wang et al., 2001). Gleichzeitig aktivieren die MAP Kinasen den Transkriptionsfaktor AP-1 (Takeda und Akira, 2004).

Wie bereits erwähnt existiert ebenfalls ein MyD88-unabhängiger Signalweg (für TLR4 und 3) (Takeda and Akira, 2004). Hierbei werden TBK-1 oder IKKi/IKK ϵ durch TRIF (Oshiumi et al.,

2003; Yamamoto et al., 2002b) und das Molekül TRAM (TRIF-related adaptor molecule) aktiviert (Fitzgerald et al., 2003). Diese phosphorylieren IRF-3, das nun in den Zellkern translozieren kann, um dort die Expression von IFN- β und IFN-induzierbaren Genen zu vermitteln. Zusätzlich wird über den MyD88-unabhängigen Weg NF- κ B verzögert aktiviert (Takeda und Akira, 2004).

Alle genannten TLRs werden nicht nur auf immunkompetenten Zellen der angeborenen Immunabwehr exprimiert. In der Literatur wird beschrieben, dass TLR2 und 4 auf menschlichen glatten Muskelzellen (VSMCs: vascular smooth muscle cells) und epithelialen Zellen vorkommt (Paolillo et al., 2012; Sukkar et al., 2006). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass VSMCs funktionelle TLRs ausbilden und über diese die inflammatorische Immunantwort angestoßen wird. So wird TLR2 in der Wand von Arterien ausgebildet (Yang et al., 2005), ebenso vermittelt TLR4 inflammatorische Effekte in menschlichen glatten Muskelzellen der Aorta (Li et al., 2007; Lin et al., 2006). Zusätzlich werden TLR2 und 4 in Endothelzellen exprimiert (Faure et al., 2000). Somit werden inflammatorische Prozesse zusätzlich direkt am Gefäß selbst vermittelt.

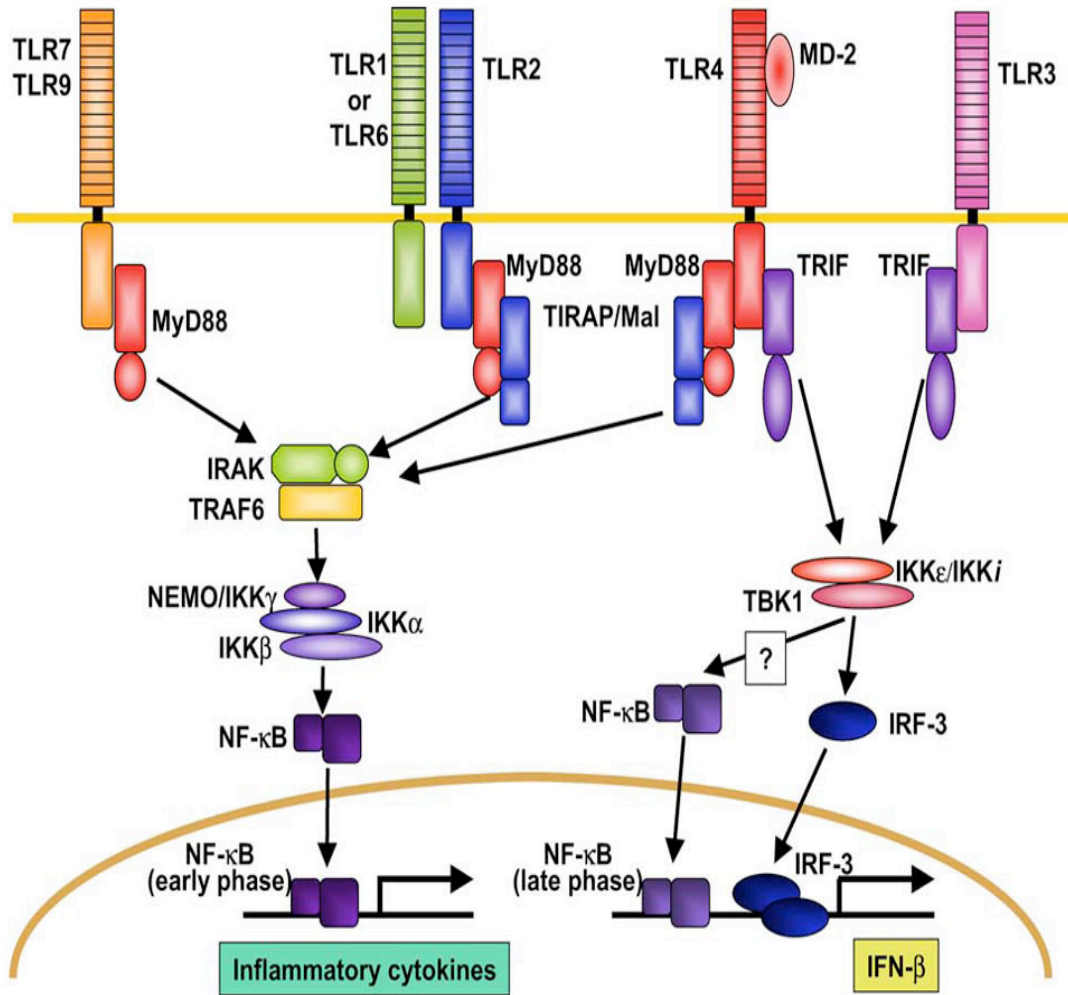


Abb. 1: Signalwege und Genregulation der Toll-like Rezeptoren 1 bis 9 nach Takeda und Akira, 2004: Gezeigt werden sowohl der MyD88-abhängige Signalweg, als auch der TRIF-abhängige Signalweg. Beide Signalwege aktivieren den Transkriptionsfaktor NF-κB, wodurch die Produktion inflammatorischer Zytokine eingeleitet wird.

Tab. 2: Exo- und endogene Liganden der TLRs nach Takeda und Akira, 2004

Rezeptor	Ligand	Ursprung des Liganden
TLR1 TLR2 Co-Rezeptor	Triacylierte Lipoproteine Lösliche Faktoren	Bakterien und Mykobakterien Neisseria meningitidis
TLR2	Lipoprotein/Lipopeptide Peptidoglykan Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Phenol-lösliches Modolin Glycoinositolphospholipide Glycolipide Porine Atypisches Lipopolysaccharid Atypisches Lipopolysaccharid Zymosan Sauerstoffradikale β -Defensin High Mobility Group Protein Box 1 Heat-shock Protein 60 Heat-shock Protein 70 Heat-shock Protein gp96 Fibronektin	Unterschiedliche Pathogene Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mykobakterien Staphylococcus epidermis Trypanosoma cruzi Treponema maltophilum Neisseria Leptospira interrogans Porphyromonas gingivalis Pilze Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt
TLR3	dsRNA mRNA	Viren Wirt
TLR4	Lipopolysaccharid Taxol Fusionsprotein Hüllprotein Heat-shock Protein 22 Heat-shock Protein 60 Heat-shock Protein 70 Heat-shock Protein gp96 Type 3 Repeat Domain A des Fibronektins β -Defensin High Mobility Group Protein Box 1 Surfactant Protein A Heparansulfat Hyaluronsäure Fibrinogen	Gram-negative Bakterien Pflanzen Syncytialer Atemwegvirus Murines Mammacarcinivirus Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt
TLR5	Flagellin	Gram-negative Bakterien
TLR6 TLR2 Corezeptor	Diacylierte Lipopeptide	Mycobakterien
TLR7	ssRNA ssRNA snPNPs	Non-virale und virale ssRNA Wirt Wirt
TLR8	ssRNA ssRNA	Non-virale und virale ssRNA Wirt
TLR9	CpG enthaltende DNA	Bakterien
TLR10 Corezeptor?	N.N.	
TLR11		Uropathogene E. coli
TLR12	N.N.	
TLR13	N.N.	

Im Folgenden werden die Besonderheiten der TLR2, 4 und 9, sowie des PRR CD14 genauer beschrieben. Da die übrigen TLRs nicht Bestandteil der Untersuchungen dieser Arbeit waren, werden sie hier nicht näher beschrieben.

1.4 TLR2 Signaltransduktion

TLR2 erkennt eine Vielzahl von mikrobiellen Komponenten an der Zelloberfläche: Lipoproteine/Lipopeptide von verschiedenen Pathogenen, Peptidoglycan und Lipoteichonsäure von grampositiven Bakterien und Lipoarabinomannan von *Mycobakterien* als Beispiele (weitere Liganden in Tabelle 2) (Takeda et al., 2003). Außerdem erkennt er LPS-Präparate von Nicht-Enterobakterien wie z. B. *Leptospira interrogans*, *Porphyromonas gingivalis* oder *Helicobacter pylori* (Hirschfeld et al., 2001; Smith Jr et al., 2003; Werts et al., 2001). Dieses LPS zeigt aber strukturelle Unterschiede zu dem von gramnegativen Bakterien, weshalb es nicht von TLR4 erkannt wird (Netea et al., 2002). TLR2 schaltet den MyD88-abhängigen Signalweg an, der zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt.

1.5 TLR4 Signaltransduktion

TLR4 ist der Oberflächenrezeptor für Lipopolysaccharid (LPS) (Hoshino et al., 1999; Poltorak et al., 1998). LPS ist ein wesentlicher Bestandteil der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien und wird bei deren Zerfall freigesetzt. Es wirkt als starkes Endotoxin stimulierend auf das Immunsystem und kann einen septischen Schock auslösen (Akira et al., 2006).

LBP (Lipopolysaccharide binding-protein) ist ein Akute-Phase-Protein, das bakterielles LPS bindet (Ulevitch und Tobias, 1995; Wright et al., 1989) und auf einen Oberflächen-Rezeptor-Komplex aus CD14, MD-2 und TLR4 überträgt (Schumann et al., 1990; Shimazu et al., 1999; Tobias et al., 1986; Wright et al., 1990). LPS bindet zunächst hochaffin an CD14 und wird dann mit dem MD-2-TLR4-Komplex verbunden (Kim et al., 2005). Hierbei scheint CD14 eine entscheidende Rolle zu spielen, da Mäuse mit einem Defekt an CD14 resistent gegen LPS sind (Haziot et al., 1995; Haziot et al., 1996; Knuefermann et al., 2002). Der fertige Komplex aus LPS/LBP/CD14/MD-2 und dem TLR4 Rezeptor führt zur Dimerisierung des TLR4 Rezeptors und aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden (Kawai und Akira, 2007).

Durch TLR4 werden zwei verschiedene Signalwege initiiert: Zum einen der MyD88-abhängige, der auch von allen anderen TLRs außer TLR3 aktiviert wird und zur Freisetzung

proinflammatorischer Zytokine führt (Takeuchi et al., 2000a), zum anderen der MyD88-unabhängige Signaltransduktionsweg, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 und somit IFN- β und zur Induktion verschiedener IFN-induzierbarer Gene führt (Kawai et al., 2001) und vermutlich nur von TLR3 und 4 angeschaltet wird.

1.6 TLR9 Signaltransduktion

TLR9 ist der intrazellulär gelegene Rezeptor für bakterielle DNA von sowohl grampositiven als auch gramnegativen Bakterien (CpG DNA = Cytidin-Phosphorsäure-Guanosin-Motiv) (Hemmi et al., 2000). Zusätzlich erkennt TLR9 die DNA verschiedener Viren, wie z. B. die von Herpes simplex Virus Typ 1 und 2, sowie Adenoviren oder Zytomegalieviren. Ausschlaggebend ist hierbei ein hoher Anteil von unmethylierten 2'-desoxyribocytidin-Phosphat-Guanosin-Motiven. Diese CpG-Motive sind im prokaryotischen Genom bis zu zwanzigmal häufiger vorhanden und zu 98 % unmethyliert (Krieg et al., 1995).

Von seinem Bildungsort, dem endoplasmatischen Retikulum, wandert der TLR9 Rezeptor ins Endosom, wo er unter anderem an der intrazellulären Membran vorliegt. Trotz seiner unterschiedlichen Lokalisation gibt es einige Gemeinsamkeiten zum Signalweg des TLR4 Rezeptors. Nach Ligandenbindung wird der Rezeptor aktiviert und das Adaptermolekül MyD88 wird aus dem Zytoplasma zur TIR-Domäne an der Endosomenmembran rekrutiert. TLR9 folgt also dem MyD88-abhängigen Signaltransduktionsweg, mit dem Unterschied, dass weitere Mitglieder der MyD88-Familie wie TIRAP, TRIF oder TRAM nicht an der Kaskade beteiligt sind.

1.7 TLR9-Antagonist H154-ODN

Der TLR9 Rezeptor wird von unmethylierten CpG-Motiven aus bakterieller DNA aktiviert. Erkennt der Rezeptor einen solchen Liganden, werden intrazellulär Signalkaskaden angeschaltet und es kommt zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Im weiteren Verlauf kann es zu kardialer Depression, Hypotonie, Multiorganversagen oder auch zum Tod kommen.

Studien haben gezeigt, dass TLR9-defiziente Mäuse eine reduzierte Sterblichkeit in der polymikrobiellen Sepsis aufweisen (Plitas et al., 2008, Lohner et al., 2013) und dass TLR9 Antagonisten vor Sepsis induziertem Nierenversagen schützen (Yasuda et al., 2008). Ein Beispiel für solch einen Antagonisten ist das Phosphorothioat-stabilisierte Oligo-

deoxynukleotid (ODN) H154-thioat (5-CCTCAAGCTTGAGGGG-3'). Sowohl bakterielle DNA, als auch synthetisch hergestellte ODNs enthalten unmethylierte CpG-Motive, die eine heftige Immunantwort der angeborenen Abwehr auslösen. Die stimulierende Funktion kann entweder durch Entfernen der CpG DNA oder durch Einsetzen von inhibitorischen/hemmenden Motiven abgewandelt werden. Es ist bekannt, dass supprimierende Sequenzmotive in der DNA die Stimulation des Immunsystems selektiv blockieren können (Krieg et al., 1998). Diese Motive enthalten poly-G oder -GC Sequenzen, sind methyliert und kommen auf Säuger-DNA und bestimmten Viren vor (Chen et al., 2001; Lenert et al., 2001). Stimulatorische und inhibitorische DNA bindet an die gleichen Rezeptoren (Yamada et al., 2002). ODNs, mit beiden Sequenztypen auf einem Einzelstrang DNA vereint, binden folglich an ihren Rezeptor und vermindern die Induktion der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 (Chen et al., 2001).

Das inhibitorisch wirksame ODN H154 könnte eine neue therapeutische Option darstellen in Situationen, in denen die eigene Immunantwort zur eigentlichen Pathologie wird, wie im Falle des septischen Schocks.

1.8 CD14 Signaltransduktion

CD14 ist ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI) – verankertes Rezeptorprotein, das auf der Zelloberfläche von dendritischen Zellen (dendritic cells = DC) oder in seiner löslichen Form exprimiert wird (Pugin et al., 1994). Intrazellulär befindet sich eine Domäne zur Signaltransduktion. Der Rezeptor besteht aus elf LRRs und agiert als Co-Rezeptor für TLR1, 2, 3, 4 und 6, sowie TLR7 und 9. CD14 fungiert als eine Art LPS-Sensor, erhöht somit die Sensitivität der angeborenen Immunabwehr und erleichtert die Erkennung von LPS durch den TLR4/MD2 Komplex. Zusätzlich existiert ein neu beschriebener Signalweg für CD14, der durch LPS initialisiert wird und der alleine auf CD14 beruht. Hierbei kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT in dendritischen Zellen (Zanoni et al., 2009) und CD14 agiert unabhängig von TLRs als Transduktionsrezeptor (Ostuni et al., 2010).

Nach LPS-induzierter Zusammenlagerung rekrutiert und aktiviert CD14 eine Src Familien-Kinase (SFK). Die aktivierte SFK phosphoryliert PLC γ_2 (Phospholipase C γ_2), welches wiederum die Hydrolyse von PI(4,5)P $_2$ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in die second messenger Diacylglycerol (DAG) und IP $_3$ (Inositoltriphosphat) katalysiert. Die Rolle von DAG in diesem System ist noch nicht vollständig untersucht, jedoch ist anzunehmen, dass es an

der Aktivierung von NF- κ B mitwirkt. IP₃ hingegen öffnet Ca²⁺-Freisetzungskanäle an der Membran des ER und erhöht somit die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration. Die erhöhte Ca²⁺-Konzentration stimuliert die Aktivierung von Calcineurin, welches NFAT dephosphoryliert. Dadurch transloziert NFAT in den Zellkern, wo es mit NF- κ B kooperiert und die Expression von IL-2 und anderen proapoptischen Proteinen veranlasst (Ostuni et al., 2010).

1.9 Funktion proinflammatorischer Zytokine

In Kapitel 1.3 wurde erwähnt, dass die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B sowie AP-1 zur vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt. So ist bekannt, dass der Virulenzfaktor LPS zu einer vaskulären Inflammation führt und es via TLR4 zur Induktion der proinflammatorischen Zytokine wie IL-1, IL6 und TNF α im Gewebe der Aorta kommt (Ehrentraut et al., 2007).

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) spielt eine Schlüsselrolle bei der lokalen inflammatorischen Immunantwort und wird im zeitlichen Verlauf als eines der ersten Zytokine von Monozyten/Makrophagen freigesetzt. Er hat vielfältige Aufgaben, so rekrutiert er weitere Makrophagen, induziert die Produktion von Zytokinen und erhöht die vaskuläre Permeabilität (Clauss et al., 2001; Vassalli, 1992). Zudem fördert TNF- α seine eigene Ausschüttung aus Makrophagen und stößt somit die Signalkaskade weiter an. Mehrere Studien konnten zeigen, dass TNF- α eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Sepsis spielt (Locksley et al., 2001; Mannel und Echtenacher, 2000). Diese Ergebnisse werden unterstützt durch die Beobachtung, dass Injektionen von TNF- α in Mäusen zu Symptomen führen, die typisch für eine Sepsis sind (Michie et al., 1988).

Oft agieren IL-1 und TNF synergistisch (Dinarello, 2000). Beide bewirken eine Induktion proinflammatorischer Gene wie der Typ II Phospholipase A₂ (PLA₂), Cyclooxygenase (COX)-2 und induzierbaren NO Synthase (iNOS, NOS2). Des Weiteren sind IL-1 und TNF Induktoren von endothelialen Adhäsionsmolekülen, die essentiell sind für die Anlagerung der Leukozyten an das Endothel, und begünstigen somit deren Auswanderung ins Gewebe (Dinarello, 2000).

IL-1 β ist in der Lage, über den Interleukin-1-Rezeptor eine Signalkaskade anzuschalten, die im Wesentlichen der TLR4 Signaltransduktion entspricht. IL-1 β wird ebenso wie TNF vorwiegend von Makrophagen/Monozyten exprimiert und wirkt auf zentraler, als auch auf peripherer Ebene. So ist es an der Entstehung des Fiebers über COX-2-Produktion und

anschließender Prostaglandin E-Erhöhung beteiligt (Dinarello, 2004). IL-1 β wirkt in der Peripherie bevorzugt am Endothel und führt zu Urticaria und Ödemen. Es agiert im Knochenmark und führt zur Mobilisierung von granulozytären Vorläuferzellen und reifen Neutrophilen, es kommt zur Neutrophilie. Der Körper spricht weniger gut auf das Hormon Erythropoietin an, somit kommt es zur Anämie. Außerdem fördert IL-1 β die Freisetzung von IL-6 (Dinarello, 2005).

IL-6 spielt eine große Rolle bei der Kommunikation zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr. Es aktiviert membrangebundene IL-6 Rezeptoren (z. B. in Leber und Leukozyten) und lösliche IL-6 Rezeptoren. Zirkulierendes Interleukin 6 stimuliert die Leber zur Bildung von Akute-Phase-Proteinen und fördert die Plättchen-Produktion, es kommt zur Thrombophilie. Des Weiteren wirkt IL-6 stimulierend und antiapoptotisch auf T-Lymphozyten, erhöht die Immunglobulinsekretion der B-Lymphozyten via Plasmazellen und fördert die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen (Jones, 2005).

Interleukin-10 wird eine eher antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben. Bindet IL-10 an seinen zellulären Rezeptorkomplex wirkt dies inhibierend auf die Antigen-präsentierende Funktion von Makrophagen und dendritischen Zellen (Ding und Shevach, 1992; Fiorentino et al., 1991a, 1991b). Somit wird die Produktion von Zytokinen gehemmt. Weiterhin wird die Bildung Co-stimulatorischer Moleküle wie CD80 und MHC-Molekülen der Klasse 2 und die Chemokinexpression (Ding et al., 1993; Jinquan et al., 1993; Kasama et al., 1994), sowie deren Rezeptorexpression (Takayama et al., 2001), gehemmt. Dadurch wird die Aktivierung des Immunsystems reduziert und gleichzeitig die Ausschüttung von Zytokinen vermindert. Außerdem werden teilweise Wirkungen anderer Zytokine, wie TNF- α oder IFN- γ , inhibiert (Pestka et al., 2004), die Entwicklung und das Überleben von B-Zellen und NK-Zellen werden gefördert (Cai et al., 1999; Ishida et al., 1992).

Weiterhin wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass IL-10 defiziente Mäuse spontan Enterokolitiden entwickeln (Sewnath et al., 2001), zu opportunistischen Infektionen neigen (Gazzinelli et al., 1996) und vermehrt mit Allergien und Asthma reagieren (Grunig et al., 1997; Tournoy et al., 2000).

1.10 Arterielle Kontraktilität in der Sepsis

Der prinzipiell dreischichtige Aufbau der arteriellen Gefäßwand aus *Intima*, *Media* und *Adventitia* zeigt je nach Lokalisation der jeweiligen Arterie unterschiedliche histologische

Merkmale. Für unsere Betrachtung ist vor allem die Media, die mittlere Schicht der Arterie, von besonderer Bedeutung, da sie durch die in ihr angesiedelte glatte Muskulatur maßgeblich an der Regulierung des TPRs und damit an der Einstellung des arteriellen Druckes beteiligt ist.

Der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur ist verschiedenen Regulationsmechanismen unterworfen, die im Folgenden erläutert werden sollen. In der glatten Muskelzelle sind Aktin- und Myosinfilamente, zusammen mit Tropomyosinmolekülen, Caldesmon, Calponin und Calmodulin am sogenannten Querbrückenzyklus beteiligt. Durch Filamentverschiebungen, die letztendlich zur Filamentverkürzung und somit zur Kontraktion der Gefäßmuskulatur führen, kann der Gefäßtonus, vor allem im Bereich der kleinsten Arteriolen, beeinflusst werden. Gesteuert werden die einzelnen Kontraktionen von phosphorylierenden bzw. dephosphorylierenden Enzymen, die entsprechend der intrazellulären Kalziumkonzentration, die Aktivierung oder Relaxation der glatten Muskulatur auslösen. Die Phosphorylierung des Myosins bestimmt maßgeblich den Kontraktionsgrad der glatten Muskulatur, wobei phosphorylierende und dephosphorylierende Vorgänge gleichzeitig ablaufen. Demzufolge kann über die Modulation der Enzyme Myosin-Leicht-Ketten-Kinase (Myosin-Light-Chain-Kinase = MLCK) und Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase (Myosin-Light-Chain-Phosphatase = MLCP) der Phosphorylierungsgrad des Myosins und somit der Kontraktionsgrad beeinflusst werden (Brenner, 2005). Hierdurch wird die Empfindlichkeit des glatten Muskels für Kalzium verändert und somit sind MLCK und MLCP Zielproteine zahlreicher Signalkaskaden, die über diesen Weg den Tonus der glatten Muskulatur beeinflussen.

Ein Beispiel für die Hemmung der MLCK ist der Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO). Stickstoffmonoxid wird in vielen Zellen des Körpers aus der Aminosäure L-Arginin gebildet, vor allem im Endothel von Blutgefäßen. NO ist nicht nur Regulator des Gefäßtonus, sondern ist gleichzeitig Neurotransmitter, Makrophagenzytotoxin, Hemmer der Plättchenaggregation und ein Radikal. NO wird synthetisiert von dem Enzym NO-Synthase (NOS). NOS kommt in drei Formen vor, von denen die endotheliale NOS (eNOS) und die neuronale NOS (nNOS) konstitutiv exprimiert werden, während die induzierbare NOS (iNOS) auf transkriptioneller Ebene induzierbar ist. Die konstitutive NO-Bildung wird über die zytosolische Kalziumkonzentration kontrolliert, wobei Kalzium aus intrazellulären Speichern die eNOS aktiviert (Govers und Rabelink, 2001). Induktoren der iNOS sind neben LPS und reaktiven Sauerstoffverbindungen vor allem proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ , TNF α , IL-1 β und

andere. Hierbei spielen die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT1 eine zentrale Rolle (Liew, 1994; Persichini et al., 2006).

NO aktiviert die Guanylylcyclase, die aus GTP zyklisches GMP (cGMP) produziert, welches wiederum die Proteinkinase G aktiviert. Diese aktiviert durch Phosphorylierung die MLCP. Hieraus folgt eine reduzierte Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten und somit eine Tonusabnahme der glatten Muskulatur. Es kommt zur Vasodilatation.

So kommt NO im Rahmen der Sepsis eine besondere Rolle als Vermittler zu. Es ist bekannt, dass die iNOS Expression während Sepsis unter anderem in Makrophagen, Endothelzellen und VSMC stark zunimmt und dass im septischen Verlauf vermehrt körpereigenes NO gebildet wird (Evans et al., 1993; Parratt, 1997; Vallance und Moncada, 1993). Außerdem scheint das vaskulär über iNOS gebildete NO verantwortlich für die vaskuläre Dysfunktion im septischen Schock zu sein (Gunnnett et al., 1998). Im septischen Schock korrelieren hohe NO-Plasmaspiegel mit erniedrigtem TPR und erhöhten Endotoxin- und Zytokinspiegeln (Endres und Eigler, 1997).

1.11 Sepsismodell

Es sind viele Möglichkeiten, eine Sepsis experimentell nachzuahmen, bekannt. Über Bolus-Injektionen von lebenden Bakterien, spezifischer bakterieller Pathogene wie Lipoteichonsäure (LTS) und Lipopolysaccharid (LPS), bis zur Injektion von Zytokinen wie TNF und IL-1 β sind bereits zahlreiche Modelle vorhanden. So wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass TLR4 maßgeblich am septischen Herzversagen beteiligt ist (Baumgarten et al., 2001, 2006). Ebenso wurde demonstriert, dass injizierte CpG-Oligonukleotide über TLR9 zur myokardialen Dysfunktion führen (Knuefermann et al., 2008) und dass CD14-Defizienz vor Sepsis schützt (Knuefermann et al., 2002).

Derartige Injektionen von reinen Virulenzfaktoren spiegeln allerdings nicht die tatsächliche klinische Situation wider. Hierbei handelt es sich, wie bereits erwähnt, meist um Mischinfektionen sowohl aus grampositiven, als auch gramnegativen Erregern, wobei das jeweilige Spektrum sich durchaus verschieben kann (Riedemann et al., 2003). Zusätzlich spielen neben den spezifischen Virulenzfaktoren allein andere Effekte oder Interaktionen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Sepsis, welche z.T. patientenbezogen auftreten. So können die Prädisposition, aber auch die Infektionsquelle selbst und die

spezifische inflammatorische Antwort des Organismus zu unterschiedlichen Effekten führen, die schwer in einem Modell einzuplanen sind (Levy et al., 2003).

Maier et al. beschreiben Caecum Ligatur und Punction (CLP) sowie Colon ascendens stent peritonitis (CASP) als Modelle einer polymikrobiellen Sepsisinduktion, die näher an die klinischen Aspekte der Sepsis heranreichen. Hierbei scheint das CLP-Modell eher die intraabdominelle Abszessbildung, mit nur gering ausgeprägter Entzündung, nachzuahmen. Das CASP Modell spiegelt demnach den klinischen Verlauf einer diffusen Peritonitis mit einer frühen und stetig steigenden systemischen Infektion (SIRS) deutlicher wider (Maier et al., 2004).

Hinzu kommt, dass es bisher nur wenig erfolgreiche Ansätze in der immunmodulatorischen Therapie, die auf Faktoren wie TNF, IL-1 β oder LPS abzielt, gibt. So zeigte sich beispielhaft der Behandlungsversuch mit dem TNF-Rezeptor Fc Fusionsprotein (Fisher et al., 1996) frustrierend: Es konnte nicht nur keine Mortalitätsreduktion festgestellt werden, sondern bei Anwendung erhöhter Dosen kam es im Gegenteil zu erhöhter Sterblichkeit. Aus diesen Gründen ist es wichtig, sich methodisch wie therapeutisch neu zu orientieren, um weitere Aspekte und Effekte der Sepsis zu untersuchen.

1.12 Ziele dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, den Einfluss der einzelnen Toll-like Rezeptoren und des CD14 Rezeptors auf die vaskuläre Kontraktilität in der Sepsis zu untersuchen. Weiterhin soll die Wirksamkeit eines TLR9-Antagonisten hinsichtlich seiner Wirksamkeit auf die septische vaskuläre Dysfunktion untersucht werden.

Zu Grunde lag die Annahme, dass die durch polymikrobielle Sepsis verursachte kardiovaskuläre Kreislaufdepression durch TLRs vermittelt bzw. unterstützt wird. Zu beweisen war, ob die Abnahme des TPR im Besonderen durch fehlende TLR-Vermittlung weniger ausgeprägt bzw. aufgehoben werden kann. Ebenso, gerade im Hinblick auf eventuelle pharmakologische Angriffspunkte, interessierte uns, ob sich die TLR-Signalkaskade antagonisieren lässt. Auf molekularbiologischer Seite wollten wir untersuchen, ob sich in der Zytokinexpression Änderungen ergeben, die diese These unterstützen könnten.

Somit könnte ein zukünftiger klinischer Therapieansatz der Behandlung von SIRS und Sepsis in der Blockierung der über TLR vermittelten Immunreaktion liegen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellt die Sepsis heutzutage nach wie vor eine große Herausforderung für Mediziner dar und die therapeutischen Optionen sind begrenzt. Aus diesen Gründen ist das Interesse an alternativen Behandlungsansätzen groß und gibt Anlass, sich in Zukunft verstärkt mit diesem Thema zu beschäftigen.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

12-14 Wochen alte weibliche und männliche C57BL/6 Mäuse (Kontrolle), sowie TLR 2, 4,9 und CD14 defiziente Mäuse wurden für die Studie eingesetzt. Die Tiere stammten aus eigener Zucht und wurden in Käfigen mit Zugang zu Wasser und Standardfutter gehalten (entsprechend der Empfehlungen für Umgang mit Versuchstieren (NIH publication No. 85-23, revised (1996)). Das Versuchsvorhaben wurde vom Landesamt für Natur- und Verbraucherschutz NRW geprüft und bewilligt (TVA 8.87-51.04.20.09.391)

2.2 Modell der polymikrobiellen Sepsisinduktion durch eine Colon ascendens stent Peritonitis

2.2.1 Initialeingriff

Die Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) ist ein Modell zur Sepsisinduktion, welches einer generalisierten, polymikrobiellen Sepsis beim Patienten möglichst nahe kommen soll. Hierzu wird in einer kurzen Operation einer Maus ein Stent in das Colon ascendens implantiert, wobei eine physikalische Verbindung zwischen Darmlumen und Peritoneum hergestellt wird. Durch diese Verbindung kann nun kontinuierlich Darminhalt in die Bauchhöhle austreten.

Die Durchführung der CASP basiert in weiten Teilen auf dem von Maier et al. 2004 beschriebenen Vorgehen:

Die Tiere wurden mit einem Forene[®] (Wirkstoff: Isoflurane, Dräger[®]Vapor) 2,5 % Gemisch im Verhältnis 30/70 in einer Inhalationsbox narkotisiert, nach 5 Minuten wurde die Gaskonzentration auf 1,5 % reduziert. Im Anschluss daran wurden die Tiere in Rückenlage auf den zuvor auf 37 °C erwärmten OP-Tisch gelegt und mit Leukosilk fixiert. Anschließend wurde das Fell gekürzt und Enthaarungscreme aufgetragen. Nach Entfernen der Creme und Reinigen der enthaarten Bauchdecke erfolgte die Desinfektion mit Betaisodona[®] Lösung unter Einhaltung der vom Hersteller empfohlenen Einwirkzeit (Abbildung 2). Der Bauchraum wurde in Form einer medianen Laparotomie eröffnet (Abbildung 3), anschließend die Muskulatur entlang der *Linea alba* quergespreizt (Abbildung 3) und das Zäkum vorsichtig aus dem Bauchraum luxiert (Abbildung 4). Ca. 15 mm oberhalb der Mündung des Ileums wurde das *Colon ascendens antimesenterial* mit nicht resorbierbaren Fäden der Stärke USP

6/0 durchstoßen (Abbildung 5). Nachfolgend erfolgte die Punktion des Zäkums ca. 10 mm distal der Ileozäkalklappe mit einer Venenverweilkanüle (Abbildung 6). Die Kanüle wurde vorsichtig vorgeschoben und die innere Stahlkanüle zurückgezogen (Abbildung 7), sodass sich nur noch der Plastikanteil der Venenverweilkanüle im Lumen befand. Mit dem freien Ende des Fixierungsfadens wurde der Plastikkatheter durchstoßen, durch einen chirurgischen Knoten fixiert und anschließend ca. 1 mm oberhalb der Serosa abgeschnitten. Um die intraluminale Position des Stents zu überprüfen, wurde vom Zäkum ausgehend Darminhalt ins *Colon ascendens* und den Stent gedrückt, bis ein kleiner Tropfen Faeces am Stentausgang erschien (Abbildung 8). Nachdem der Darm wieder in die Bauchhöhle zurückverlagert wurde, erfolgte der Wundverschluss der Muskulatur, als auch der Haut mit Fäden der gleichen Stärke durch Einzelknopfnäht. Alle Tiere erhielten nach Abklingen der Narkose einmalig Buprenorphin (Temgesic® 0,05-0,1 mg/kg KG subkutan) entsprechend der Empfehlungen der „Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e.V.“ für die Schmerzbehandlung beim Versuchstier. Nach 18 Stunden erfolgten die Explantation der Aorta und die Kontraktilitätsmessungen.



Abb. 2: Desinfektion der Bauchdecke

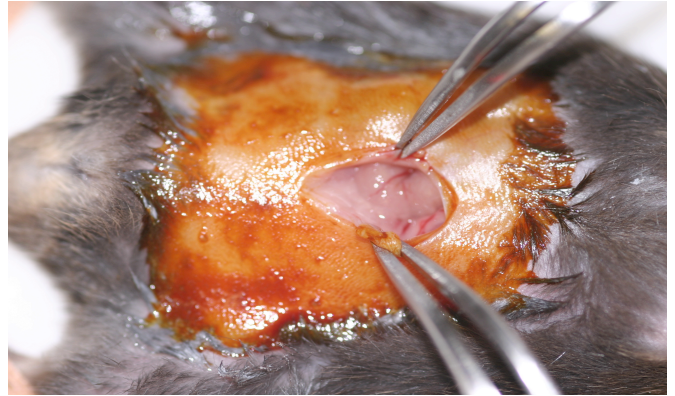


Abb. 3: Eröffnete Bauchdecke

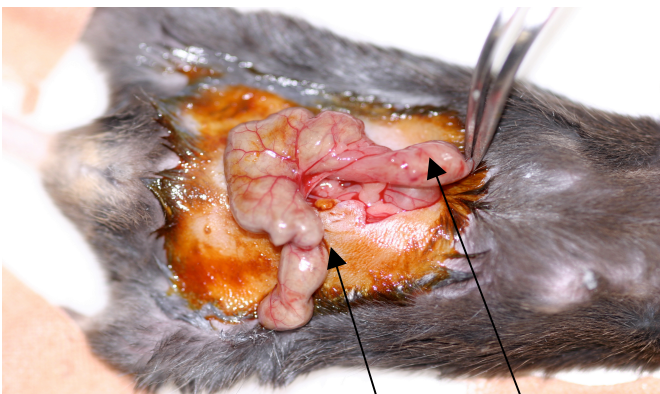


Abb. 4: Darstellung von Zäkum und *Colon ascendens*

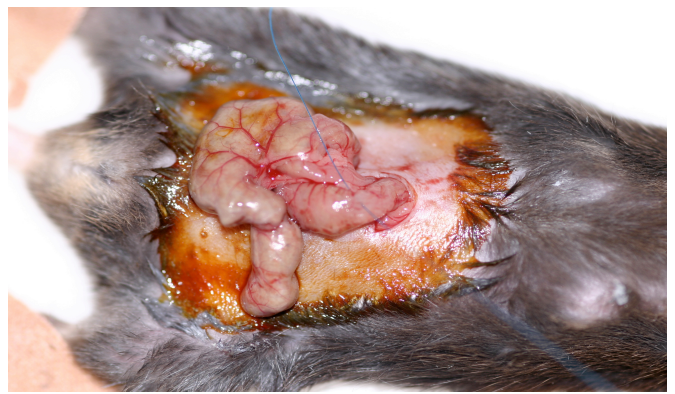


Abb. 5: Durchstich mit Faden der Stärke USP 6/0

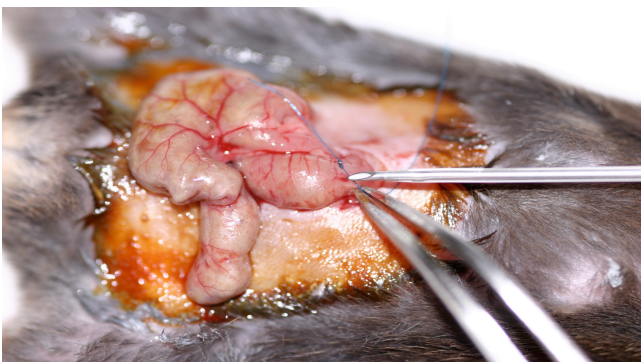


Abb. 6: Punktion des *Colon ascendens*

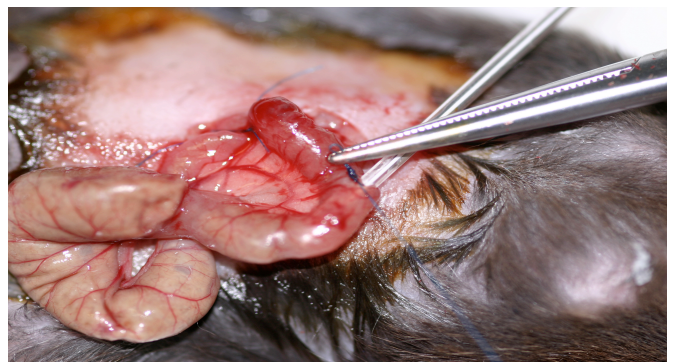


Abb. 7: Vorgeschobender Katheter

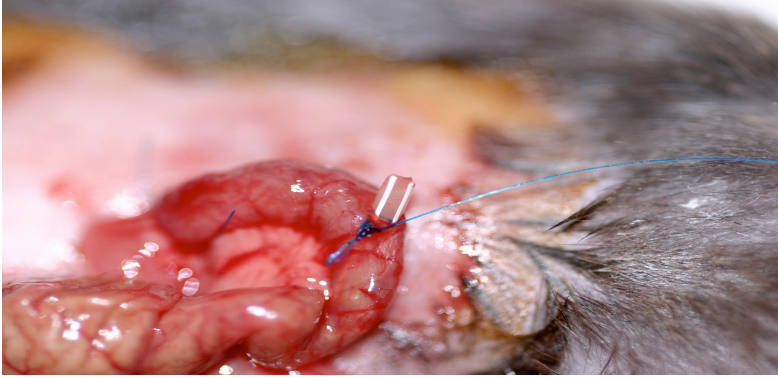


Abb. 8: Stent mit Faeces gefüllt

2.2.2 ODN H154-Injektion

Die Injektion des ODNs H154 erfolgte 24 Stunden vor CASP Operation in einem Restrainer, nachdem der Schwanz der Maus etwa 10 Minuten unter einer Wärmelampe lag. Anschließend wurden 5 nmol des ODN H154 in 200 μ L NaCl in eine Schwanzvene injiziert. Nach Angabe des Herstellers waren die Oligonukleotide frei von Endotoxinen.

2.2.3 Klinische Verlaufskontrolle und Explantation der Aorta

18 Stunden nach dem Eingriff wurde der klinische Zustand der Tiere erfasst. Dazu gehörten äußere Krankheitsanzeichen wie körperliche Aktivität, Fellbeschaffenheit, Zittern und sonstige klinische Zeichen einer Infektion wie z. B. Diarrhoe.

Im Anschluss daran wurden die Versuchstiere unter Narkose durch Dekapitation getötet. Die sonst übliche Methode der zervikalen Dislokation ist aufgrund einer daraus resultierenden Überstreckung der Aorta zu vermeiden. Im Folgenden wurde die Bauch- und Brusthöhle durch eine zweiseitige Laparotomie eröffnet und die Aorta aus dem periadventitiellen Fettgewebe distal des Aortenbogens bis zum Zwerchfell unter Einsatz einer Stereolupe präpariert. Hierbei sollte eine Dehnung möglichst unterlassen werden, um strukturelle Schäden zu verhindern. Nach Präparation wurde die Aorta durch proximale und distale Schnittinzision aus dem Gewebbett entfernt. Aus dem distalen Teil wurden für die spätere Kontraktilitätsmessung 2 mm breite Ringe geschnitten. Gleichzeitig wurde zu diesem Zeitpunkt die Funktionalität des zuvor implantierten Stents überprüft. Es wurde auf den Füllungszustand des Stents, sowie auf ausgetretenen Darminhalt in der Bauchhöhle geachtet. Zudem wurde nach lokalen Infektionszeichen wie Darmrötung und ödematösen Veränderungen der Darmwand gesucht.

2.3 Messung der arteriellen Kontraktilität

Die Messung der arteriellen Kontraktilität erfolgte nach der Methode von Mulvany und Halpern (Mulvany und Halpern, 1977) mithilfe eines Mulvany Multi Myographs.

Der Mulvany Multi Myograph Modell 610 M besteht aus einem Gehäuse mit einer Heizquelle und 4 beheizbaren Edelstahlkammern mit einem jeweils zugehörigen Kraftmesser. Jede Kammer besitzt 2 Trägerbacken, zwischen denen die Gefäßringe fixiert werden. Die obere Trägerbacke ist mit dem Kraftmesser fest verbunden, während die untere Backe Kontakt zu einer Mikrometerschraube hat und sich durch Drehen dieser der Abstand zwischen beiden Backen verkleinern oder vergrößern lässt. Über diesen Mechanismus lassen sich in der Kammer befestigte Gefäßringe in festen Intervallen auf eine Grundspannung vorspannen. Außerdem besitzt jede Kammer die Möglichkeit zum Eingeben von Lösungen und Befestigen eines Temperaturfühlers, sowie zur Belüftung und Absaugung des Kammerinhalts.

Zur Auswertung wurde der Myograph an ein Powerlab[®] (4/26, AD Instruments Ltd, UK) als Hardware und an die LabChart[®] 5 Software angeschlossen.

Die aus dem distalen Anteil der Aorta geschnittenen 2 mm breite Ringe wurden in die mit Krebs-Ringer-Bikarbonat Lösung (Konzentrationen in Tabelle 3) gefüllten Kammern des Mulvany Multi Myographen (Abbildung 9) eingespannt. Die Versuchslösung wurde in einem Wasserbad kontinuierlich auf einer Temperatur von 37 °C gehalten und zur Erhaltung eines konstanten pH-Wertes von 7,4 mit Carbogen begast.

Zum Einspannen wurden zwei etwa 4 cm lange Drähte mit einem Durchmesser von 20 µm durch das Lumen der explantierten Aortenringe geführt. Das Präparat und die Drähte wurden in die gefüllten Kammern überführt und zwischen den Trägerbacken fixiert. Der obere Draht wurde um die links und rechts in der jeweiligen Kammer befindlichen Schrauben gewickelt und befestigt, sodass der Aortenring von dem gespannten Draht in der Mitte der Kammer fixiert wurde (Abbildung 10).



Abb. 9: Mulvany Multi Myograph (Dmt, 2015)

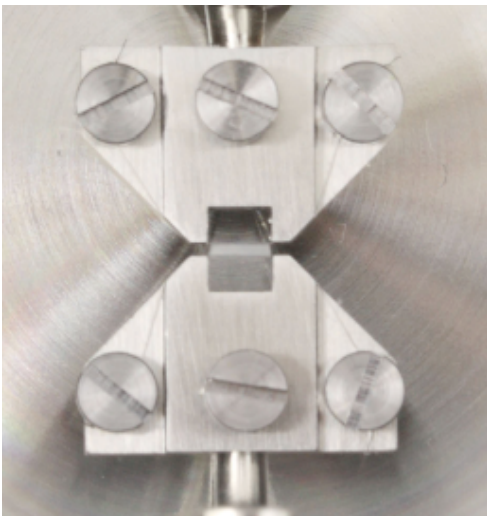


Abb. 10: Myographenkammer mit eingespanntem Aortenring (Dmt, 2015)

Anschließend wurde das untere Drahtstück durch das Lumen gefädelt und in gleicher Weise an den unteren Schrauben befestigt. Nun wurden die Träger durch Drehen an den Mikrometerschrauben solange auseinander gezogen, bis das Gefäß spannungsfrei auf den Drähten lag. Diese Trägerstellung, in der keine Kraft auf die Präparate wirkte, diente als Ausgangsstellung und die Kraftanzeige wurde im Gerät manuell auf Null gestellt. Die eingespannten Ringe inkubierten nach Waschen der Kammern mit 5 mL KRB für 30 Minuten bei 37 °C und einem pH von 7,4.

Nach dieser Ruhephase wurden die Ringe innerhalb von ca. 30 Minuten schrittweise, jeweils um 5 Einheiten auf der Mikrometerschraube pro Schritt, auf 20 mN vorgespannt. Erreichte

die Spannung die 20 mN Marke, wurde die Spannung der Ringe auf 10 mN reduziert und anschließend für 30 Minuten bei dieser Spannung belassen.

Jeder einzelne Versuch erfordert einen Beweis für die Vitalität und Funktionalität der Aorten. Zu dieser Kontrolle wurden Rezeptor-unabhängige Stimulatoren verwendet und Agonisten, die die Rezeptor-vermittelte Kontraktion überprüfen. Der Gefäßstatus wurde deshalb durch Stimulation mit 5 mL Kalium-Chlorid in einer Konzentration von 125 mM (Tabelle 4), und Stimulation mit 5 mL Phenylephrin in einer Konzentration von 10^{-7} mM, überprüft. Kaliumchlorid führt an der glatten Muskelzelle zu einer Kontraktion durch Depolarisation und anschließender Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{++} -Kanälen. Phenylephrin ist ein Agonist der α_1 -Rezeptoren und löst hier eine Signalkaskade aus, welche zur Öffnung intrazellulärer Kalziumspeicher führt.

Nachdem die Spannung von 10 mN von den Ringen über 30 Minuten gehalten wurde, erfolgte die Stimulation in folgender Reihenfolge:

1. 5 mL Kaliumchlorid (125 mM)
2. Nach der Kaliumchlorid induzierten Kontraktion wurden die Kammern zum Auswaschen der Stimulationslösung mit KRB solange gespült, bis die Ausgangsspannung von 10 mN wieder hergestellt war
3. 5 mL Phenylephrin (10^{-7} mM)
4. Nach der Phenylephrin induzierten Kontraktion wurden die Kammern zum Auswaschen der Stimulationslösung erneut mit KRB solange gespült, bis die Ausgangsspannung von 10 mN wieder hergestellt war
5. 5 Minuten Pause
6. Schritte 1-4 wurden wiederholt

Sowohl bei der Stimulation mit Kaliumchlorid, als auch mit Phenylephrin wurde abgewartet, bis die Kurve ihr Gleichgewicht erreicht hatte, also alle Rezeptoren besetzt waren und es zu keiner weiteren kontraktile Antwort kam.

Falls es zu keinen Kontraktionen unter Kaliumchlorid oder Phenylephrin kam, erfolgte das Auswechseln der entsprechenden Gefäßabschnitte. Es wurden nur Gefäßabschnitte verwendet, bei denen diese Bedingungen erfüllt waren. Bei den Versuchen zeigten 100 % der Präparate kontraktile Antworten. Jeder Versuch wurde an jeweils 2 Aortenringen eines Tieres durchgeführt, somit mit 2 unterschiedlichen Präparaten.

Anschließend wurde die Konzentrations-Wirkungskurve für Phenylephrin Konzentrationen zwischen 10^{-10} und 10^{-5} mM in halblogarithmisch aufsteigenden Konzentrationen aufgezeichnet. Nach jeweils 3 Minuten wurde so viel Phenylephrin zugegeben, dass die nächsthöhere Konzentration ohne vorheriges Auswaschen erreicht wurde (Schema in Tabelle 5).

Krebs-Ringer-Bikarbonat (KRB) Lösung und Kaliumchlorid (KCl) Stimulationslösung wurden vor Beginn der Messungen hergestellt und während des Versuchs im Wasserbad bei 37 °C und pH 7,4 vorgehalten. Die Phenylephrin Stimulationslösung wurde auf Eis inkubiert. Alle Konzentrationslösungen von Phenylephrin wurden mit Ascorbinsäure (1 mg/mL) angesetzt, um eine Oxidation zu verhindern.

Tab. 3: Ansatz der Krebs-Ringer-Lösung (1 Liter)

Stoff	Endkonzentration in mmol/L
Glucose	5,5
NaCl	118,5
KCl	4,7
MgSO ₄	1,2
KH ₂ PO ₄	1,2
NaHCO ₃	25,0
CaCl ₂	54,0

Tab. 4: Ansatz der 125 mM KCl-Lösung (1 Liter)

Stoff	Endkonzentration in mmol/L
Glucose	5,0
KCl	125,0
KH ₂ SO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	25,0
CaCl ₂	54,0

Tab. 5: Phenylephrin Konzentrationen

Minute	Konzentration
0	10^{-10}
3	$10^{-9,5}$
6	10^{-9}
9	$10^{-8,5}$
12	10^{-8}
15	$10^{-7,5}$
18	10^{-7}
21	$10^{-6,5}$
24	10^{-6}
27	$10^{-5,5}$
30	10^{-5}

2.4 Organentnahme für die molekularbiologische Untersuchung

Vor der Organentnahme, 18 Stunden nach CASP-Eingriff, für die anschließenden molekularbiologischen Untersuchungen wurde die Maus, im Gegensatz zur Prozedur vor der Kontraktilitätsmessung, durch zervikale Dislokation getötet. Die Bauchhöhle wurde durch zweiseitige Laparotomie bis zur Brusthöhle eröffnet. Herz und Lunge wurden entnommen. Anschließend wurde die Aorta distal des Aortenbogens bis zur Bifurkation mit dem Mikroskop unter 8-facher Vergrößerung aus dem periadventitiellen Fettgewebe präpariert. In einer Petrischale mit Phosphate Buffer Solution (PBS) wurden die Organe gewaschen. Das Blut wurde durch leichtes Ausstreichen mit der Pinzette aus der Aorta entfernt, die Organe einzeln auf Eppendorf Gefäße verteilt. Nachdem die Organe in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren wurden, wurden sie bei -80 °C gelagert.

2.5 RNA-Isolation

Die Isolation wurde mit dem RNeasy mini Kit, Cat. No. 74106 (250 rxn) der Firma Qiagen durchgeführt.

Der Homogenisator (Ultra Turrax[®], Poly Tron PT 2100 Dispergier, Kinematica AG, Schweiz) wurde vor der Zerkleinerung des Gewebes einmal mit GIT (Guanidin Thiocyanat) und anschließend zweimal mit DEPC-Wasser (0,1 % Diethylpyrocarbonat in 1 Liter H₂O) gespült. Zu der gefrorenen Aorta wurden 600 µL RNeasy-Lysis-Puffer (RLT-Puffer) zusammen mit 6 µL Mercaptoethanol gegeben und nun mit dem Ultra Turrax homogenisiert. Jetzt wurden 590 µL RNase freies Wasser mit 10 µL Proteinkinase K gemischt und zum Homogenat hinzugegeben, geschüttelt und für 10 Minuten bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 10.000 g wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit 450 µL Ethanol 100 % gemischt.

700 µL dieses Gemisches wurden auf die rosa Säule gegeben und anschließend 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert, das Lysat verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt. Nun wurden 350 µL RW1 Puffer auf die Säule gegeben, 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert und das Lysat erneut verworfen.

Pro Probe wurden 10 µL DNase1 und 70 µL RDD Puffer gemischt und direkt auf die Säule pipettiert, ohne diese zu beschädigen, bei Raumtemperatur (20-30 °C) für 15 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden erneut 350 µL RW1 Puffer auf die Säule gegeben, 15 Minuten bei 8.000 g zentrifugiert, das Lysat verworfen.

Nun wurde die Säule zweimal mit 500 µL PRE Puffer gewaschen, im ersten Schritt 15 Sekunden bei 8.000 g und im zweiten Schritt zwei Minuten bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert, das Lysat nach jedem Schritt verworfen. Die RNeasy Säule wurde auf ein neues 1,5 mL Eppendorf Gefäß gesetzt und mit 40 µL RNase freiem Wasser aus dem Kit eluiert. Anschließend folgte eine drei-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, einminütige Zentrifugation bei 8.000 g und die photometrische RNA Konzentrationsbestimmung an einem Nano Drop.

Die Proben wurden entweder bei -80 °C eingefroren oder es wurde die cDNA Synthese angeschlossen.

2.6 cDNA Synthese

Für die Synthese der copy-DNA wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt verwendet. Zunächst wurde der 2xRT-Master Mix vorbereitet (Tabelle 6).

Tab. 6: Pipettierschema für 2xRT Master Mix

Komponente	Volumen (µL) pro Reaktion
10x reverse Transkriptase Puffer	5,0
25x dNTPs	2,0
10x Random Primers	5,0
Multi Scribe reverse Transkriptase (50 U/µl)	2,5
Nuclease freies Wasser	10,5

Für die Reaktion wurden zu 25 µl der RNA Probe 25 µl 2x RT Master Mix in ein 0,2 ml PCR-Tube pipettiert, zum Mischen auf und ab pipettiert und anschließend in den Thermal Cycler (Biometra T Gradient, Göttingen, Germany) geladen.

Die Reaktion lief nach folgendem Schema ab (Tabelle 7).

Tab. 7: Programm Thermal Cycler

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 Minuten	120 Minuten	5 Sekunden	

2.7 Quantitative Real-time PCR

Für die Real-time PCR wurde der TaqMan (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) mit fluoreszenzmarkierten TaqMan Sonden verwandt (Tabelle 8). Zur Bestimmung der Genexpression fand eine Tripletbestimmung jeder einzelnen Probe statt.

Tab. 8: TaqMan Assay: zur Bestimmung der Genexpression wurden Tripletbestimmungen durchgeführt

	Ziel-Gen	Assay-Nummer
PRR	TLR2	Mm01213945_g1
	TLR4	Mm00445273_m1
	TLR9	Mm00446193_m1
	CD14	Mm00438094_g1
Zytokine	TNF α	Mm00443258_m1
	IL-1 β	Mm99999061_g1
	IL-6	Mm01210732_g1
	IL10	Mm00439616_m1
	iNOS	Mm00440491_g1

Zu 2 μ l cDNA wurden je Probe 10 μ l TaqMan[®] Universal PCR Mix (Applied Biosystems), 7 μ l DNase/RNase freies Wasser und 1 μ l TaqMan[®] Gene Expression Assay pipettiert.

Die absolute Quantifizierung fand in einer „Two-step real-time“ PCR statt (siehe Tabelle 9).

Tab. 9: Temperatur-Zeit-Programm

Schritt	Einstellung
Aktivierung der Polymerase	10 min / 95 °C
Amplifikation (45 Zyklen)	15 sec / 95 °C 60 sec / 60 °C

Die anschließende Analyse wurde mit dem Programm SDS 2.2 durchgeführt. Zur Auswertung wurde der Algorithmus der relativen Quantifizierung benutzt. Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes „House-keeping Gen“ oder auf einen HKG-Index, der sich aus mehreren HKG zusammensetzt bezogen. Die effizienzkorrigierte, relative Quantifizierung mittels real-time RT-PCR stellt bis dato die genaueste Form der mRNA Quantifizierung dar (Pfaffl et al., 2004).

Zur Abschätzung der cDNA-Menge wurden die erhaltenen cT-Werte einerseits auf das „House-keeping“-Gen GAPDH und andererseits die jeweilige Differenz zur C57BL/6 Kontrollgruppe gebildet ($\Delta\Delta C_t$ -Methode).

2.8 Geräte

Tierhaltung

Käfige Makrolon Typ II	Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld
Standarddiätfutter Maus	Altromin GmbH und Co. KG, Lage-Lippe
Tiereinstreu-Granulat	Altromin GmbH und Co.
Zuchttiere C57BL/6	Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Haus für experimentelle Therapie (HET), Bonn Eigene Zucht

In vivo/vitro-Eingriffe

Wärmebad	Rhema-Labortechnik, Hofheim,
Operationsbesteck	Allgaier Instrumente, Frittlingen, Fine Science Tools
Operationsmikroskop	OpMi 191294 Zeiss, Oberkochen
Mikroskop	Wild M7A, Heerbrugg, Schweiz
Power Lab Data Acquisition System	ADInstruments, Spechbach
Feinwaage	Fa. Ohaus, Pinebrook, NJ, USA
Mulvany Myograph Model 610 M	Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark

Software

Chart for Windows 5.5.5.	AD Instruments
Prism 4.03	GraphPad Software, San Diego, California, USA
SDS Software 2.2	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

2.9 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Standardmaterialien

Betaisodonna Lösung [®]	Mundipharma GmbH, Limburg
Isofluran: Forene [®]	Abott GmbH und Co. KG, Wiesbaden
Prolene [®] Fäden 6-0	Ethicon GmbH, Norderstedt
Vasofix-Braunüle [®] 18 G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Buprenorphin: Temgesic [®]	Essex Pharma GmbH, München
ODN-H154	Fa. TibMolbiol, Berlin
PBS	Eigene Herstellung
CaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt
Glukose	Merck KGaA
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA
KCl	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, USA
NaCl	Merck KGaA
NaHCO ₃	Merck KGaA
Phenylephrin (PE #P-6126)	Sigma-Aldrich Co
Ascorbinsäure	Merck KGaA

RNA-Isolation

DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich Co
Guanidin Thiocyanat (GIT #G6639)	Sigma-Aldrich Co
Ethanol	Merck KGaA
RNeasy mini Kitt, Cat. No. 74106	Qiagen

Quantitative Real-time-PCR

TaqMan [®] Sonden im TaqMan [®]	Applied Biosystems, CA, USA
TaqMan [®] Universal PCR MasterMix	Applied Biosystems
DNase/RNase freies Wasser	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
TaqMan [®] Gene Expression Assay	Applied Biosystems

2.10 Statistische Auswertung der Daten

Die Daten wurden mit dem Computerprogramm Prism 4.03 ausgewertet und graphisch dargestellt. Signifikanzen wurden durch Student's unpaired t-Test und einfaktorielle ANOVA ermittelt. Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ gelten als signifikant.

Die Daten wurden graphisch als Konzentrations-Wirkungs-Kurve bzw. Balkendiagramm als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Tierzahlen und Mortalitätsrate

Insgesamt gingen 168 Tiere in diese Studie ein, davon verstarben 12 Tiere bevor die Aorten präpariert werden konnten. Also wurden Aorten von 156 Tieren für die weiteren Versuche präpariert (Tabelle 10).

Die Letalität nach der Operation ließ sich möglicherweise sowohl auf die Sepsisinduktion selbst, als auch auf während der Operation entstandene Darmnekrosen zurückführen. Darüber hinaus könnte die intraoperative Analgesie mit Buprenorphin könnte in einigen Fällen zu einer Atemdepression geführt haben.

Tab. 10: Mortalitätsrate der Versuchstiere in der Studie: Von den insgesamt 168 Tieren starben 12, entsprechend 7 %.

	Anzahl	%
Gesamtzahl der Mäuse	168	100
Davon verstorben	12	7

18 Stunden nach dem Eingriff wurden klinisch auffällige Symptome einer Infektion bei den Tieren beobachtet. Dazu gehörten Lethargie und Diarrhoe, die 2 Stunden nach der Operation frühestens auftraten.

Am eindrucklichsten zeigten sich diese Beobachtungen in der TLR2-Gruppe, die auch gleichzeitig die höchste Mortalität von 30 % zeigte.

TLR9 und CD14-defiziente Tiere zeigten hingegen dezentere Krankheitssymptome.

Die scheinoperierte Gruppe zeigte keine klinisch auffälligen Symptome.

3.2 Kontraktilitätsmessungen

Mit dem Mulvanymyograph wurden 18 Stunden nach der Initialoperation Messungen der arteriellen Kontraktilität durchgeführt. Von jedem Tier wurden 2 Aortenringe entnommen, während eines Messvorgangs konnten Aortenringe von zwei Tieren untersucht werden.

Um den Effekt der Sepsisinduktion durch CASP darzustellen, wurde eine unbehandelte Wildtypgruppe (Kontrolle) einer CASP-operierten Wildtypgruppe und einer scheinoperierten Wildtypgruppe (SOP) gegenübergestellt.

Scheinoperierte Tiere, die nur einer Laparotomie unterzogen wurden, zeigten einen nicht signifikant erniedrigten Kontraktilitätsverlust von 17,86 % bei maximaler Phenylephrinstimulation (Abbildung 16). Dies könnte auf eine generelle postoperative Darmatonie zurückzuführen sein (Schiller, 1958).

Die CASP-operierte Gruppe hingegen zeigte einen signifikanten Verlust der Kontraktilität ab $10^{-7,5}$ M Phenylephrin mit einem Maximum bei 10^{-5} M Phenylephrin von 45,8 % (Abbildung 11, 16) mit signifikant geringerer Kurvensteigung (hill-slope/Steigungsfaktor, CASP: 0,857 vs. Kontrolle: 1,08) und erhöhter EC₅₀. In absoluten Werten war die maximale Kontraktionsantwort auf Phenylephrin von 23,35 mN auf 17,52 mN verringert (Abbildung 11, Tabelle 11).

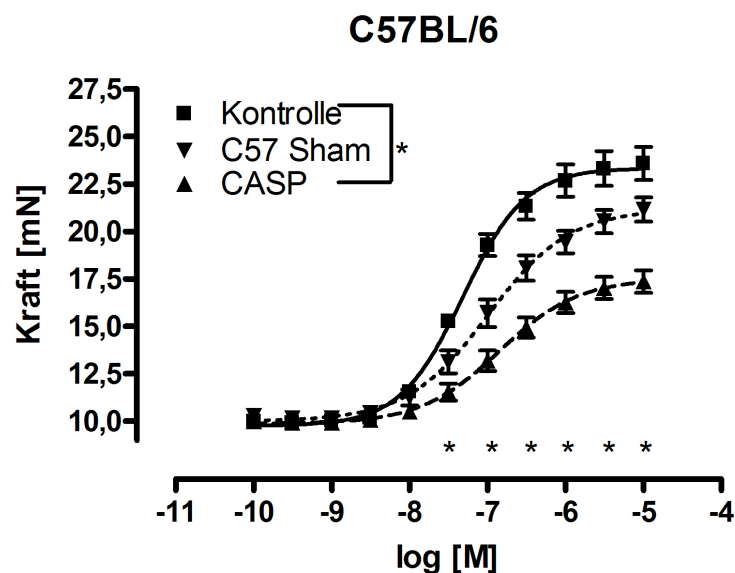


Abb. 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurve der von Phenylephrin ausgelösten Kraftentwicklung auf C57BL/6: CASP-operierte Tiere zeigten einen signifikanten Kontraktilitätsverlust gegenüber der Kontrollgruppe (* $p \leq 0,05$: Kontrolle: $n = 8$, SOP: $n = 7$, CASP: $n = 7$).

Interessanterweise entwickelten nicht operierte, TLR2^{-/-}-defiziente Mäuse eine geringere maximale Kontraktionskraft als die C57BL/6 Kontrollen (TLR2^{-/-} Kontrolle: 19,06 mN vs. C57BL/6 Kontrolle: 23,35 mN). Weiterhin reagierten TLR2^{-/-}-defiziente Mäuse entsprechend der klinischen Beobachtungen mit einem sehr starken signifikanten Verlust der Kontraktionskraft von 70,12 % auf die CASP, sowie signifikant geringerer Kurvensteigung (hill-slope CASP 0,8907 versus Kontrolle 1,147, Tabelle 11). Ab einer Phenylephrin-konzentration von 10^{-7,5} mN war die Kontraktionskraft verglichen mit ihrer Kontrollgruppe signifikant reduziert (Abbildung 12, 16, Tabelle 11). In absoluten Werten war die maximale Kontraktionsantwort auf Phenylephrin von 19,06 mN auf 12,77 mN durch die CASP vermindert.

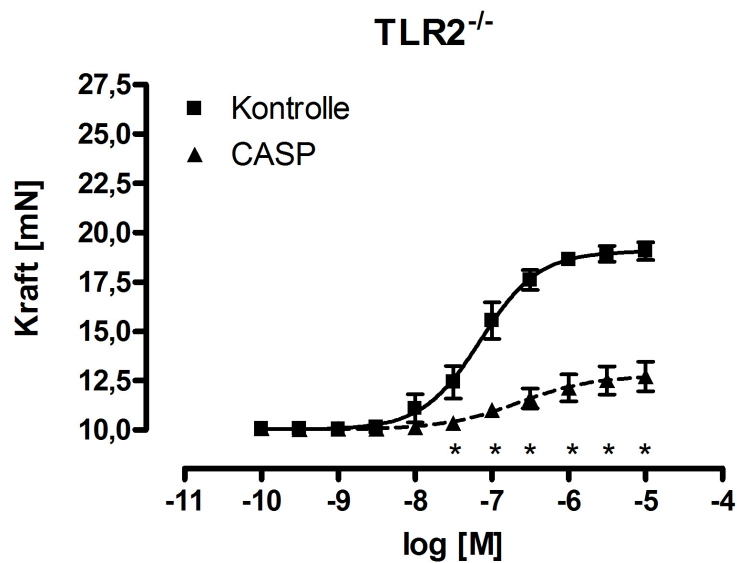


Abb. 12: Konzentrations-Wirkungs-Kurve der von Phenylephrin ausgelösten Kraftentwicklung auf TLR2^{-/-}: Bei den TLR2^{-/-}-defizienten Tieren nach CASP kam es zu einer signifikant niedrigeren Kraftentwicklung im Vergleich zur TLR2^{-/-}-Kontrollgruppe (*p < 0,05; Kontrolle: n = 4, CASP: n = 5).

Unbehandelte TLR 4^{-/-} defiziente Tiere entwickelten die gleiche Gefäßkontraktilität wie C57BL/6 Kontrollen (Tabelle 11). TLR4^{-/-}-defiziente Mäuse reagierten auf die CASP nur mit einer geringen (26,61 %) Verminderung der Gefäßkontraktilität (Abbildung 16). Die Kontraktionskraft war zwischen 10^{-7,5} und 10⁻⁵ mol Phenylephrin signifikant verringert. In absoluten Werten war die maximale Kontraktionsantwort auf Phenylephrin von 23,61 mN auf 20,63 mN durch die CASP vermindert (Abbildung 13).

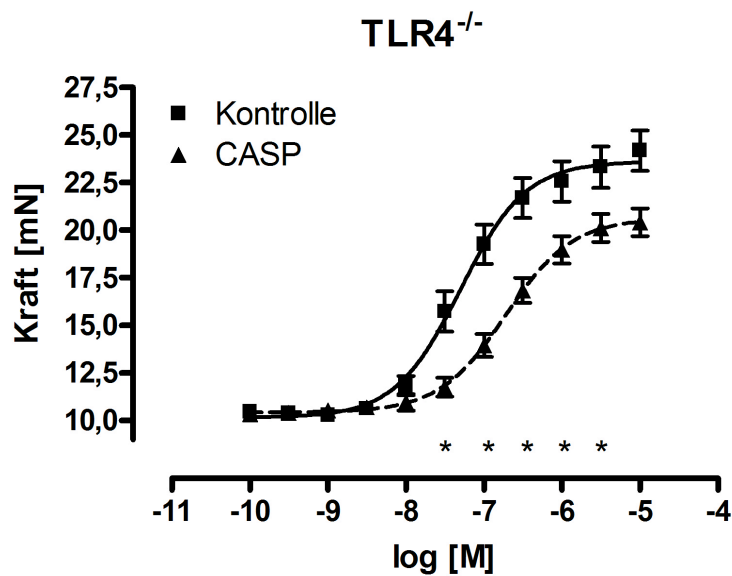


Abb. 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurve der von Phenylephrin ausgelösten Kraftentwicklung auf TLR4^{-/-}: TLR4^{-/-}-defiziente Tiere zeigten lediglich einen geringen Kontraktilitätsverlust (*p ≤ 0,05: Kontrolle: n = 5, CASP: n = 7).

Unbehandelte TLR9^{-/-} defiziente Tiere entwickelten die gleiche maximale Gefäßkontraktilität wie C57BL/6 Kontrollen (23,04 mN vs 23,35 mN). In TLR9^{-/-}-defizienten Mäusen bewirkte CASP einen kleinen, aber nicht signifikanten Kontraktilitätsverlust von 12,83 % bei 10⁻⁵ M Phenylephrin (Abbildung 14, 16, Tabelle 11).

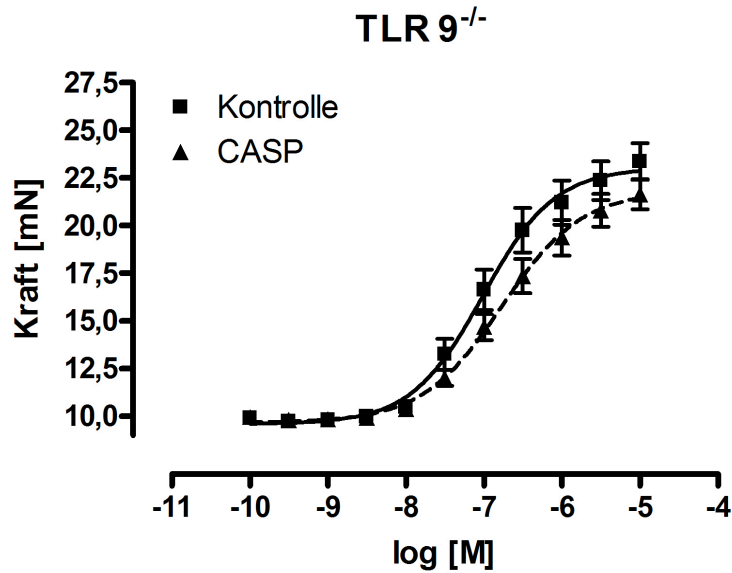


Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungs-Kurve der von Phenylephrin ausgelösten Kraftentwicklung auf TLR9^{-/-}: TLR9^{-/-} defiziente Mäuse nach CASP wiesen keine signifikant veränderte Gefäßkontraktilität im Vergleich zur Kontrolle auf (Kontrolle: n = 4, CASP: n = 5).

Die kontraktile Antwort der CD14^{-/-}-defizienten Tiere schien verändert zu sein, ausgehend von einer geringeren Kurvensteigung im Vergleich zu allen anderen Gruppen und einer geringeren EC50 (Tabelle 11 und Abbildung 15, sowie Abbildung 16). Jedoch reagierten die CD14^{-/-}-Rezeptor-defizienten Tiere mit einer nicht signifikanten Verringerung der Kontraktionskraft auf die CASP Operation. (-13,15 % bei 10⁻⁵ mol gegenüber der Genotyp Kontrollgruppe).

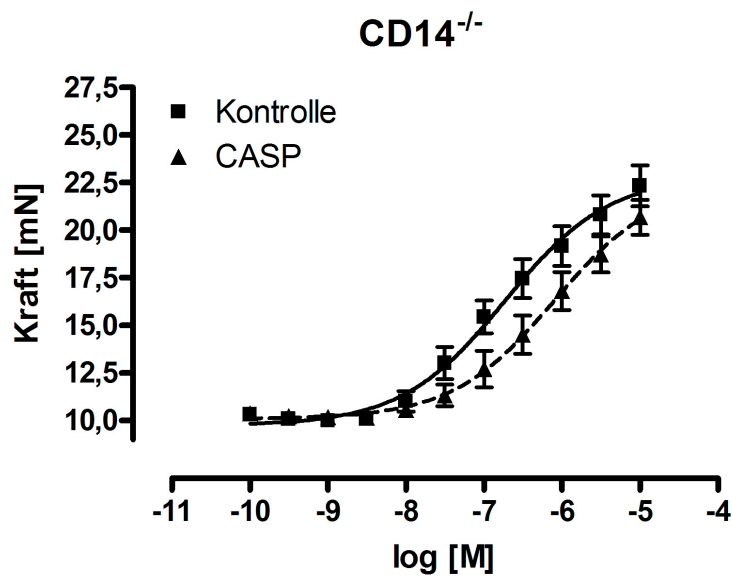


Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurve der von Phenylephrin ausgelösten Kraftentwicklung auf CD14^{-/-}: Generell erwies sich die Kontraktionsantwort der CD14^{-/-}-defizienten Tiere verändert, es zeigte sich eine nicht signifikant verringerte Kontraktilität nach CASP (Kontrolle: n = 4, CASP: n = 5).

Abbildung 16 stellt die Zusammenfassung des Kontraktionsverlustes nach CASP in Prozent dar.

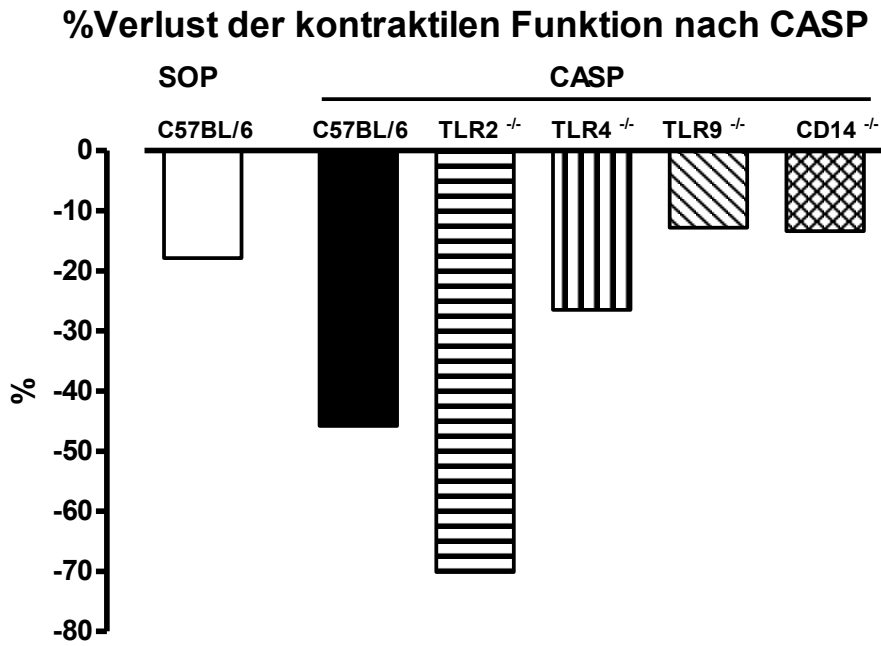


Abb: 16: Verlust der kontraktilen Funktion nach CASP. Zusammenfassung des Kontraktilitätsverlustes der einzelnen Gruppen nach CASP.

Tab. 11: Zusammenfassende Darstellung der Parameter der Konzentrations-Wirkungs-Kurven, 1: $p < 0,05$ versus CD14^{-/-} CASP; 2: $p < 0,05$ versus TLR2^{-/-} CASP; 3: $p < 0,05$ versus C57/BL CASP; $n \geq 5$ Tiere in jeder Gruppe; mean \pm SEM.

	<i>C57BL/6</i>			<i>TLR2^{-/-}</i>		<i>TLR4^{-/-}</i>		<i>CD14^{-/-}</i>		<i>C57BL/6</i>		<i>TLR9^{-/-}</i>	
	Kontrolle	CASP	SOP	Kontrolle	CASP	Kontrolle	CASP	Kontrolle	CASP	Kontrolle + H154	CASP + H154	Kontrolle	CASP
Bottom [mN]	9,761	9,863	10,01	10,03	10,03	10,14	10,42	9,731	10,07	9,959	10,15	9,591	9,668
Top [mN]	23,35 ^{2,3}	17,52 ²	21,19 ^{2,3}	19,06 ^{2,3}	12,77	23,61 ^{2,3}	20,63 ^{2,3}	22,86 ^{2,3}	22,52 ^{2,3}	20,9 ^{2,3}	23,01 ^{2,3}	23,04 ^{2,3}	21,82 ^{2,3}
LogEC₅₀	-7,316 ¹	-6,848 ¹	-6,989 ¹	-7,149 ¹	-6,645 ¹	-7,301 ¹	-6,72 ¹	-6,727 ¹	-6,096	-6,865 ¹	-7,092 ¹	-7,013 ¹	-6,773 ¹
Hillslope	1,08	0,857	0,832	1,147	0,8907	1,039	1,014	0,6543	0,6632	0,9063	0,7975	0,9421	0,847
EC₅₀ [M]	4,83E-08	1,42E-07	1,02E-07	7,10E-08	2,26E-07	5,00E-08	1,90E-07	1,87E-07	8,01E-07	1,36E-07	8,08E-08	9,70E-08	1,69E-07

3.3 Molekularbiologie

3.3.1 Zytokine

Um den Einfluss der CASP-Operation zu untersuchen und die oben gezeigten Gefäßreaktionen auf den polymikrobiellen Stimulus besser zu verstehen, wurde die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6, sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 18 Stunden nach CASP mittels quantitativer Real-time PCR in Aorten der jeweiligen Genotypen bestimmt.

Die Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-6 in CASP-operierten C57BL/6 Tieren wurde im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe signifikant gesteigert. Während die Expression von TNF- α um das 14-fache zunahm, stieg die IL-6-Expression bei CASP-operierten Tieren, verglichen mit der scheinoperierten Gruppe um das 85-fache an (TNF- α : SOP: $1,01 \pm$ vs. CASP: $14,87 \pm 4,37$; IL-6: SOP: $1,94 \pm$ vs. CASP: $165,1 \pm 33,3$).

TLR2^{-/-}-defiziente CASP-operierte Tiere zeigten eine signifikant höhere Expression der Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 als die C57BL/6 CASP-Gruppe. IL-1 β stieg um das 8-fache, IL-6 sogar um das 92-fache an (IL-1 β : C57BL/6 CASP: $7,38 \pm 0,82$ vs. TLR2^{-/-} CASP: $61,4 \pm 14,94$; IL-6: C57BL/6 CASP: $165,1 \pm 33,3$ vs. TLR2^{-/-} CASP: 15206 ± 4766).

Im Gegensatz zu den C57BL/6 und den TLR2^{-/-}-defizienten Mäusen bewirkte die CASP in TLR4^{-/-}, 9^{-/-} und CD14^{-/-}-defizienten Tieren keinen signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Abbildung 17 A, B, C).

Die Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wurde sowohl in der C57BL/6 CASP behandelten Gruppe, als auch in den TLR2^{-/-} und CD14^{-/-}-defizienten Tieren hochreguliert, jedoch nicht signifikant (Abbildung 17 D).

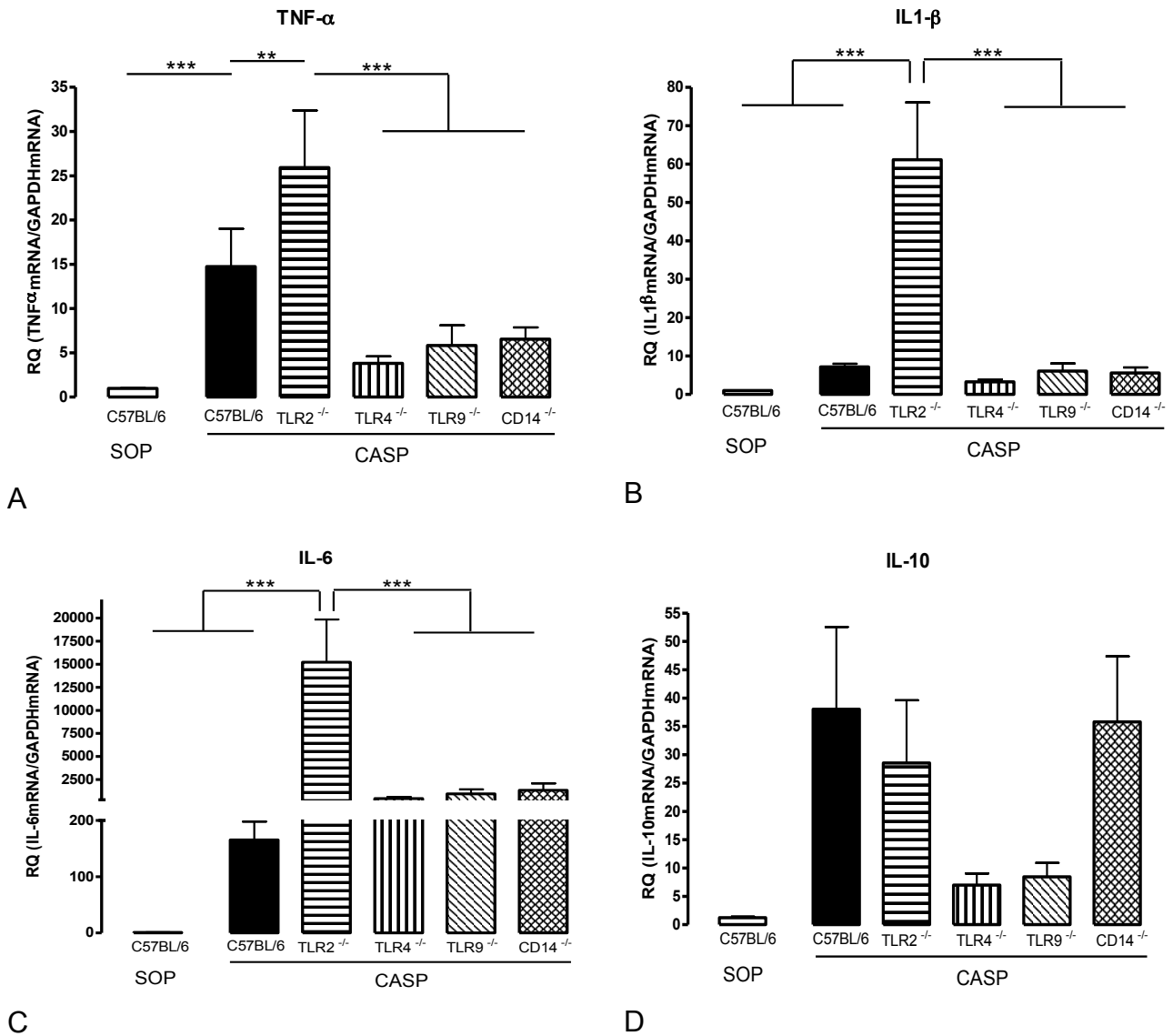


Abb. 17: mRNA-Expression der Zytokine TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-10 (D): Dargestellt ist die signifikante Steigerung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 nach CASP im Vergleich zur Scheingruppe. Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 wurde nicht signifikant hochreguliert in der C57BL/6 CASP Gruppe, sowie in TLR2^{-/-} und CD14^{-/-}-defizienten Tieren. (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; SOP: $n \geq 8$, CASP: C57BL/6: $n \geq 9$, TLR2: $n \geq 5$, TLR4: $n \geq 5$, TLR9: $n \geq 9$, CD14: $n \geq 7$).

3.3.2 iNOS

Die induzierbare NO-Synthase spielt eine wichtige Rolle im septischen Geschehen und ist am vaskulären Mechanismus der Gefäßrelaxation beteiligt. Aus diesem Grund wurde die mRNA-Expression der iNOS nach CASP mittels quantitativer Real-time PCR untersucht.

Nur in der TLR2^{-/-}-defizienten Gruppe bewirkte die CASP eine signifikante Zunahme der iNOS-Expression im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe (Abbildung 18). In allen anderen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Expression, dadurch war nach CASP die iNOS Expression in TLR2^{-/-}-defizienten Gefäßwänden gegenüber allen anderen Gruppen signifikant erhöht.

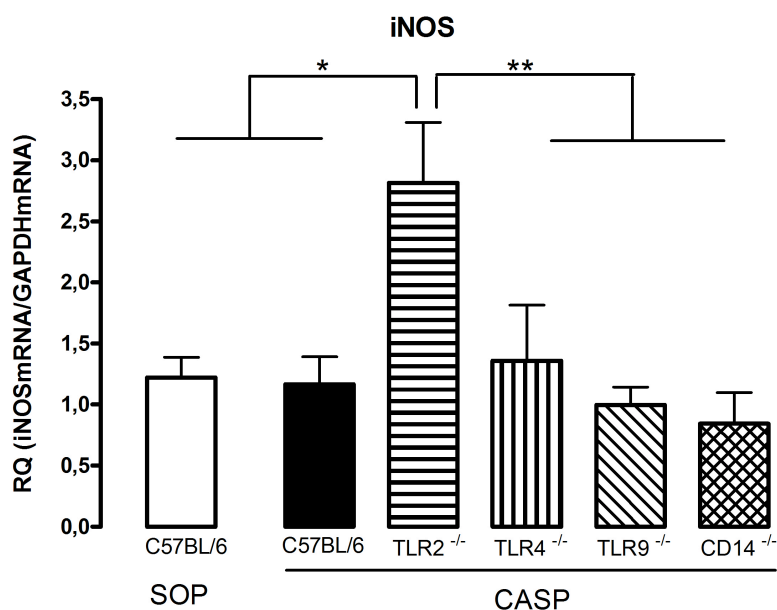


Abb. 18: mRNA-Expression der iNOS: Lediglich die TLR2^{-/-}-defiziente Gruppe zeigte eine signifikante Zunahme der iNOS-Expression nach CASP, bei allen anderen Gruppen konnte keine signifikante Veränderung im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe festgestellt werden (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, SOP: $n = 10$, CASP: C57BL/6: $n = 16$, TLR2: $n = 4$, TLR4: $n = 8$, TLR9: $n = 11$, CD14: $n = 10$).

3.3.3 PRRs

Mit Hilfe der quantitativen Real-time PCR wurde die mRNA-Expression der Toll-like Rezeptoren 2, 4 und 9, sowie des Oberflächenrezeptors CD14 analysiert.

Diese Rezeptoren binden Liganden, die für die Entstehung und Aufrechterhaltung der überschießenden Immunantwort unter anderem im septischen Schock, wichtig sind. So zeigten TLR2^{-/-} defiziente Tiere eine signifikant höhere Expression der TLRs 4 und 9, sowie CD14 im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 19). Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression der TLRs 2, 4 und 9, sowie CD14 in den anderen Tierstämmen, verglichen mit der Wildtyp-Gruppe, beobachtet (Abbildung 19).

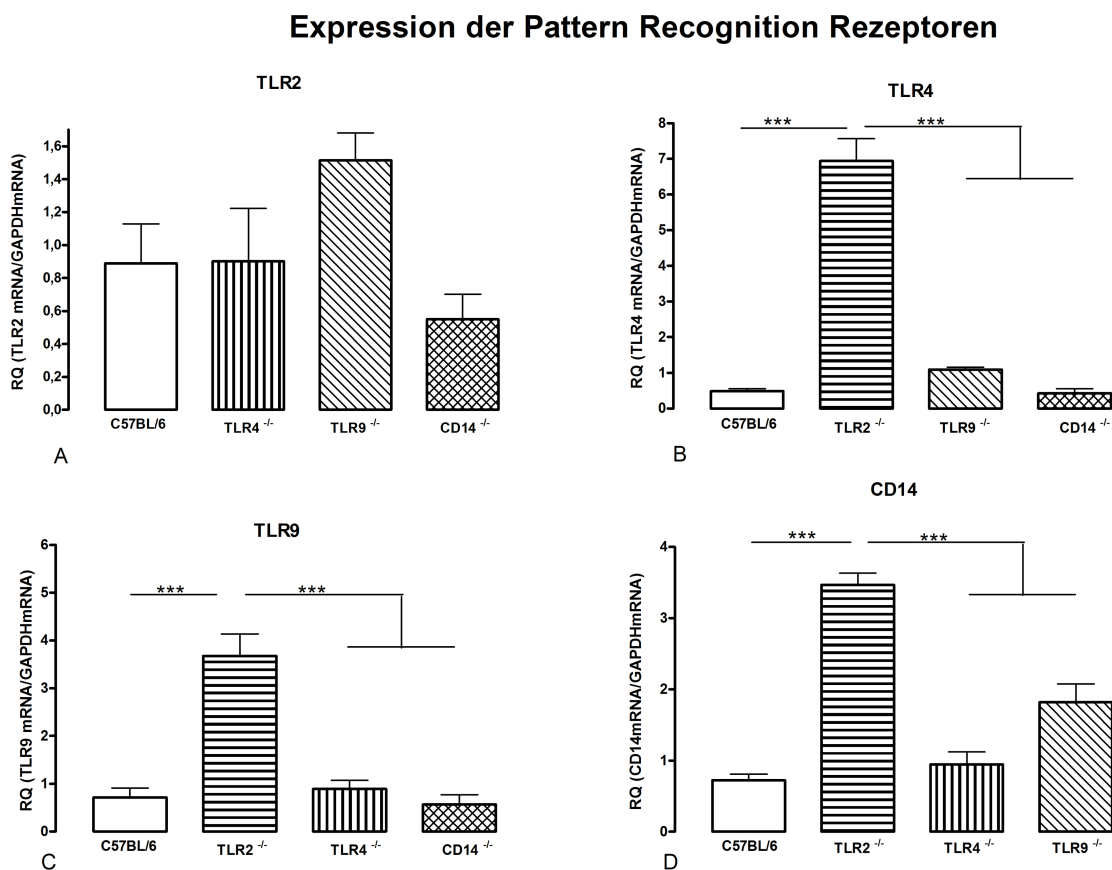


Abb. 19: Messenger RNA Expression der TLRs TLR2 (A), TLR4 (B), TLR9 (C), CD14 (D): TLR2^{-/-}-Mäuse exprimierten signifikant mehr TLR4 und 9, sowie CD14 im Vergleich zur Wildtypgruppe (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, TLR2 (A); TLR4 (B); TLR9 (C); CD14 (D); $n \geq 5$).

3.4 TLR9 Antagonist H154-ODN

Abschließend wurden Messungen der Kontraktilität und Zytokinexpression, mittels Real-time PCR durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine pharmakologische TLR9-Hemmung vergleichbare Wirkungen erzielen kann wie eine TLR9 Defizienz.

3.4.1 Kontraktilitätsmessungen

Die Behandlung mit H154 führte zu einer verbesserten kontraktilen Antwort (+ 20 %) auf Phenylephrin, verglichen mit der zugehörigen Kontrollgruppe, trotz CASP-Operation (Abb.). Allerdings wurde nicht das Signifikanzniveau erreicht.

In der H154-behandelten CASP-Gruppe wird eine maximale Kontraktionskraft von 22,8 mN, im Vergleich zu 20,6 mN in der Kontrollgruppe, erreicht, die Kurvensteigung zeigte sich ebenso nicht signifikant verändert (Tabelle 11).

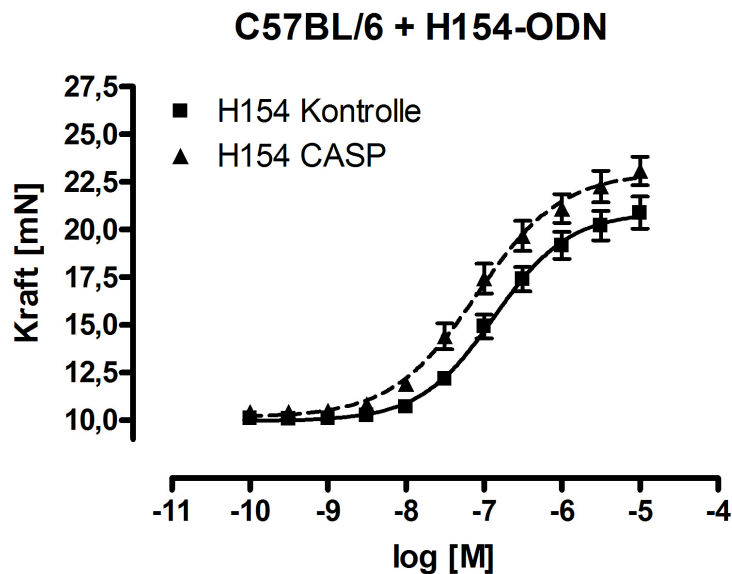


Abb. 20: Konzentrations-Wirkungs-Kurve der von Phenylephrin ausgelösten Kraftentwicklung auf C57BL/6 Tiere nach Behandlung mit H154-ODN: Nach Behandlung mit H154 verbesserte sich die Kontraktilitätsantwort auf Phenylephrin, jedoch nicht signifikant (Kontrolle: n = 5, CASP: n = 5).

3.4.2 iNOS

Es zeigte sich kein signifikanter Effekt in der Expression von iNOS, weder in der unbehandelten, noch in der mit ODN H154-behandelten CASP-Gruppe (Abbildung 21).

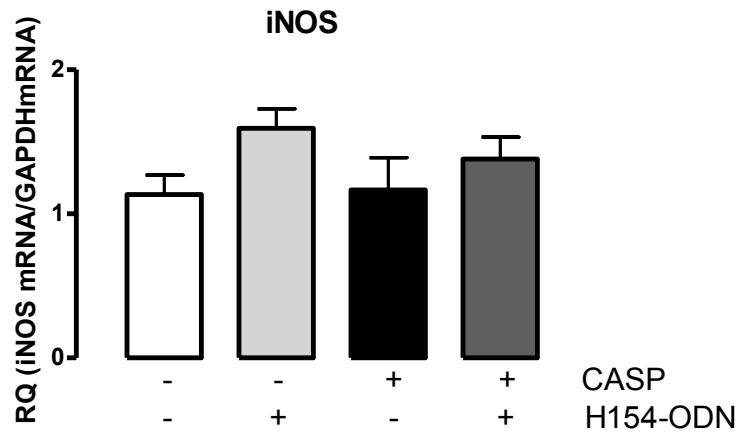


Abb. 21: mRNA-Expression der iNOS: Die iNOS-Expression erreichte in keiner Gruppe ein signifikantes Niveau (Kontrolle, Kontrolle + H154, CASP, CASP+H154: $n \geq 5$).

3.4.3 Zytokine

Die Basalexpression der proinflammatorischen Zytokine wurde durch H154-ODN nicht verändert.

CASP-operierte Tiere, denen 24 Stunden vor dem Eingriff ODN H154 gegeben worden war, zeigten eine signifikant erniedrigte Expression aller proinflammatorischen Zytokine im Vergleich zu CASP operierten Tieren mit Vorbehandlung mit ODN H154 (Abb.).

TNF- α zeigte in der H154-behandelten CASP-Gruppe eine 4-fach geringere Expression als in der CASP-operierten unbehandelten Gruppe (CASP: $14,72 \pm 4,45$ vs. CASP + H154: $3,28 \pm 0,55$), die IL-6-Expression war sogar um das 12-fache niedriger in der H154-behandelten Gruppe (CASP: $166,1 \pm 32,23$ vs. CASP+H154: $12,78 \pm 4,44$).

Die IL-10 Expression erreichte nicht das Signifikanzniveau.

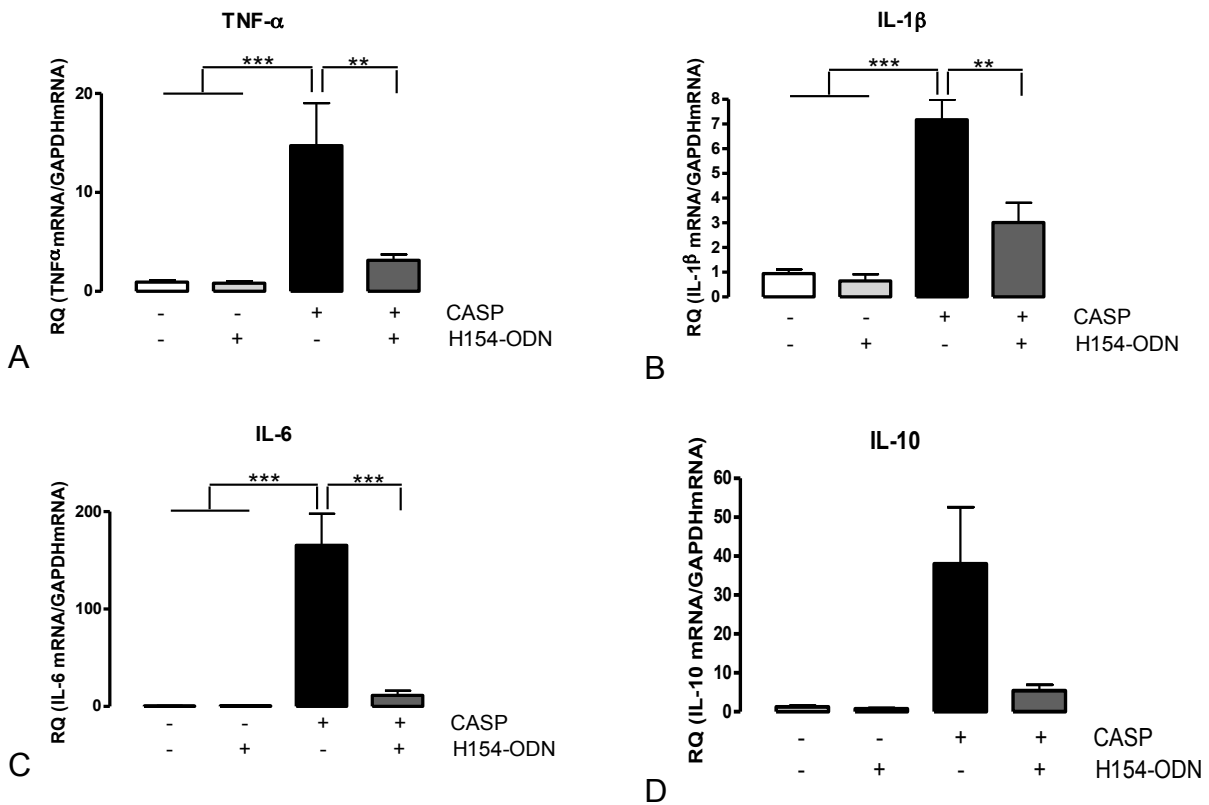


Abb. 22: mRNA Expression der Zytokine TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-10 (D) im Hinblick auf Behandlung mit ODN H154: CASP behandelte Tiere, welchen 24 Stunden vor dem Eingriff H154 injiziert wurde, zeigten eine signifikant geringere Expression aller proinflammatorischen Zytokine. Die IL-10 Expression zeigte sich nicht signifikant verändert. (Kontrolle, Kontrolle + H154, CASP, CASP + H154: $n \geq 5$, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$).**

4. Diskussion

Die Arbeit untersuchte die Bedeutung verschiedener Toll-like Rezeptoren in der polymikrobiellen Sepsis, deren Auswirkung auf die vaskuläre Kontraktilität und die Möglichkeit einer pharmakologischen Hemmung des TLR9-gesteuerten Signalweges.

Es wurde gezeigt, dass der PRR TLR9 und der PRR CD14 maßgeblich an der Entstehung der vaskulären Dysfunktion in der Sepsis beteiligt sind.

4.1 Mausmodell und Sepsis

Bei der Auswahl eines geeigneten Tiermodells spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Ethische und ökonomische Gesichtspunkte, sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind an dieser Stelle zu nennen. Darüber hinaus ist die Übertragbarkeit der Daten aus dem Tiermodell auf den Menschen wichtig.

Die Maus stellt zur Zeit das einzige Tier dar, an dem Gene gezielt ausgeschaltet werden können. Dieses Verfahren hat zentrale Bedeutung erlangt, da durch eine Defizienz in einem Gen das entsprechende Protein nicht mehr exprimiert werden kann. Fehlt das entsprechende Protein im intakten Organismus, so kann man versuchen, anhand des sich entwickelten Phänotyps Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins zu ziehen. In der vorliegenden Studie wurde mit CD14, TLR2, 4 und 9 defizienten Tieren gearbeitet. Das Modell CASP, das für diese Studie zur Sepsisinduktion gewählt wurde, bewirkt eine Freisetzung vitaler Bakterien in die Bauchhöhle und induziert eine polymikrobielle Sepsis. Ausgehend von dem ins *Colon ascendens* implantierten Stent, lösen die kontinuierlich aus dem Darm freigesetzten grampositiven und gramnegativen Bakterien zunächst eine lokale Peritonitis aus, die im weiteren Verlauf in eine fulminante, systemische Sepsis übergeht. Hierbei kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg Kolonie bildender Einheiten (colony forming units, CFU). Dies wurde in einer parallel durchgeführten Studie durch Lohner et al., 2013 gezeigt. Im Anschluss werden Entzündungsmediatoren und PAMPs in das Gefäßsystem ausgeschüttet. Auf Gefäßebene kommt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion der Gefäßwand, die im Weiteren zur systemischen vaskulären Dysfunktion führt. Erkennbar wird diese Entzündungsreaktion unter anderem an einer TNF- α -Hochregulation. Im Modell wird also eine intestinale Leckage wiedergespiegelt, wie sie auch klinisch am

Menschen bedeutsam ist, z. B. im Rahmen eines abdominellen Fokus bei Durchwanderungsperitonitis (Bartels und Siewert, 1991).

Des Weiteren bietet die CASP durch Variation der eingesetzten Stentgröße die Möglichkeit, die maximale Mortalität von 100 % innerhalb der ersten 48 Stunden zu beeinflussen (Maier et al., 2004). Mit Hilfe der CASP kann also eine unbeherrschbare, fulminante Infektion ausgelöst werden, welche unbehandelt zum Tode führt. Nach Sepsisinduktion kommt es zunächst zu einer hämodynamischen Verschlechterung der Tiere, nachweisbar durch den Abfall des Schlagvolumens, des Herzzeitvolumens und des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (Lohner et al., 2013). In der Literatur wird ebenso von akutem Lungen- und Nierenversagen, sowie Knochenmarksdepression berichtet (Barthlen et al., 1999; Maier et al., 2000; Neumann et al., 1999). Somit bildet die CASP ein flexibles, operatives Sepsismodell (Maier et al., 2004; Wichtermann et al., 1980).

Andere Modelle zur Sepsisinduktion stellen zum einen monovirulente Injektionsverfahren dar und zum anderen die CLP, cecal ligation and puncture. Bei den monovirulenten Verfahren werden vitale Bakterien oder deren PAMPs wie LTA oder LPS intravenös oder intraperitoneal injiziert. Diese Methoden stellen technisch einfach durchzuführende, gut steuerbare Modelle zur Sepsisinduktion dar, jedoch haben sie auch einige Nachteile. So gibt es wesentliche pathophysiologische Unterschiede zwischen dem gramnegativen Schock beim Menschen und dem Endotoxin-vermittelten Schock bei Tieren (Waisbren, 1964). Zudem konnten in der Vergangenheit keine einheitlichen Ergebnisse durch diese monovirulenten Methoden hervorgerufen werden (Dehring et al., 1983) und darauffolgende klinische Studien verliefen enttäuschend (Fisher et al., 1996; Mohler et al., 1993). Hinzu kommt, dass die, durch einen abdominellen Fokus beim Menschen ausgelöste Sepsis nicht nur durch einzelne Zellwandbestandteile oder Bakterien hervorgerufen wird, sondern dass es sich im klinischen Alltag häufig um polymikrobielle Mischinfektionen handelt (Nichols, 1977). Die CLP hingegen wurde speziell entwickelt, um der Realität auch aus chirurgischer Sicht näher zu kommen. Durch eine Ligatur unterhalb der Ileozökalklappe wird ein septischer Fokus geschaffen und das Zäkum wird im Anschluss punktiert, um einen kontinuierlichen Fluss von Bakterien in die Bauchhöhle zu gewährleisten (Wichtermann et al., 1980). Maier et al., (2004) postulierten, dass durch CLP eher eine intraabdominelle Abszessbildung nachgeahmt wird und sich eben nicht das Vollbild einer Sepsis entwickelt. Dies konnte anhand geringerer Mortalität und geringerer Bakterienzahlen im Peritoneum nachgewiesen werden.

Aus genannten Gründen scheint daher die CASP ein realistisches Verfahren zur polymikrobiellen Sepsisinduktion am Tier zu sein und induziert eine Organdysfunktion, die der in septischen Patienten stark ähnelt (Bartels et al., 1991; Traeger et al., 2010). Und daher scheint auch die Übertragung, der aus dem Mausmodell gewonnenen Daten, auf den Menschen, gerechtfertigt zu sein. Dennoch gibt es einige Punkte, die gegen eine Übertragbarkeit sprechen. So werden Versuchstiere in pathogen-freien Räumen gehalten und speziell gezüchtet. Sie besitzen alle ungefähr das gleiche Gewicht und Alter und sind gesund, leiden also nicht unter Komorbiditäten, wie z. B. Diabetes mellitus, arterieller Hypertension oder anderen Erkrankungen. Hinzu kommt, dass die meisten Patienten, die an einer Sepsis erkranken, bereits über 50 Jahre alt sind. Die für die Sepsismodelle eingesetzten Mäuse sind aber meist etwa 3 Monate alt (Rittirsch et al., 2007).

Zuletzt gibt es einige Unterschiede auf molekularer Ebene zwischen Mensch und Tier. So wird z. B. durch das C-reaktive Protein (CRP), welches einen Entzündungsmarker im menschlichen Körper darstellt, das Komplementsystem aktiviert. Im murinen Organismus wird allerdings nicht derselbe Signalweg eingeschlagen (De Beer et al., 1982; Pepys et al., 2006). Des Weiteren scheint es Unterschiede zwischen menschlichen und in Tieren vorkommenden Toll-like Rezeptoren zu geben, weshalb ein Transfer vom Tier auf den Menschen nicht in jedem Fall vorgenommen werden kann (Beutler et al., 2002). Nichtsdestotrotz bleibt das Tiermodell ein wichtiges und unentbehrliches Werkzeug, um Mechanismen auf molekularer und genetischer Ebene besser zu verstehen (Rittirsch et al., 2007).

4.2 Einfluss der CASP auf die arterielle Kontraktilität

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es nach Sepsisinduktion durch CASP zu einem signifikanten Verlust der aortalen Kontraktilitätsantwort kommt. Wie in Abbildung 16 gezeigt, kommt es 18 Stunden nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis zu einem Kontraktilitätsverlust von 45 % verglichen mit der scheinoperierten Gruppe. In der Gruppe der TLR2-defizienten Tiere kam es sogar zu einer darüberhinaus gehenden Kontraktilitätsabnahme unter CASP, also einer zusätzlichen Verschlechterung der Gefäßantwort. Im Gegensatz dazu verringerte CASP in TLR4-defizienten Tieren die Kontraktilität nur um 27 %. CD14 und TLR9-defiziente Mäuse reagierten mit einem nicht signifikanten

Kontraktilitätsverlust, was bedeutet, dass diese Gruppen gegen die Sepsisinduktion durch CASP geschützt sind.

Eine tragende Rolle, bezüglich der Gefäßdilataion während des septischen Geschehens, scheint hierbei das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) zu spielen. Es ist davon auszugehen, dass eine NO-Freisetzung maßgeblich an der TPR-Abnahme und der konsekutiven Hypotonie in der Sepsis verantwortlich ist (Kilbourn und Griffith, 1992). Bereits lange ist bekannt, dass durch Entfernung des Endothels, welches NO bereitstellt, die vaskuläre Kontraktilität in der Sepsis deutlich verbessert werden konnte (McKenna et al., 1986). Wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, wird während der Sepsis v.a. über die induzierbare iNOS NO produziert (Parrat et al., 1997; Vallance et al., 1993; Wang et al., 2004). In unserer Studie war die iNOS-mRNA Expression bei den WT-Mäusen nach CASP nicht erhöht, sondern es zeigte sich nur in der TLR2-D-Gruppe eine Hochregulation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Grund für die fehlende iNOS-Aktivierung könnte in einem parallelen, iNOS-unabhängigen Signalweg liegen, da diese Gruppe nichtsdestotrotz eine signifikant verringerte Kontraktionskraft aufwies. Es wäre möglich, dass die Gefäßrelaxation in diesem Fall durch die Aktivierung von konstitutiv exprimierten NO-Synthetasen hervorgerufen wurde. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Adrenomedullin, welches einen potenten Vasodilatator darstellt, für die Gefäßrelaxation verantwortlich ist; die Expression von Adrenomedullin ist während Endotoxinämie nämlich nachweislich gesteigert (Ehrentraut et al., 2007). Ebenso denkbar ist, dass die Freisetzung der Aminosäure Kynurenin (Wang et al., 2009; Wang et al., 2010) und/oder durch die Cyclooxygenase 2 (COX2) gebildetes Thromboxan an der Vasodilatation in der Sepsis beteiligt sind (Grandel et al., 2000). Es existieren andere Arbeiten, die zu ähnlichen Ergebnissen kamen. So wiesen Araujo und Kollegen im CLP-Modell unveränderte iNOS-Spiegel nach (Araujo et al., 2011). Des Weiteren gibt es Hinweise dafür, dass eine spezifische iNOS-Hemmung in der polymikrobiellen Sepsis keinen therapeutischen Vorteil bietet (Vromen et al., 1996).

Im Folgenden soll genauer auf die jeweiligen Effekte der CASP auf die einzelnen PRRs während der polymikrobiellen Sepsis eingegangen werden.

4.3 Einfluss der CASP auf TLR2-defiziente Tiere

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in der TLR2-defizienten-Gruppe der größte Kontraktilitätsverlust von 70 % zu beobachten war. Dazu passt, wie oben bereits erwähnt, die beo-

bachtete Hochregulation der iNOS mRNA. TLR2^{-/-}-defiziente Mäuse entwickelten einen signifikant niedrigeren Gefäßtonus als die Wildtyp-Mäuse nach CASP (Abbildung 23).

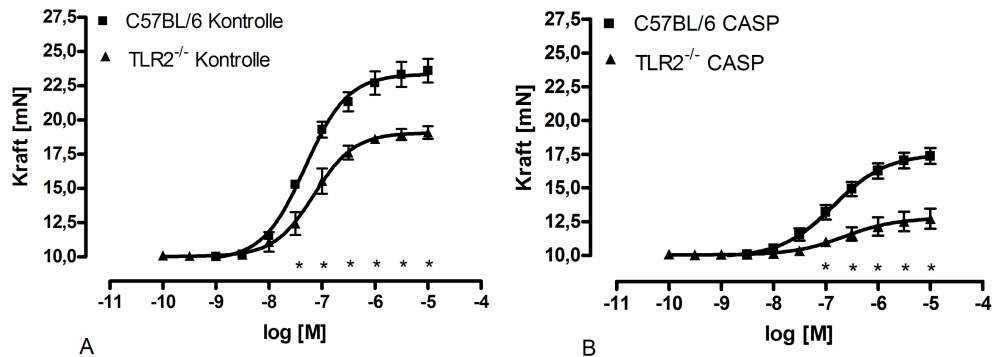


Abb. 23: Konzentrations-Wirkungs-Kurven C57BL/6 Kontrolle (A)/CASP (B) versus TLR2^{-/-} Kontrolle (A)/CASP (B): TLR2^{-/-}-defiziente Tiere entwickelten einen generell signifikant erniedrigten Gefäßtonus im Vergleich zu den Wildtyp Tieren, sowohl in der Kontrolle, als auch in der CASP Gruppe (n > 5).

Dies war von einer Hochregulation der TLR4, TLR9 und CD14 Expression begleitet. Ebenso wiesen TLR2-D Tiere den größten Anstieg der proinflammatorischen Zytokinexpression (TNF- α , IL-1 β , IL-6) auf. Ursache hierfür könnte die beschriebene hohe Expression der PRRs in der TLR2-D Tieren sein. Die bereits von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichte Arbeit zu diesem Thema zeigt weiterhin, dass der Gefäßtonus bei WT-Mäusen durch spezifische TLR2 Stimulation mit LTA nicht vermindert wird (Ehrentraut et al., 2012). Dies spricht dafür, dass der Kontraktilitätsverlust in TLR2-defizienten Tieren auf der Überexpression der anderen PRRs beruht. Zudem ist bekannt, dass TLR2-Agonisten die kardiale Funktionsstörung in der polymikrobiellen Sepsis mildern können (Feterowski et al., 2005; Ha et al., 2010).

Die hier gezeigte erhöhte Empfindlichkeit der TLR2-D Tiere wird durch zusätzliche Studien unterstrichen. Studien von Echchannoui et al. (2002) und Takeuchi et al. (2000b) zeigten, dass Tiere mit TLR2 Defizienz anfälliger für Infektionen sind, z. B. für Streptokokkus pneumoniae und Staphylokokkus aureus. Darüber hinaus weiß man, dass TLR2 Polymorphismus mit einem erhöhten Risiko für Lungen-Tuberkulose einhergeht (Kahn et al., 2014).

Im Gegensatz dazu existieren Studien, die besagen, dass TLR2-Defizienz während polymikrobieller Sepsis protektiv wirkt. Gong et al. (2014) zeigten, dass die mitochondriale Funktion in polymikrobieller Sepsis bei TLR2 defizienten Tieren im Vergleich zu WT scheinoperierten Tieren verbessert ist. Zou et al. (2010) fanden während polymikrobieller Sepsis eine verbesserte kardiale Funktion in TLR2 D Mäusen. Allerdings untersuchten sie nur die kardialen Parameter und führten keine Messungen am Gefäß selbst durch. Zudem entwickelten deren TLR2 defiziente Mäuse ebenso einen Abfall des MAP nach CLP, der am wahrscheinlichsten durch den Verlust der Gefäßkontraktilität erklärt werden kann (Zou et al., 2010).

4.4 Einfluss der CASP auf TLR4-defiziente Tiere

Wie bereits erwähnt, stellt TLR4 den Rezeptor zur Erkennung von LPS dar, welches sich auf der Oberfläche von gramnegativen Bakterien findet.

In unseren Untersuchungen induzierte die CASP in der TLR4-D Gruppe einen Kontraktilitätsverlust von 27 % im Gegensatz zu 50 % in der WT-Gruppe. Bei TLR4 defizienten Mäusen kam es nach CASP zur gesteigerten Expression von mRNA der PRRs TLR2 und CD14. Hierfür scheinen vor allem andere Bakterienbestandteile aus dem nicht gramnegativen Bereich verantwortlich zu sein, denn TLR2 ist im grampositiven Bereich von Bedeutung. CD14 Hochregulierung kann als kompensatorischer Mechanismus für die fehlenden TLR4 Rezeptoren gesehen werden. Hier zeigt sich, dass TLR4-defiziente Tiere nur teilweise gegen die Effekte der polymikrobiellen Sepsis geschützt sind.

Der TLR4 Rezeptor als Wegweiser in der gramnegativen Sepsis wurde in der Vergangenheit bereits vielfach untersucht. Roger et al. (2008) fanden heraus, dass Anti-TLR4-Antikörper den intrazellulären Signalweg blockieren können, was sich durch eine reduzierte Zytokinproduktion nachweisen ließ. Außerdem waren diese Tiere während einer durch Endotoxine und *E. coli* ausgelösten Sepsis vor einem tödlichen Toxinschock geschützt (Roger et al., 2008). Ähnliche Ergebnisse fanden Ehrentraut et al. (2007) in der durch LPS-Injektion ausgelösten gramnegativen Sepsis. Unter dieser Stimulation konnte durch Gabe von Eritoran, eines kompetitiven TLR4-Inhibitors, eine Gefäßrelaxation verhindert werden (Ehrentraut et al., 2007). Bekannt ist außerdem, dass Eritoran einen positiven Effekt auf die kardiale Myozytenkontraktion während Endotoxinämie hat (Baumgarten et al., 2006).

Weiterhin fanden Williams et al. (2003) in der polymikrobiellen Sepsis Hinweise dafür, dass erhöhte TLR4 Proteinexpression in der frühen Phase mit erhöhter Mortalität korreliert.

Bei einer polymikrobiellen Sepsis führte die TLR4 Defizienz nur zu einem partiellen Schutz, da hier nicht nur gramnegative Bakterien an der Sepsisinduktion beteiligt sind. Zum Beispiel können Bakterienbestandteile auch an TLR9 binden und so Entzündungsreaktionen auslösen.

4.5 Einfluss der CASP auf TLR9-defiziente Tiere

Hemmi et al. haben gezeigt, dass der primäre Ligand des Toll-like Rezeptors 9 die bakterielle DNA ist (Hemmi et al., 2000). Während unserer Studie konnten wir beobachten, dass TLR9-D-Tiere keinen signifikanten arteriellen Kontraktitätsverlust nach CASP entwickelten. Außerdem konnten wir keinen signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 beobachten. Die PRR Expression war nicht nur das Fehlen von TLR9 beeinflusst. Eine schützende Wirkung in Abwesenheit des PRRs TLR9 wurde in der Vergangenheit bereits beschrieben (Knuefermann et al., 2008; Lohner et al., 2013; Plitas et al., 2008).

Da unser Hauptaugenmerk nun auf dem TLR9 lag, sollte der Signalweg pharmakologisch mit einem TLR9-Antagonisten blockiert werden, um seine Rolle in der polymikrobiellen Sepsis herauszustellen. Hierfür wurde den Tieren 24 Stunden vor dem CASP-Eingriff das immunsuppressive ODN H154 über die Schwanzvene injiziert. Es ist bekannt, dass unmethylierte CpG-Dinukleotide für die immunmodulatorischen Effekte verantwortlich sind und dass ihr synthetisches Äquivalent, sogenannte CpG-ODNs, potente Agonisten/Antagonisten darstellen (Krieg et al., 1995). Wir wissen, dass immunsupprimierende ODNs durch ihren hohen Anteil an Guanosin sogenannte G-Tetraden bilden, die die Interaktion zwischen TLR9 und CpG-DNA unterbinden können (Gursel et al., 2003; Shirota et al., 2005).

Die Ergebnisse zeigten, dass Tiere, die mit H154 ODN 24 Stunden vor dem CASP Eingriff präkonditioniert wurden, eine signifikant verminderte Expression aller proinflammatorischen Zytokine zeigten. Außerdem wurde der Effekt der CASP auf die kontraktile Antwort komplett aufgehoben. Diese Ergebnisse werden ergänzt durch Erkenntnisse der Arbeitsgruppe um Yasuda et al.: Sie fanden heraus, dass TLR9-Antagonismus sepsisinduziertes Nierenversagen verhindern kann (Yasuda et al., 2008). Zudem gibt es Hinweise dafür, dass

die Kardiodepression während polymikrobieller Sepsis durch CpG-ODN Behandlung verhindert werden kann (Boehm et al., 2013; Gao et al., 2013). Hier konnte dargestellt werden, dass nach Stimulation mit CpG-ODN *in vivo* alle, mit Hilfe eines Druck-Volumen-Katheters, gemessenen hämodynamischen Parameter wie Schlagvolumen, linksventrikulärer systolischer Druck, Herzminutenvolumen eine signifikante Verbesserung im Vergleich zu den Kontrollgruppen zeigten.

4.6 Einfluss der CASP auf CD14-defiziente Tiere

CD14 ist der Co-Rezeptor von TLR4 und agiert als löslicher LPS Rezeptor (Cowan et al., 2000). CD14-defiziente Tiere waren, ebenso wie die TLR9-D Gruppe, für die Effekte der CASP nicht empfänglich, sie zeigten keinen signifikanten Verlust der Gefäßkontraktilität. Nach CASP Operation war die mRNA von PRR CD14 in allen TLR-D-Gruppen hochreguliert. Diese Erkenntnisse sprechen für einen protektiven Effekt dieses Rezeptors. Zurückliegende Studien belegen, dass CD14-Defizienz zu einer LPS-Unempfindlichkeit führt (Haziot et al., 1996; Knuefermann et al., 2002). Zudem wissen wir, dass CD14 nicht nur als Co-Rezeptor für TLR4 fungiert, sondern auch für TLR7 und TLR9 (Baumann et al., 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass CD14 und TLR9 eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der vaskulären Dysfunktion während polymikrobieller Sepsis spielen und dass eine effektive pharmakologische Antagonisierung mit verbesserter Gefäßkontraktilität und reduzierten Zytokinspiegeln mit Hilfe des immunsupprimierenden CpG-ODNs H154 möglich ist. Somit könnte die TLR9-Inhibition einen Bestandteil zukünftiger pharmakologischer Therapien darstellen und könnte dazu beitragen, die hohe Mortalitätsrate der polymikrobiellen Sepsis zu reduzieren.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle verschiedener PRRs auf die Entwicklung einer vaskulären Dysfunktion während einer polymikrobiellen Sepsis untersucht. Mithilfe der CASP-Operation wurde diese Sepsissituation nachgeahmt und 18 Stunden nach Induktion nahmen wir Messungen der kontraktilen Antwort an Aortenringen der behandelten Tiere vor. Untersucht wurden Wildtypiere (C57BL/6), sowie TLR2/4/9^{-/-} und CD14-defiziente Mäuse, wobei zusätzlich die vaskuläre mRNA-Expression von TNF- α , IL- β , IL-10, der iNOS und PRRs verglichen wurde. Zuletzt gelang der TLR9 Antagonismus durch *in vivo* Injektion von H154-Thioat.

Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Kontraktilitätsverlust der Wildtypiere nach CASP. In der TLR2^{-/-} Gruppe entstand eine gesteigerte Dysfunktion, TLR4-defiziente Tiere entwickelten eine abgeschwächte Kontraktilität, während sich in der TLR9^{-/-} und CD14 defizienten Gruppe keinerlei Kontraktilitätsverlust zeigte. Dementsprechend war die Expression von TNF- α nach CASP nur in den Wildtyp- und TLR2^{-/-} Gruppen erhöht, eine signifikante iNOS-Erhöhung fand sich nur in der TLR2^{-/-}-Gruppe. Ebenso allein in der TLR2^{-/-}-Gruppe ließen sich erhöhte Level von TLR4/9 und CD14 nachweisen. Nach Applikation des H154-Thioats wurde sowohl die vaskuläre Dysfunktion, als auch die Zytokinexpression bei Wildtypieren praktisch aufgehoben.

Die Ergebnisse zeigen, dass die von uns beobachtete Dysfunktion des Gefäßsystems hauptsächlich auf der Wirkung bzw. dem Zusammenspiel von CD14 und TLR9, als Ko-Faktoren, beruht. Somit kann der Funktionsverlust durch TLR9-Antagonismus effektiv aufgehoben werden. Ebenso scheinen TLR2-defiziente Tiere empfindlicher auf septische Reize zu reagieren, vermutlich bedingt durch eine Hochregulierung der PRRs.

6. Literaturverzeichnis

Akira S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009; 85: 143-156

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

Araújo AV, Ferezin CZ, Rodrigues GJ, Lunardi CN, Vercesi JA, Grando MD, Bonaventura D, Bendhack LM. Prostacyclin, not only nitric oxide, is a mediator of the vasorelaxation induced by acetylcholine in aortas from rats submitted to cecal ligation and perforation (CLP). *Vascul Pharmacol* 2011; 54: 44-51

Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) - a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* 1998; 12: 2821-2830

Astiz ME, Rackow EC. Septic shock. *Lancet* 1998; 351: 1501-1505

Bartels H, Siewert JR. Die Rolle der Antibiotikatherapie bei postoperativen infektiösen Komplikationen. *Klin Wochenschr* 1991; 69: 53-56

Barthlen W, Zantl N, Pfeffer K, Heidecke CD, Holzmann B, Stadler J. Impact of experimental peritonitis on bone marrow cell function. *Surgery* 1999; 126: 41-47

Baumann CL, Aspalter IM, Sharif O, Pichlmair A, Blüml S, Grebien F, Bruckner M, Pasierbek P, Aumayr K, Planyavsky M, Bennett KL, Colinge J, Knapp S, Superti-Furga G. CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9. *J Exp Med* 2010; 207: 2689-2701

Baumgarten G, Knuefermann P, Nozaki N, Sivasubramanian N, Mann DL, Vallejo JG. In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. *J Infect Dis* 2001; 183: 1617-1624

Baumgarten G, Knuefermann P, Schuhmacher G, Vervolgyi V, von Rappard J, Dreiner U, Fink K, Djoufack C, Hoeft A, Grohe C, Knowlton AA, Meyer R. Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock* 2006; 25: 43-49

- Beutler B, Rehli M. Evolution of the TIR, tolls and TLRs: functional inferences from computational biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270: 1-21
- Boehm O, Markowski P, van der Giet M, Gielen V, Kokalova A, Brill C, Hoeft A, Baumgarten G, Meyer R, Knuefermann P. In vivo TLR9 inhibition attenuates CpG-induced myocardial dysfunction. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 217297
- Bone RC, Sprung CL, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med* 1992; 20: 724-726
- Brenner G, Muskulatur. In: Klinke R, Pape HC, Silbernagl, S, Hrsg. *Physiologie*. Stuttgart-New York: Thieme, 2005: 122-130
- Brunkhorst FM. Epidemiologie, Ökonomie und Praxis - Ergebnisse der deutschen Prävalenzstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet). *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2006; 41: 43-44
- Cai G, Kastelein RA, Hunter CA. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN- γ when combined with IL-18. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2658-2665
- Chen Y, Lenert P, Weeratna R, McCluskie M, Wu T, Davis HL, Krieg AM. Identification of methylated CpG motifs as inhibitors of the immune stimulatory CpG motifs. *Gene Ther* 2001; 8: 1024-1032
- Clauss M, Sunderkotter C, Sveinbjornsson B, Hippenstiel S, Willuweit A, Marino M, Haas E, Seljelid R, Scheurich P, Suttorp N, Grell M, Risau W. A permissive role for tumor necrosis factor in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability. *Blood* 2001; 97: 1321-1329
- Cowan DB, Poutias DN, Del Nido PJ, McGowan FX Jr. CD14-independent activation of cardiomyocyte signal transduction by bacterial endotoxin. *Am J Physiol* 2000; 279: H 619-629
- De Beer FC, Baltz ML, Munn EA, Feinstein A, Taylor J, Bruton C, Clamp JR, Pepys MB. Isolation and characterization of C-reactive protein and serum amyloid P component in the rat. *Immunology* 1982; 45: 55-70

- Dehring DJ, Crocker SH, Wismar BL, Steinberg SM, Lowery BD, Cloutier CT. Comparison of live bacteria infusions in a porcine model of acute respiratory failure. *Surg Res* 1983; 34: 151-158
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000; 103: 351-361
- Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-508
- Dinarello CA. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res* 2004; 10: 201-222
- Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 1355-1359
- Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 1993; 151: 1224-1234
- Ding L, Shevach EM. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol* 1992; 148: 3133-3139
- DMT, 2015: Multi wire myograph system. <http://www.dmt.dk>; 30.06.2015
- Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* 2002; 186: 798-806
- Ehrentraut S, Frede S, Stapel H, Mengden T, Grohe C, Fandrey J, Meyer R, Baumgarten G. Antagonism of lipopolysaccharide-induced blood pressure attenuation and vascular contractility. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2170-2176
- Ehrentraut SF, Dörr A, Ehrentraut H, Lohner R, Lee SH, Hoeft A, Baumgarten G, Knuefermann P, Boehm O, Meyer R. Vascular dysfunction following polymicrobial sepsis: role of pattern recognition receptors. *PLoS One* 2012; 7: 44531
- Endres S, Eigler A. Hemmung der NO-Synthase im septischen Schock. *Internist* 1997; 38: 466-469

Evans T, Carpenter A, Kinderman H, Cohen J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. *Circ Shock* 1993; 41: 77-81

Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, Polentarutti N, Muzio M, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide activates NF- κ B through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 11058-11063

Feterowski C, Novotny A, Kaiser-Moore S, Mühlradt PF, Rossmann-Bloeck T, Rump M, Holzmann B, Weighardt H. Attenuated pathogenesis of polymicrobial peritonitis in mice after TLR2 agonist pre-treatment involves ST2 up-regulation. *Int Immunol*. 2005; 17: 1035-1046

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991a; 147: 3815-3822

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991b; 146: 3444-3451

Fisher CJ Jr, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, Benjamin E. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334: 1697-1702

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

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

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kuhn R, Muller W, Trinchieri G, Sher A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with

Toxoplasma gondii succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α . J Immunol 1996; 157: 798-805

Gong Y, Zou L, Feng Y, Li D, Cai J, Chen D, Chao W. Importance of Toll-like receptor 2 in mitochondrial dysfunction during polymicrobial sepsis. Anesthesiology 2014; 121: 1236-1247

Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. Am J Physiol 2001; 280: F193-F206

Graf J, Reinhold A, Brunkhorst FM, Ragaller M, Reinhart K, Loeffler M, Engel C. Variability of structures in German intensive care units - a representative, nationwide analysis. Wien. Klin Wochenschr 2010; 122: 572-578

Grandel U, Fink L, Blum A, Heep M, Buerke M, Kraemer HJ, Mayer K, Bohle RM, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U. Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor- α synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. Circulation 2000; 102: 2758-2764

Grunig G, Corry DB, Leach MW, Seymour BW, Kurup VP, Rennick DM. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. J Exp Med 1997; 185: 1089-1099

Gunneth CA, Chu Y, Heistad DD, Loihl A, Faraci FM. Vascular effects of LPS in mice deficient in expression of the gene for inducible nitric oxide synthase. Am J Physiol 1998; 275: H416-H421

Gursel I, Gursel M, Yamada H, Ishii KJ, Takeshita F, Klinman DM. Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. J Immunol 2003; 171: 1393

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 2010; 298: H 984-H 991

Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL, Goyert SM. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. Immunity 1996; 4: 407-414

- Haziot A, Ferrero E, Lin XY, Stewart CL, Goyert SM. CD14-deficient mice are exquisitely insensitive to the effects of LPS. *Prog Clin Biol Res* 1995; 392: 349-351
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745
- Herold G, Innere Medizin In: Eigenverlag Herold G und Mitarbeiter Hrsg. Innere Medizin. Köln: 2009: 301-304
- Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 2001; 69: 1477-1482
- Hornig T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002; 420: 329-333
- Hornig T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; 2: 835-841
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol* 1999; 162: 3749-3752
- Ishida H, Hastings R, Kearney J, Howard M. Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J Exp Med* 1992; 175: 1213-1220
- Jinquan T, Larsen CG, Gesser B, Matsushima K, Thestrup-Pedersen K. Human IL-10 is a chemoattractant for CD8⁺ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8-induced CD4⁺ T lymphocyte migration. *J Immunol* 1993; 151: 4545-4551
- Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 2005; 175: 3463-3468
- Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol* 1994; 152: 3559-3569

Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11: 115-122

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol* 2007; 19: 24-32

Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001; 167: 5887-5894

Khan AU, Aslam MA, Hussain I, Naz AG, Rana IA, Ahmad MM, Ali M, Ahmad S. Role of Toll-like receptor 2 (-196 to -174) polymorphism in susceptibility to pulmonary tuberculosis in Pakistani population. *Int J Immunogenet* 2014; 41: 105-111

Kilbourn RG, Griffith OW. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 827-831

Kim JI, Lee CJ, Jin MS, Lee CH, Paik SG, Lee H, Lee JO. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 11347-11351

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

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

Knuefermann P, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Goyert SM, Carabello BA, Mann DL, Vallejo JG. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2002; 106: 2608-2615

Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 12631-12636

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

Lenert P, Stunz L, Yi AK, Krieg AM, Ashman RF. CpG stimulation of primary mouse B cells is blocked by inhibitory oligodeoxyribonucleotides at a site proximal to NF-kappaB activation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2001; 11: 247-256

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 H, He Y, Zhang J, Sun S, Sun B. Lipopolysaccharide regulates toll-like receptor 4 expression in human aortic smooth muscle cells. *Cell Biol Int* 2007; 31: 831-835

Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 5567-5572

Liew FY. Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and autoimmune diseases. *Immunol Lett* 1994; 43: 95-98

Lin FY, Chen YH, Tasi JS, Chen JW, Yang TL, Wang HJ, Li CY, Chen YL, Lin SJ. Endotoxin induces toll-like receptor 4 expression in vascular smooth muscle cells via NADPH oxidase activation and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2630-2637

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487-501

Lohner R, Schwederski M, Narath C, Klein J, Duerr GD, Torno A, Knuefermann P, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Boehm O. Toll-like receptor 9 promotes cardiac inflammation and heart failure during polymicrobial sepsis. *Mediators Inflamm* 2013; 10: 1155

Maier S, Emmanuilidis K, Entleutner M, Zantl N, Werner M, Pfeffer K, Heidecke CD. Massive chemokine transcription in acute renal failure due to polymicrobial sepsis. *Shock* 2000; 14: 187-192

Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Huser 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: 505-511

Mannel DN, Echtenacher B. TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol* 2000; 74: 141-161

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

McKenna TM, Martin FM, Chernow B, Briglia FA. Vascular endothelium contributes to decreased aortic contractility in experimental sepsis. *Circ Shock* 1986; 19: 267-273

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

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000a; 173: 89-97

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000b; 343: 338-344

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

Michie HR, Spriggs DR, Manogue KR, Sherman ML, Revhaug A, O'Dwyer ST, Arthur K, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery* 1988; 104: 280-286

Mims C, Dockrell HM, Goering RV, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M. *Medizinische Mikrobiologie Infektiologie*. München: Elsevier Urban und Fischer, 2006, Seite 65

Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremler KE, Fung VP, Madani H, Widmer MB. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 1993; 151: 1548-1561

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 1977; 41: 19-26

- Netea MG, van Deuren M, Kullberg BJ, Cavaillon JM, van der Meer JW. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol* 2002; 23: 135-139
- 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
- Nichols RL. Intraabdominal sepsis: characterization and treatment. *J Infect Dis* 1977; 135: 54-57
- Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- β induction. *Nat Immunol* 2003; 4: 161-167
- Ostuni R, Zanoni I, Granucci F. Deciphering the complexity of Toll-like receptor signaling. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 4109-4134
- Paolillo R, Iovene MR, Romano Carratelli C, Rizzo A. Induction of VEGF and MMP-9 expression by toll-like receptor 2/4 in human endothelial cells infected with *Chlamydia pneumoniae*. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012; 25: 377-386
- Parratt JR. Nitric oxide. A key mediator in sepsis and endotoxaemia? *J Physiol Pharmacol* 1997; 48: 493-506
- Pepys MB, Hirschfield GM, Tennent GA, Gallimore JR, Kahan MC, Bellotti V, Hawkins PN, Myers RM, Smith MD, Polara A, Cobb AJ, Ley SV, Aquilina JA, Robinson CV, Sharif I, Gray GA, Sabin CA, Jenvey MC, Kolstoe SE, Thompson D, Wood SP. Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature*. 2006; 440: 1217-1221
- Persichini T, Cantoni O, Suzuki H, Colasanti M. Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 949-954
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 929-979

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: best keeper - excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 2004; 26: 509-515

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

Poeze M, Ramsay G, Gerlach H, Rubulotta F, Levy M. An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis. *Crit Care* 2004; 8: R409-R413

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van HC, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR 4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-2088

Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glauser MP, Tobias PS, Ulevitch RJ. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1994; 1: 509-516

Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Gründling H, John S, Kern W, Kreymann G, Krüger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stüber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T, 2010. S2-Leitlinie: Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/079-001l_S2k_Sepsis_Leitlinientext_01.pdf (Zugriffsdatum: 02.08.2014)

Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 2003; 112: 460-467

Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 137-143

Roger T, Froidevaux C, Le Roy D, Reymond MK, Chanson AL, Mauri D, Burns K, Riederer BM, Akira S, Calandra T. Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 2348-2352

Schiller M. Postoperative intestinal atony and prevention. *Med Klin* 1958; 53: 1176

Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249: 1429-1431

Sewnath ME, Olszyna DP, Birjmohun R, ten Kate FJ, Gouma DJ, van Der Poll T. IL-10-deficient mice demonstrate multiple organ failure and increased mortality during *Escherichia coli* peritonitis despite an accelerated bacterial clearance. *J Immunol* 2001; 166: 6323-6331

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189: 1777-1782

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

Smith MF, Jr, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF- κ B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 32552-32560

Sukkar MB, Xie S, Khorasani NM, Kon OM, Stanbridge R, Issa R, Chung KF. Toll-like receptor 2, 3, and 4 expression and function in human airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 641-648

Takayama T, Morelli AE, Onai N, Hirao M, Matsushima K, Tahara H, Thomson AW. Mammalian and viral IL-10 enhance C-C chemokine receptor 5 but down-regulate C-C chemokine receptor 7 expression by myeloid dendritic cells: impact on chemotactic responses and in vivo homing ability. *J Immunol* 2001; 166: 7136-7143

Takeda K, Akira S. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* 2003; 5: 143-153

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16: 3-9

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

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

Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* 2000a; 12: 113-117

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

Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 1986; 164: 777-793

Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 775-783

Traeger T, Koerner P, Kessler W, Cziupka K, Diedrich S, Busemann A, Heidecke CD, Maier S. Colon ascendens stent peritonitis (CASP) - a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J Vis Exp* 2010; 46: 2299

Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 437-457

Vallance P, Moncada S. Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horiz* 1993; 1: 77-86

Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 411-452

Vromen A, Arkovitz MS, Zingarelli B, Salzman AL, Garcia VF, Szabó C. Low-level expression and limited role for the inducible isoform of nitric oxide synthase in the vascular hyporeactivity and mortality associated with cecal ligation and puncture in the rat. *Shock* 1996; 6: 248-253

Waisbren BA. Gram-negative shock and endotoxin shock. *Am J Med* 1964; 36: 819-824

Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001; 412: 346-351

- Wang C, Mansard A, Giummelly P, Atkinson J. Decreased aortic smooth muscle contraction in a rat model of multibacterial sepsis. *Fundam Clin Pharmacol* 2004; 18: 679-683
- Wang Y, Changsiri D, McKenzie G, Stasch JP, Hahn M, Woolfe C, Rajbhandari D, Celermajer DS, Stocker R. Is kynurenine a novel and important vasodilator in human septic shock? *BMC Pharmacology* 2009; 9: 70
- Wang Y, Liu H, McKenzie G, Witting PK, Stasch JP, Hahn M, Changsirivathanathamrong D, Wu BJ, Ball HJ, Thomas SR, Kapoor V, Celermajer DS, Mellor AL, Keaney JF Jr, Hunt NH, Stocker R. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nat Med* 2010; 16: 279-285
- Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001; 2: 346-352
- Wichtermann, 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, Schweitzer J, Vogt W, Browder IW. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. *Crit Care Med* 2003; 31: 1808-1818
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-1433
- Wright SD, Tobias PS, Ulevitch RJ, Ramos RA. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J Exp Med* 1989; 170: 1231-1241
- Yamada H, Gursel I, Takeshita F, Conover J, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita S, Klinman DM. Effect of suppressive DNA on CpG-induced immune activation. *J. Immunol* 2002; 169: 5590-5594

- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002a; 420: 324-329
- Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002b; 169: 6668-6672
- Yang X, Coriolan D, Schultz K, Golenbock DT, Beasley D. Toll-like receptor 2 mediates persistent chemokine release by *Chlamydia pneumoniae*-infected vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2308-2314
- Yasuda H, Leelahavanichkul A, Tsunoda S, Dear JW, Takahashi Y, Ito S, Hu X, Zhou H, Doi K, Childs R, Klinman DM, Yuen PS, Star RA. Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol* 2008; 294: F1050-F1058
- Zanoni I, Ostuni R, Capuano G, Collini M, Caccia M, Ronchi AE, Rocchetti M, Mingozzi F, Foti M, Chirico G, Costa B, Zaza A, Ricciardi-Castagnoli P, Granucci F. CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* 2009; 460: 264-268
- Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002; 168: 554-561
- Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303: 1522-1526
- Zou L, Feng Y, Chen YJ, Si R, Shen S, Zhou Q, Ichinose F, Scherrer-Crosbie M, Chao W. Toll-like receptor 2 plays a critical role in cardiac dysfunction during polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 2010; 38: 1335-1342

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden an folgender Stelle publiziert:

Ehrentraut SF, **Dörr A**, Ehrentraut H, Lohner R, Lee SH, Hoeft A, Baumgarten G, Knuefermann P, Boehm O, Meyer R. Vascular dysfunction following polymicrobial sepsis: role of pattern recognition receptors. PLoS One 2012; 7: 44531

7. Danksagung

Allen, die mich im Verlauf meiner Promotion unterstützt haben, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen. Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. Rainer Meyer (Institut für Physiologie II) für das Interesse an der vorliegenden Arbeit, die ständige Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik während des Schreibprozesses
- Dr. Stefan Ehrentraut für die Einarbeitung, sehr gute Betreuung und stetiges Antreiben während der Labor- und Schreibphase
- Alexander Fuchs für seine großartige Unterstützung und mehrfaches Korrekturlesen der Arbeit
- Meinen Eltern für jegliche Art von Motivation und moralische Unterstützung
- Hanne Bock für ihre freundliche Art und große Hilfsbereitschaft
- Susanne Schulz und dem ganzen Team für die Unterstützung während der Erhebung der molekularbiologischen Daten