

Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. R. Siewert)

Einfluss des CC-Chemokinrezeptor 4 Knockouts auf die abdominelle Sepsis im Mausmodell der Colon Ascendens Stent Peritonitis

Volker Aßfalg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann
2. Priv.-Doz. Dr. Chr. P. Schuhmacher

Die Dissertation wurde am 02.08.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 16.11.2005 angenommen.

Für meine Eltern Doris und Alfons Aßfalg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einführung.....	9
1.1 Pathophysiologie der Sepsis	9
1.1.1 Anastomoseninsuffizienz als Sepsisursache	9
1.1.2 Das Sepsis Syndrom.....	10
1.2 Immunologische Mechanismen der Sepsisbekämpfung.....	12
1.2.1 Lokale Abwehrreaktionen	13
1.2.1.1 Angeborene Immunantwort	13
1.2.1.2 Adaptive Immunantwort	16
1.2.2 Systemische Immunreaktionen	19
1.2.3 Systematik und Funktionen der Zytokine und Chemokine.....	23
1.3 Der CC-Chemokinrezeptor 4 (CCR 4) und seine Liganden TARC und MDC	25
1.3.1 Der CC-Chemokinrezeptor 4 (CCR4).....	25
1.3.2 Thymus and activation-regulated chemokine (TARC)	27
1.3.3 Macrophage-derived chemokine (MDC)	27
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	29
2 Material und Methoden.....	30
2.1 In vivo Methoden.....	30
2.1.1 Genehmigung der Versuche, Versuchstiere und Tierhaltung	30
2.1.2 Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) – Operation in der Maus	30
2.1.2.1 Anästhesie und Narkose.....	31
2.1.2.2 CASP – Operationsvorbereitungen, Instrumentarium und Material.....	32
2.1.2.3 16G CASP.....	33
2.1.2.4 Chirurgische Intervention nach 16G CASP (16G CASPI).....	34
2.1.2.5 Schein-Operation zu Kontrollzwecken (sham CASP).....	35
2.1.2.6 Postoperative Überwachung und Dokumentation	36
2.1.2.7 Versuchsguppen.....	37
2.2 Entnahme von Untersuchungsmaterialien aus Versuchstieren.....	38
2.2.1 Peritoneallavage in der Maus	38
2.2.2 Serumgewinnung von der Maus.....	38
2.2.3 Organentnahmen (Lunge, Leber, Milz und Nieren).....	38
2.3 In vitro Methoden	40
2.3.1 Bakteriologische Untersuchung der Peritoneallavage.....	40
2.3.2 Bakteriologische Untersuchung der Organe	40

2.3.3	Serum- und Organ-ELISAs	40
2.3.3.1	Verwendete Materialien für Serum- und Organ-ELISAs	41
2.3.3.2	Protokoll des ELISA	41
2.3.4	Durchflusszytometrie (FACS) – Analyse der Peritoneallavage.....	43
2.3.5	Rekrutierung von Peritonealmakrophagen mittels Thioglykolatinjektion	46
2.3.6	Statistik.....	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Kinetik	47
3.1.1	Kinetik der 16G CASP: Einfluss von CCR4.....	47
3.1.2	Kinetik der 16G CASPI: Einfluss von CCR4	49
3.2	Bakteriologie.....	51
3.2.1	Bakteriologie der Peritoneallavage	51
3.2.1.1	Quantitative bakteriologische Analyse der Peritoneallavage nach 16G CASP ...	51
3.2.1.2	Qualitative bakteriologische Analyse der Peritoneallavage nach 16G CASP	53
3.2.2	Bakteriologie der Organe	54
3.3	Systemische Zytokinspiegel	56
3.3.1	IL-10.....	56
3.3.2	TNF α	58
3.3.3	IL-12p40.....	60
3.3.4	IL-18.....	62
3.4	Zytokinspiegel in Organen.....	64
3.4.1	IFN γ in der Leber	64
3.4.2	IFN γ in der Milz	66
3.5	Akute zelluläre Immunreaktion in der Bauchhöhle	68
3.5.1	Expressionsverhalten des Oberflächenrezeptors CD47	69
3.5.2	Expressionsverhalten des Oberflächenrezeptors Fc γ R _{III}	72
3.6	Rekrutierung von Peritonealmakrophagen nach Thioglykolatinjektion.....	76
4	Diskussion	77
5	Zusammenfassung.....	85
6	Literaturverzeichnis	87
7	Abbildungsverzeichnis.....	94
8	Tabellenverzeichnis.....	96
9	Danksagung.....	97

Abkürzungsverzeichnis

A	
APC	Antigen Presenting Cells
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
B	
BAL	Bronchoalveolarlavage
BFU	Burst Forming Unit
BSA	Bovines Serum Albumin
C	
C	Komplementfaktor
CASP	Colon Ascendens Stent Peritonitis
CASPI	Colon Ascendens Stent Peritonitis mit Intervention
CC	β -Chemokin ohne Aminosäure zwischen den Cysteinen
CCR	CC-Chemokin Rezeptor
CXC	α -Chemokin mit einer Aminosäure zwischen den Cysteinen
CX ₃ C	α -Chemokin mit drei Aminosäuren zwischen den Cysteinen
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony Forming Unit
CLP	Cecal Ligation and Puncture
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxyd
CSF	Colony Stimulating Factor
D	
DIG	Disseminierte Intravasale Gerinnung
DNS / DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonukleinsäure verdauendes Enzym
E	
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbance Assay
F	
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FCS	Fetales Kälberserum
G	
g	Gramm
H	
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure / Hydrogenchlorid
I	
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickoxydsynthase
i.p.	intraperitoneal
IP-10	IFN- γ -inducible Protein-10
i.v.	intravenös
K	
KBE	Koloniebildende Einheiten

KC	Keratinocytes-derived Chemokine
kD	Kilodalton
L	
l	Liter
LBP	LPS bindendes Protein
LFA	Lymphozytenfunktion assoziiertes Antigen
LPS	Lipopolysaccharid = Endotoxin
LT	Leukotrien
M	
mAbs	Monoklonaler Antikörper
Mac	Makrophagenoberflächenprotein
MAC	Membran Attackierungskomplex
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MDC	Macrophage Derived Chemokine
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
mRNS	Messenger (= Boten-) Ribonukleinsäure
N	
n	Anzahl
NaCl	Kochsalz / Natriumchlorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxyd
NV	Nierenversagen
O	
OP	Operation
P	
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphat Buffered Saline
PECAM	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule
pg	Picogramm
PG	Prostaglandin
PRR	Pattern Recognition Receptor
R	
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
RNS / RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonukleinsäure verdauendes Enzym
S	
Sham-Operation	Scheinoperation
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
STCP	Stimulated T cell Chemotactic protein
T	
TARC	Thymus and Activation-Regulated

TCR	Chemokine
TGF	T-Zell Rezeptor
TLR	Transforming Growth Factor
TNF	Toll like Receptor
Tris-Puffer	Tumor Nekrose Faktor
U	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
U min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
V	
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA	Very Late Antigen
Sonstige:	
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
16G, 18G	16 Gauge, 18 Gauge

1 Einführung

Nach wie vor stellt die Sepsis (griech.: *Zerfall, Fäulnis*) eine große Herausforderung für die Intensivmedizin dar, da die Pathomechanismen ihrer Entstehung erst nach und nach bekannt werden und die heutigen Therapieansätze diese neuen Erkenntnisse nur ansatzweise einbeziehen.

Die Ursachen einer Sepsis sind zahlreich. So begünstigen beispielsweise Diabetes mellitus, lymphoproliferative Erkrankungen, Leberzirrhose, Verbrennungen, mechanische Beatmung, AIDS und immunsupprimierende Medikamente, aber auch Implantate sowie Gefäßkatheter die Entstehung einer Bakteriämie oder einer Fungämie als Ausgangspunkt einer Sepsis. Nicht zuletzt haben auch Errungenschaften der modernen Medizin (Einsatz von Immunsuppressiva, neoadjuvante Therapieregime etc.) zu einem Anstieg der Sepsisinzidenz beigetragen [27].

Das Ziel, der Sepsis mit neuen Therapieansätzen erfolgreich zu begegnen, kann nur über die Erforschung der Grundlagen der Sepsisentstehung führen.

1.1 *Pathophysiologie der Sepsis*

1.1.1 Anastomoseninsuffizienz als Sepsisursache

In der Viszeralchirurgie ist die postoperative Anastomoseninsuffizienz z. B. nach kolorektaler Chirurgie die Hauptursache einer postoperativen Sepsis. Durch eine Anastomoseninsuffizienz tritt je nach Ausmaß und Lage der Öffnung Darminhalt mit Fäzes und somit auch Bakterien aus der Mikroflora des Darmes in die Bauchhöhle über. In der Folge entsteht zunächst eine lokal begrenzte Entzündung des Peritoneums, eine Peritonitis. Die Peritonealhöhle ist bemerkenswert widerstandsfähig gegenüber einer bakteriellen Kontamination, erst ein kontinuierlicher Austritt von Darminhalt führt zu einer Erschöpfung der lokalen Abwehr des Peritoneums und zu einer diffusen Peritonitis.

Klinisch äußert sich die akute Peritonitis mit abdominellen Schmerzen, Druckempfindlichkeit (lokal oder diffus), Abwehrspannung und Loslassschmerz. Die Peristaltik und die mit ihr verbundenen Darmgeräusche nehmen ab, der Patient wird zunehmend hypoton und tachykard. Diagnostisch zeigt sich eine Leukozytose mit Linksverschiebung im Differentialblutbild oder eine Leukopenie. In der

Röntgenübersichtsaufnahme des Abdomens ist der Nachweis freier Luft ein Indiz für das Vorliegen einer Anastomoseninsuffizienz bzw. Darmperforation.

Mit dem Übertritt der Bakterien in die Blutbahn beginnt die Generalisation der Infektion mit Einbezug zahlreicher Organsysteme (z.B. Herz – Kreislaufsystem, Lunge, Leber, Nieren, Milz, Gerinnungssystem). Je nach Abwehrlage des Patienten und therapeutischer Intervention kann eine schwere Sepsis eintreten, die häufig im septischen Schock tödlich endet.

1.1.2 Das Sepsis Syndrom

Das Eindringen von Mikroorganismen in die Blutbahn und deren Aussaat in die verschiedensten Organe löst zahlreiche Reaktionskaskaden im Organismus aus, die zusammen das klinische Bild der Sepsis hervorrufen. Mit dem Ziel, die beobachteten Aspekte und Stadien eines Sepsisverlaufes mit einer einheitlichen Terminologie zu beschreiben, wurde folgende Übereinkunft getroffen:

Die Sepsis als systemische Reaktion auf eine Infektion ist nach der Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) im Jahre 1991 als ein dynamisches Kontinuum unter dem Überbegriff „Sepsis Syndrom“ mit dem Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), der schweren Sepsis und dem septischen Schock zu sehen [1].

Stadien des Sepsis Syndroms

Stadium	Definition	Klinik [5, 27]	Letalität [5, 7, 18]
SIRS (systemic inflammatory response syndrome)	Konstellation nebenstehender klinischer Zeichen, infektiöse oder nicht- infektiöse Ursache	<ul style="list-style-type: none"> · Körpertemperatur: > 38 °C oder < 36 °C · Herzfrequenz: > 90 min⁻¹ · Atemfrequenz: > 20 min⁻¹ · Leukozyten: > 12.000 µl⁻¹, < 4000 µl⁻¹ oder > 10 % unreife Granulozyten 	7 – 10 %
Sepsis	SIRS <i>mit</i> Nachweis der mikrobiellen Infektion	(wie SIRS)	16 – 20 %
Schwere Sepsis	Sepsis mit mind. einer Organdysfunktion: <ul style="list-style-type: none"> · kardiovaskulär · pulmonal · hepatisch · hämatologisch · renal · zerebral · metabolisch 	<ul style="list-style-type: none"> → Schock, Hypotonie (RR_{sys} < 90 mmHg, Abfall > 40 mmHg), Minderperfusion, Ödeme → ARDS, Hypoxämie / Hyperkapnie → Leberversagen, DIG → DIG → Oligurie, Anurie, NV → Koma, Embolien → Azidose 	20 – 45 %
Septischer Schock	Septisch-toxischer Schock mit multiplem Organversagen	Zentralisation, Dialyse- und Katecho- laminpflichtigkeit, Intubation und Beatmung notwendig	40 – 80 %

ARDS = akute respiratory distress syndrome; DIG = disseminierte intravasale Gerinnung;
NV = Nierenversagen;

Tab.1.1.1: Stadien des Sepsis Syndroms

Parallel zu den Stadien des Sepsis Syndroms kann mittels verschiedener klinischer und laborchemischer Parameter (Oxygenierung, arterieller pH-Wert, Natrium und Kalium im Serum, Kreatinin, Hämatokrit, Bilirubin) und der Glasgow-Coma-Scale eine Risikoabschätzung für den Patienten erfolgen. Hierfür wurden beispielsweise der APACHE (acute physiology and chronic health evaluation) III Score [31] und der SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) Score [69] entwickelt.

1.2 Immunologische Mechanismen der Sepsisbekämpfung

Mit der Freisetzung von Bakterien in die Bauchhöhle ist die Konfrontation des Immunsystems mit bakterienspezifischen Antigenen verbunden. Als erste Instanz der Verteidigung fungiert die angeborene Abwehr. Durch sie erfolgt die primäre Erkennung der bakteriellen Pathogene. Ortsständige Makrophagen und Granulozyten verfügen über ein evolutionär gesehen sehr altes Repertoire an Rezeptoren (PRR = pattern recognition receptors), die konstante molekulare Muster der mikrobiellen Pathogene, sog. PAMPs (= pathogen-associated molecular patterns) erkennen. Grundlagen für die Erkennung dieser Molekularstrukturen durch die Zellen des angeborenen Immunsystems sind folgende Charakteristika der PAMPs:

- klare biochemische Unterscheidung der PAMPs von wirtseigenen antigenen Strukturen
- große Gruppen von pathogenen Keimen tragen die gleichen PAMPs
- PAMPs sind oft essentielle Bestandteile innerhalb der pathogenen Keime (evolutionär nicht entbehrlich)
- PAMPs sind invariante Strukturen, d.h. eine Mutation auf Ebene der PAMPs ist für den Erreger oft letal

Beispiele bakterieller PAMPs [30]:

PAMP	Vorkommen	erkannte Struktur	PRR
LPS (Lipopolysaccharid / Endotoxin)	gram-negative Bakterien	Lipoid A	CD14 / TLR4 zus. mit LBP
Teiconsäuren	gram-positive Bakterien	Lipoteiconsäuren	TLR2 & 4
Peptidoglykan (Murein)	alle Bakterien	Peptidoglykan	TLR2
Bakterielle DNS	alle Bakterien	gehäuftes Vorkommen von Cytosin-Guanin als Strukturelement	TLR9

LBP = LPS-bindendes Protein aus dem Serum

Tab.1.2.1: Bakterielle PAMPs (pathogen-associated molecular patterns)

Die Erkennung eines PAMPs bewirkt einerseits eine Aktivierung der damit konfrontierten Zellen (Makrophagen, Granulozyten), die die Pathogene sodann phagozytieren, andererseits wird über eine Signalkaskade im Zellkern die Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (z.B. IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α und RANTES) induziert [42].

Die Produktion und Sekretion der inflammatorischen Zytokine und Chemokine hat das Ziel, benachbart liegende Zellen der angeborenen und später auch der adaptiven Abwehr zu aktivieren (lokale Effekte) und über systemische Wirkungen den Körper gegen die Keime zu mobilisieren (systemische Effekte).

Effekte der freigesetzten Zytokine [28]:

	IL-1	IL-6	IL-8 *	IL-12	TNFα
Lokale Effekte	· aktiviert Gefäßendothel	· aktiviert Lymphozyten · steigert Antikörperproduktion	· chemotaktisch auf Leukozyten (v.a. neutrophile Granulozyten)	· aktiviert NK-Zellen · Differenzierung von CD4-T-Zellen zu T _H 1-Zellen	· aktiviert Gefäßendothel · erhöht Permeabilität der Gefäßwände
Systemische Effekte	· Fieber	· Fieber · steigert Produktion von akute Phase Proteine			· Fieber · Schock · Energiebereitstellung

* murine funktionelle Analoga von IL-8 sind MIP-2 und KC

Tab.1.2.2: Lokale und systemische Effekte der von Zellen der angeborenen Immunität freigesetzten Zytokine

1.2.1 Lokale Abwehrreaktionen

Ziel des Organismus ist es, die Infektion möglichst früh, effektiv und schnell an ihrer Ausbreitung zu hindern, um eine Generalisation mit Streuung im Körper und eine Sepsis zu verhindern. Dafür muss der Infektionsherd gegenüber der Umgebung effektiv abgegrenzt und vermehrt Abwehrzellen in den Entzündungsherd rekrutiert werden.

1.2.1.1 Angeborene Immunantwort

Um eine Ausbreitung der Erreger zu verhindern, werden zahlreiche Entzündungsmediatoren wirksam, die das Endothel der lokalen Blutgefäße verändern. Die typischen klinischen Entzündungszeichen Rubor (=Rötung), Dolor (=Schmerz),

Calor (=Erwärmung), Tumor (=Schwellung) und Functio laesa (=Funktionsverlust) sind auf die Effekte dieser Mediatoren zurückzuführen.

TNF α als Schlüsselzytokin der Inflammation bewirkt über die Induktion der induzierbaren Stickoxydsynthase (iNOS) und die folgende Freisetzung von Stickoxyd (NO) eine lokale Vasodilatation mit erhöhtem, aber verlangsamtem Blutfluss (Ursache von Rubor und Calor). Ebenso wirkt das im Rahmen von inflammatorischen Prozessen aus Zellmembranen freigesetzte Prostaglandin E₂ (PGE₂) vasodilatativ. Mikroorganismen und LPS können über den alternativen Weg das Komplementsystem aktivieren, wodurch in der Kaskade zur Bildung des Membran-Attakierungskomplexes (MAC) die Anaphylatoxine C_{5a} und C_{3a} abgespalten werden. Insbesondere C_{5a} kann basophile Granulozyten und Mastzellen zur Degranulation bringen und durch das freigesetzte Histamin, Serotonin und Leukotrien B₄ (LTB₄) (u.a. Ursache von Dolor) die lokale Vasodilatation noch verstärken. Über die Vasodilatation und eine Permeabilitätserhöhung des Endothels entsteht ein vermehrter Flüssigkeitsaustritt in das umgebende Gewebe bzw. die Bauchhöhle mit einer Akkumulation von Komplementfaktoren, Immunglobulinen und weiteren Serumproteinen. Klinisch manifestieren sich diese Veränderungen in Form von Gewebsödem (=Tumor) bzw. Aszites. Die Drainage der Flüssigkeitsansammlung erfolgt über die lokalen Lymphbahnen in die Lymphknoten, wo die adaptive Immunantwort initiiert wird.

Eine Endothelschädigung im Entzündungsgebiet führt zur Exposition von Gewebsthromboplastin gegenüber dem Gerinnungssystem. Die Gerinnungskaskade wird, verstärkt durch TNF α und PAF (Plättchenaktivierender Faktor aus Makrophagen und neutrophilen Granulozyten), lokal aktiviert. Thrombin entsteht und kleine Blutgefäße werden verschlossen. Eine Ausbreitung der Erreger soll so unterbunden werden. Schreitet die Entzündungsreaktion fort, kann durch den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten eine Verbrauchskoagulopathie (DIG = disseminierte intravasale Gerinnung) entstehen.

Neutrophile Granulozyten und Makrophagen phagozytieren die über PRR erkannten oder mit dem Komplementfaktor C_{3b} markierten Mikroorganismen und zerstören diese in den Phagolysosomen. Durch die Produktion von reaktiven O₂-Radikalen und H₂O₂ („oxidative burst“, stimuliert durch IL-8 und TNF α), DNasen, Lipasen, Proteasen und Defensinen sind sie in der Lage, die Erreger abzutöten.

Die Phagozyten sezernieren nach der Aufnahme der Bakterien zahlreiche Zytokine und Chemokine, die entscheidend dazu beitragen, dass vermehrt Abwehrzellen in das Entzündungsgebiet gelangen. Durch Kontakt des Gefäßendothels mit freigesetztem

LTB₄, Komplementfaktor C_{5a}, oder Histamin aus Mastzellen wird innerhalb von Minuten das Adhäsionsmolekül P-Selektin auf der Oberfläche exprimiert. Einige Stunden nach Kontakt mit LPS oder TNF- α erscheint E-Selektin. Die Selektine binden an ihre Liganden auf Leukozyten, die Sialyl-Lewis^x-Einheit (sLe^x) von Glykoproteinen, so dass diese reversibel an das Endothel anhaften und durch den verlangsamten Blutstrom am Gefäßendothel entlangrollen (leukocyte rolling). Durch MIP-1 α [49, 59] und TNF α wird auf Gefäßendothelien außerdem das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) induziert. Auf den Leukozyten befinden sich die Integrine LFA-1 (CD11a:CD18) und Mac-1 (CD11b:CD18, auch CR3). Gelangt nun in Folge einer Entzündungsreaktion freigesetztes IL-8 (murine funktionelle Analoga: MIP-2 und KC) zu den rollenden Leukozyten in die Blutbahn, so arrangieren sich LFA-1 und Mac-1 zu einer für ICAM-1 hochaffinen Konformation. Die Leukozyten werden an das Endothel stark gebunden und beginnen, sich durch das Endothel zu bewegen (Extravasation, Leukozytendiapedese). Dies geschieht mittels LFA-1 / ICAM-1-Interaktionen und des PECAM-1-Moleküls (Platelet-Endothelial cell adhesion Molecule, auch CD31), welches sowohl auf den Leukozyten als auch zwischen den Endothelzellen exprimiert wird. Im Gewebe wandern die Leukozyten dem steigenden chemischen Konzentrationsgradienten von Chemokinen (z.B. IL-8 [53], MCP-1, RANTES) folgend in den Entzündungsherd und werden durch weitere Chemokine zu aktiven Abwehrzellen aktiviert.

In Abb. 1.2.1 sind die Abläufe des Leukozytenrollings, der Adhäsion an das Gefäßendothel, der Diapedese und der entlang ansteigender Gradienten chemotaktischer Mediatoren dargestellt.

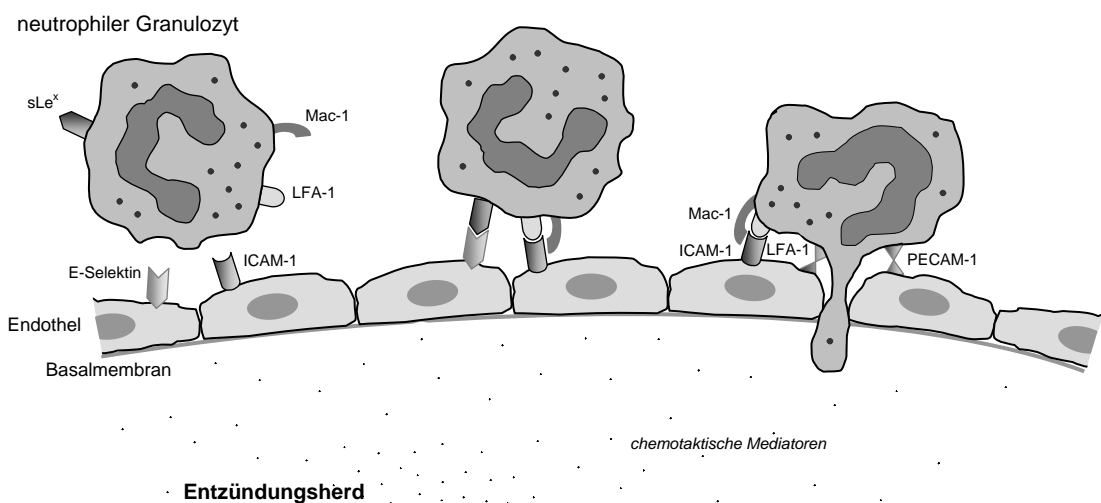


Abb.1.2.1.: Leukozytenrolling, Adhäsion an das Gefäßendothel und Leukozytendiapedese

1.2.1.2 Adaptive Immunantwort

Oftmals gelingt es der angeborenen Immunantwort nicht, die Erreger abzutöten. Dennoch erfüllt sie dann die Funktion, die Ausbreitung der Infektion so lange zu verzögern, bis die adaptive Immunabwehr eingeleitet werden kann [28].

Als antigenpräsentierende Zellen (APC) präsentieren dendritische Zellen und Makrophagen über MHC II (Major Histocompatibility Complex) Peptid-Fragmente der zerstörten Mikroorganismen an $CD4^+$ -Zellen. Damit wird die antigenspezifische Immunabwehr eingeleitet. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) der $CD4^+$ - Zelle erkennt über seine variable Region das spezifische Peptidantigen. Über den TCR-assoziierten CD3-Komplex wird eine Aktivierung der $CD4^+$ Zelle ausgelöst, wodurch es zu einer gezielten Änderung der Genexpression kommt. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei die gesteigerte Synthese und Sekretion von IL-2. IL-2 verstärkt seinerseits die Aktivierung der $CD4^+$ Zelle (autokrine Stimulation). Dieser Effekt wird verstärkt, wenn die APC nach der Phagozytose des Keimes Oberflächenmoleküle der B7-Familie exprimiert, welche an das CD28 des $CD4^+$ - Lymphozyten binden. Diese Bindung bewirkt eine Stabilisierung der IL-2-mRNS und eine erhöhte Expression von IL-2-Rezeptoren. IL-2 wirkt proliferationsfördernd auf den $CD4^+$ - Lymphozyten, der nun klonal expandiert. Auch differenzieren diese $CD4^+$ - Lymphozyten jetzt zu Effektorzellen, denen die L-Selektine fehlen, so dass sie nicht in Lymphknoten zurückgehalten werden können. Durch das nun von $CD4^+$ - Lymphozyten exprimierte VLA-4 (Very Late Antigen) binden sie an das VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) des Gefäßendothels in der entzündeten Region und gelangen so in den Infektionsherd. Durch $IFN\gamma$ sowie IL-2 (v.a. aus $CD8^+$ -T-Zellen) und IL-12 (v.a. aus Monozyten / Makrophagen) werden die $CD4^+$ - Lymphozyten zu inflammatorischen T_H1 -Effektorzellen, die ihrerseits Makrophagen aktivieren. Mittels IL-4, IL-6 und IL-2 hingegen entstehen T_H2 -Helferzellen. Diese induzieren die weitere Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen und greifen kontrollierend in die T_H1 -Antwort ein. Die Plasmazellen übernehmen die Produktion antigenspezifischer Antikörper [28, 51]. Durch bis heute nicht vollständig bekannte Interaktionen zwischen dem Pathogen einerseits und den Cytokin-produzierenden Makrophagen andererseits werden früh die Weichen gestellt, ob die adaptive Immunabwehr eher zellulär (T_H1) oder humoral (T_H2) geprägt ist. Dies wiederum kann sich entscheidend auf den Infektionsverlauf und die Fähigkeiten zur Eliminierung des Keimes auswirken. Die Tatsache, dass die Prägung einer Immunantwort entscheidende Auswirkungen auf den weiteren Krankheitsverlauf haben kann, wird am Beispiel der Lepra klar. Bei der aggressiven

„lepromatösen“ Verlaufsform ist die humoral dominierte Immunantwort ($T_H1 < T_H2$) nicht ausreichend, um den Krankheitsverlauf einzudämmen. Im Gegensatz dazu gelingt dies dem Organismus durch eine zellulär geprägte Immunantwort ($T_H1 > T_H2$) bei der eher milden Verlaufsform, der „tuberkulösen“ Lepra.

Die meisten Proteinantigene, die durch Präsentation an MHC II eine $CD4^+$ -T-Zell-Antwort auslösen, rufen eine gemischte T_H1 - und T_H2 -Zellantwort hervor. Hierfür sind Affinität des Peptidfragmentes zum MHC II-Rezeptor und Dichte der Präsentation auf der APC entscheidend. Da T_H2 -Zellen effektiv extrazelluläre Keime (wie z.B. Bakterien der Darmflora) abwehren, ist es sinnvoll, dass eine T_H2 -Antwort schon bei niedriger Präsentationsdichte auf Makrophagen eingeleitet wird, da durch das extrazelluläre Wachstum tendentiell weniger Peptide präsentiert werden. Im Gegensatz dazu steht die v.a. gegen intrazellulär proliferierende Mikroorganismen (Viren, obligat intrazelluläre Bakterien) gerichtete T_H1 -Antwort, hervorgerufen durch hohe Antigendichte auf den APC [28].

Die Differenzierung der $CD4^+$ - Zellen zum T_H1 - oder T_H2 -Typ ist nicht nur mit einer unterschiedlichen Sekretion von Chemokinen (T_H1 : $TNF\alpha$ und $INF\gamma$ gegenüber T_H2 : IL-4 und IL-5) [40] verbunden, auch die Oberflächenrezeptoren weisen verschiedene Expressionsmuster auf. T_H1 -Zellen werden durch CXCR3 und CCR5 charakterisiert, T_H2 -Zellen exprimieren CCR4, CCR8 und in geringerer Dichte CCR3. Diese Unterschiede im Muster der Oberflächenrezeptoren wirkt sich auf das chemotaktische Verhalten der beiden T_H -Zell-Subpopulationen aus. Während T_H1 -Zellen durch IP-10 (\leftrightarrow CXCR3) und MIP-1 β (\leftrightarrow CCR5) angesprochen werden, reagieren T_H2 -Zellen auf MDC und TARC (\leftrightarrow CCR4), I-309 (\leftrightarrow CCR8) und Eotaxin (\leftrightarrow CCR3) [6, 51].

Für die effektive Abwehr eingedrungener Mikroorganismen ist deren Abtötung durch aktivierte Makrophagen Voraussetzung. Die Makrophagenaktivierung ist die Hauptaufgabe der T_H1 -Zellen, nachdem diese phagozytierte und präsentierte Antigenpeptide auf den Makrophagen erkannt haben. Diese Aktivierung erfolgt über zwei Signale, von denen eines das von T_H1 -Zellen charakteristischerweise sezernierte Zytokin $INF\gamma$ ist. Das Zweitsignal kann durch Zell-Zell-Kontakte vermittelt werden. Der die Makrophagen für $INF\gamma$ sensibilisierende CD40-Ligand (CD40L), der von T_H1 - und T_H2 -Zellen exprimiert werden kann, spielt dabei eine zentrale Rolle. T_H2 -Zellen selbst sind nicht in der Lage, Makrophagen zu aktivieren, da sie kein $INF\gamma$, sondern das Makrophagen inaktivierende Zytokin IL-20 bilden [28]. Aktivierte Makrophagen können einerseits Pathogene viel effektiver phagozytieren und abtöten, andererseits stellen sie aber eine Gefährdung für das umgebende Gewebe dar, da die „Produkte“

des „oxidative burst“ eine lokale Gewebeerstörung verursachen können. Deshalb müssen aktivierte Makrophagen zuverlässig wieder deaktiviert werden, um überschießende Reaktionen zu vermeiden. Hierfür sind drei Mechanismen bekannt: Zum einen bricht die Zytokinsynthese sofort ab, wenn der Kontakt zwischen T-Zelle und Makrophage unterbrochen wird, zum anderen verfügt die $\text{IFN}\gamma$ -mRNS nur über eine kurze Halbwertszeit und wird zusätzlich von einer zeitgleich induzierten RNase abgebaut. Der dritte Kontrollmechanismus wird durch die T_H2 -Zellen ausgeübt. Diese sezernieren die für Makrophagen stark inhibierenden Zytokine $\text{TGF}\beta$, IL-4, IL-10 und IL-13. Über $\text{TGF}\beta$ (direkt) und IL-10 (indirekt) bremsen T_H2 -Zellen auch die Aktivierung und Proliferation von T_H1 -Zellen. Die Anwesenheit von T_H2 -Zellen ist somit für die Kontrolle und Begrenzung der Effektorfunktionen von aktivierten Makrophagen von entscheidender Bedeutung.

In Abbildung 1.2.2 werden diese Interaktionen zwischen T_H -Lymphozyten und Makrophagen grafisch veranschaulicht.

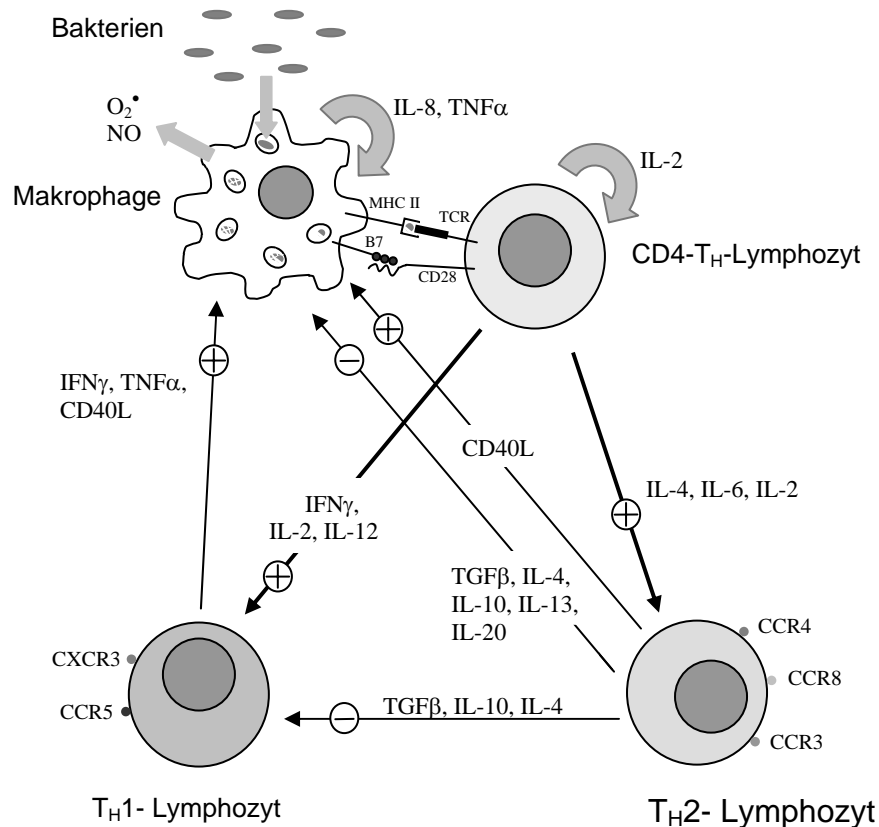


Abb. 1.2.2.: Interaktion von Makrophagen und T_H -Lymphozyten bei der Abwehr von Bakterien

1.2.2 Systemische Immunreaktionen

Das Krankheitsbild der Sepsis ist durch das klinische Bild des SIRS mit dem Nachweis mikrobieller Erreger definiert. Mit dem Übertritt von Keimen in die Blutbahn ist nicht nur eine Streuung in andere Organe möglich, sondern auch die systemische Freisetzung von Zytokinen verbunden. So essenziell einzelne Zytokine für die Abwehr vor Ort auch sind, so können sie bei systemischer Freisetzung dramatische, oftmals sogar letale Folgen für den Organismus haben.

Die Beteiligung der **Lunge** im Rahmen des Sepsis Syndroms mit der Gefahr eines ARDS zeigt die gefährlichen Effekte der Abwehrmechanismen, die durch Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zu Gewebsschädigungen führen können. Chemokine und Zytokine, die in der Peripherie und v.a. der Leber produziert wurden, gelangen über den venösen Rückstrom direkt in die Lunge und entfalten dort potentiell fatale Effekte. Zudem scheinen Alveolarmakrophagen durch gezielte Sekretion von Chemokinen den Entzündungsvorgang in der Lunge zu verstärken. Eine zentrale Rolle spielt hier IL-8 (murines funktionelles Analogon MIP-2), dessen Konzentration in der BAL-Flüssigkeit direkt mit der Mortalität von Patienten korreliert und als ein Indikator für die Entstehung und den Verlauf eines ARDS angesehen werden kann. So konnte durch eine Neutralisation des aus Alveolarmakrophagen stammenden IL-8 bzw. MIP-2 mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden, dass die Migration von Neutrophilen in das Lungengewebe bei Kaninchen [76] reduziert wird und bei Mäusen sich außerdem das Überleben verbessert [71]. Dies könnte ein Effekt einer geringeren Gewebszerstörung in der Lunge als Schlüsselorgan in der schweren Sepsis sein, bedingt durch weniger neutrophile Granulozyten [44]. Ein weiterer Effekt der Anwesenheit erhöhter Konzentrationen verschiedener Chemokine (z.B. MIP-1 α , MIP-2 und KC) im Rahmen eines Sepsis Syndroms bei Mäusen durch CASP ist der erhöhte transkapilläre Flux von Makromolekülen durch die zunehmende Permeabilität der Lungenkapillaren (capillary leak). Adhäsionsmoleküle werden bereits 3 Stunden nach CASP induziert (E- und P-Selektin) und neutrophile Granulozyten werden nachweislich aktiviert und vermehrt in die Lunge rekrutiert. Schon nach 3 Stunden zeichnet sich die in die Lunge eingewanderte Population aus Gr-1⁺ / Mac-1⁺ Leukozyten durch eine gesteigerte Produktion an Oxidantien und Serin-Proteasen aus. Dies geschieht allerdings unabhängig von LPS, TNF α , MIP-2 und KC. Nach 6

Stunden erreicht auch die Population der mononukleären Phagozyten (Mac-3⁺) eine signifikant erhöhte Anzahl [48].

Die Sekretion von Chemokinen in der Lunge infolge abdomineller Sepsis folgt einem scheinbar organspezifischen Muster. Bereits 15 Minuten nach intravenöser Gabe von Endotoxin wurde ein Anstieg von TNF α bei Ratten beobachtet [67]. In Mäuselungen konnte 3 Stunden nach CLP zunächst ein Peak für TNF α nachgewiesen werden. Zudem zeigten sich MIP-1 α und MIP-2 (in der CASP auch KC und IP-10) stark erhöht [63]. Verzögert stiegen dann auch MCP-1 (6h - entsprechend seiner Funktion als Chemoattractant für Monozyten), IP-10 (6h) und KC (18h), nicht aber RANTES [36, 44] an.

IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin bewirkt nach Freisetzung aus T_H2- und B-Lymphozyten, Monozyten und Zellen des Bronchialepithels eine Reduktion der Expression von TNF α , IL-1, IL-12, KC, MIP-1 α , MIP-2, MHC II-Rezeptoren, iNOS und TNF α -Rezeptoren und bremst somit die inflammatorischen Mechanismen wie Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen nachhaltig. Neutralisation von IL-10 führt zu einer erhöhten Mortalität nach CLP [52]. Emmanuilidis et al. konnten zeigen, daß anfänglich hohe und im weiteren Verlauf relativ niedrige Serumspiegel von IL-10 den besten Effekt auf die Abwehr einer Peritonitis haben. Hohe Konzentrationen an IL-10 zu Beginn der Peritonitis könnten notwendig sein, da so eine schädliche, überschießende Zytokinantwort früh gedämpft werden könnte. In der Spätphase der Sepsis hingegen verursachen hohe Spiegel womöglich immunsuppressive Mechanismen und / oder eine Dysbalance zwischen T_H1- und T_H2-Zellen [16, 58, 72, 80].

Im Rahmen einer abdominellen Sepsis kommt es in der **Leber** ebenfalls zu einer Änderung der Zytokinexpression. TNF α wird bei Mäusen sowohl nach LPS-Gabe, als auch nach CLP in der Leber signifikant vermehrt produziert und verbleibt lange Zeit auf dem erhöhten Niveau [29, 39]. Früh nach CLP tritt das IL-8-Analogon KC in der Leber vermehrt auf, das in der Lunge vorherrschende MIP-2 hingegen erscheint erst nach ca. 6 Stunden. Experimente mit anti-KC- und anti-MIP-2-Antikörpern zeigten, dass andere Faktoren in der inflammatorischen Kaskade mit für das septische Leberversagen verantwortlich sind. Die Leberschädigung durch transendotheliale Migration wird durch zytotoxische Produkte wie reaktive Sauerstoffradikale (stimuliert durch KC) und Proteasen verstärkt [44]. Die fortschreitende Leberparenchymschädigung ist verantwortlich für das entstehende Ungleichgewicht der Hämostase mit Mangel an Faktor-XII, Antithrombin III und Protein C sowie

Überschuss an Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), was zur disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG) führen kann.

Die Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α rufen bei systemischer Freisetzung im septischen Patienten eine Akute-Phase-Reaktion hervor, die klinisch mit Hypothermie, Fieber, kataboler Stoffwechsellage und Anorexie einhergehen. Diese proinflammatorischen „endogenen Pyrogene“ zeigen im Rahmen einer Sepsis typischerweise ein zeitlich gestaffeltes Auftreten im Plasma nach Kontakt mit bakteriellem Endotoxin. Einem sehr frühen, bis ca. 2 Stunden selbstlimitierten TNF α -Anstieg schließt sich ein Peak von IL-6 nach ca. 2-4 Stunden an, gefolgt von einer verzögerten IL-1-Antwort. Da eine Sepsis durch bakterielle Peritonitis in der Regel polymikrobiell bedingt ist, fällt die Reaktion dann jedoch weitaus komplexer aus [27]. Mit dem Auftreten der „endogenen Pyrogene“ im Plasma ist eine hypothalamisch ausgelöste Temperaturerhöhung gekoppelt, die als unspezifische Akute-Phase-Reaktion gegen die eingedrungenen Keime wirkt. So verändert eine Erhöhung der Kerntemperatur die Expression weiterer Zytokine und bremst das Wachstum der Bakterien, da die meisten Erreger bei niedrigeren Temperaturen besser wachsen und Mechanismen der adaptiven Immunantwort bei höheren Temperaturen intensiver wirken [28]. Versuche mit IL-6- und TNF α -Knockout-Mäusen, die einer experimentellen, bakteriellen Sepsis ausgesetzt wurden, deuten darauf hin, dass insbesondere IL-6 pyrogene Wirkungen aufweist, TNF α hingegen eine antipyretische Funktion hat. Diese Ergebnisse decken sich mit dem gestaffelten Auftreten von TNF α und IL-6 im Plasma und dem Verlauf der Körperkerntemperatur in Wildtypmäusen, der von einer anfänglichen Hypothermie (TNF α -Peak) in Fieber (IL-6-Peak) übergeht [36]. Das ausgewogene Zusammenspiel der „endogenen Pyrogene“ und die daraus resultierende febrile Kerntemperatur während der bakteriellen Peritonitis sind essentiell für das verbesserte Überleben der Versuchstiere. Ein Mangel an IL-6 oder ein Überschuss an TNF α (v.a. bei Koinkidenz mit INF γ) verursachen eine überschießende inflammatorische Antwort mit potentiell letalem Ausgang [29].

Sepsis oder septischer Schock infolge einer bakteriellen Peritonitis bedeuten einen stark erhöhten Bedarf an immunkompetenten Zellen, der durch stimulierende Zytokine (z.B. IL-3) im **Knochenmark** gesteuert wird. Dieser gesteigerte Bedarf ist bedingt durch einen stark erhöhten Verbrauch an Abwehrzellen durch Phagozytose, Eiterbildung, DIG und Blutverluste [39]. Die Freisetzung zusätzlicher Abwehrzellen

aus dem Knochenmark ist am erhöhten Anteil unreifer Zellstadien im peripheren Blut zu erkennen („Linksverschiebung“). Experimente mit Mäusen zur Analyse der Auswirkungen bakterieller Peritonitis-Sepsis auf Stammzellen im Knochenmark zeigten, dass insbesondere die Vorläuferzellen von Granulozyten und Monozyten (CFU-GM = colony forming units; G = Granulozyten; M = Monozyten) um das zwei- bis dreifache gegenüber den Kontrollen erhöht waren. Noch frühere Zellstadien (CFU-GEMM = colony forming units; G = Granulozyten; E = Erythrozyten, MM = Monozyten und Megakaryozyten, sowie BFU-E = burst forming units der Erythrozyten) hingegen waren nicht signifikant beeinflusst. Weitere Versuche ergaben, dass Stammzellen im Knochenmark nach CASP hypersensibilisiert gegenüber GM-CSF (CSF = colony stimulating factor), nicht jedoch gegenüber G-CSF waren. Die Zytokine $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ induzieren in CFU-E und weiter differenzierten Zellen der GM-Reihe den programmierten Zelltod (Apoptose). Systemisch freigesetzte Zytokine und inflammatorische Mediatoren scheinen somit gezielt CFU-GM zu stimulieren, andererseits gezielt differenziertere Zellen der GM-Reihe sowie CFU-E in die Apoptose zu treiben. Diese selektive Elimination differenzierter immunkompetenter Zellen könnte zu der im Rahmen der Sepsis beobachteten Immunsuppression (Immunparalyse) beitragen [3].

Die protektiven, lokalen Wirkungen von $TNF\alpha$ auf die **Blutzirkulation und Gerinnung** können bei systemischer Freisetzung, insbesondere zusammen mit $IFN\gamma$, katastrophale Folgen für den Organismus haben. Kleine Gefäße werden verschlossen, eine DIG kann sich ausbilden. Zudem kommt es als Ausdruck eines Proteinmangels zu systemischen Ödemen. Ein intravasaler Volumenmangel mit Hypotonie ist die Folge (septischer Schock). Durch die Verbrauchskoagulopathie entstehende Blutungen, multiples Organversagen und septischer Schock können zum Tod des Patienten führen. Mausmutanten mit einem Defekt im $TNF\alpha$ -Rezeptor erleiden keinen septischen Schock, jedoch sind sie aufgrund der fehlenden lokalen Effekte von $TNF\alpha$ nicht in der Lage, eine Entzündung einzudämmen [15, 28].

Die exakten Zusammenhänge der lokalen und systemischen Reaktionen im Rahmen einer abdominellen Sepsis sind noch weitgehend unbekannt und Gegenstand der aktueller Forschung.

1.2.3 Systematik und Funktionen der Zytokine und Chemokine

Die Komplexität der Herkunft der Zytokine und Chemokine, ihrer gezielt gesteuerten Produktion sowie ihrer Auswirkungen auf die verschiedenen Schenkel des Immunsystems unterliegen einem ständigen Erkenntniszugewinn. Nachfolgende Tabellen zeigen zusammengefasst den aktuellen Stand der Forschung auf dem Gebiet der Zytokine und Chemokine.

Überblick über ausgewählte sepsisrelevante Zytokine:

Zytokin	produziert von	Zielzellen	Rezeptor	Wirkungen
IL-1 α & - β	Makrophagen, Monozyten, Epithelzellen	Makrophagen, T-Zellen	CD121a	Fieber, Makrophagen- & T-Zellaktivierung
IL-2	T _H 0, T _H 1	T-Zellen	CD25(α), CD122(β), γ_c	<i>TCGF</i> = T cell growth factor (Aktivierung, Proliferation der T-Zellen)
IL-4	T _H 2-Zellen, Mastzellen	B-, T-Zellen, Makrophagen	CD124, γ_c	Zytokininhibition, TNF-Inhibition, B-Zellaktivierung (<i>BCGF-1</i>)
IL-5	T _H 2-Zellen	T-Zellen, Eosinophile		IL-2-R-Expression, Wachstum & Differenzierung
IL-6	B-, T-Zellen, Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten	B-, T-Zellen, Makrophagen, Hepatozyten	CD126, CD130	Fieber, akute Phase, Wachstum / Differenzierung von B- & T-Zellen
IL-10	T-Zellen, Makrophagen	B-, T-Zellen, Mastzellen, NK-Zellen, Makrophagen	IL-10R	<i>CSIF</i> = <i>Cytokine synthesis inhibitor F</i> , Zytokininhibition

IL-12	B-Zellen, Makrophagen	NK-Zellen, T _H 0-Zellen	IL-12R	<i>NKSF = NK cell stimulat. F.</i> , Polarisation zu T _H 1-Zellen, Aktivierung der zellvermittelten Immunität, Freisetzung von IFN _γ
IL-13	T-Zellen	B-Zellen, Makrophagen	IL-13R, γ _c	Wachstum / Differenzierung hemmt Produktion inflammatorischer Zytokine
IL-18	Makrophagen, dendritische Zellen	T _H 1- & NK-Zellen, Monozyten	IL-18R (Expression IL-12-abhg.)	<i>IGIF = IFN_γ-inducing Factor</i> synergistische Effekte mit IL-12 (z.B. IFN _γ -Produktion)
IFN _γ	B-, T-Zellen, NK-Zellen	B-, T-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen, Granulozyten	CD119	Makrophagenaktivierung, Erhöhung der MHC-Expression, Zytokininduktion, Aktivierung der Phagozytose
TNF _α	T-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen	Makrophagen, Neutrophile, Endothel, hämoopoetische Zellen	p55, p75, CD120a & CD120b	<i>Kachektin</i> ; Fieber, Zytotoxizität, Phagozytose, Endothelaktivierung

Tab. 1.2.3.: Überblick über sepsisrelevante Zytokine

Überblick über die wichtigsten erwähnten Chemokine:

Chemokine werden anhand der Formation zweier Cysteine, die direkt nebeneinander liegen (CC), durch eine (C-X-C) oder drei Aminosäuren voneinander getrennt sind (C-X₃-C) in die entsprechenden Chemokinklassen eingeteilt. Der alleinige Vertreter der C-Chemokine, Lymphotactin besitzt an dieser Stelle nur ein Cystein.

C-X-C (α) Chemokine:

Chemokin	produziert von	Zielzellen	Rezeptor	Wirkungen
IL-8	Makrophagen, T-Zellen	Neutrophile Granulozyten, T-Zellen	CXCR1 / 2	<i>Chemotaxis-Faktor</i> , Aktivierung, Diapedese
IP-10	T-Zellen, Monozyten, Keratinocyten, Fibroblasten, Endothelzellen	T _H 1-Zellen, Monozyten	CXCR3	<i>IFN-γ-inducible protein-10</i> , Aktivierung, Chemotaxis

CC (β) Chemokine:

Chemokin	produziert von	Zielzellen	Rezeptor	Wirkungen
MIP-1 α	Makrophagen	T-Zellen, Monozyten, Eosinophile, DC, NK-Zellen	CCR1 & 5	<i>Macrophage inflammatory protein</i> ; Chemotaxis
RANTES	T-Zellen	T-Zellen, Monozyten, Eosinophile	CCR1,3,5 & 9	Chemotaxis, Aktivierung
Eotaxin	Endothelzellen	Eosinophile, Basophile, T _H 2- Zellen	CCR3	Aktivierung, Degranulation, Chemotaxis
MCP-1	Makrophagen	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen	CCR2	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> ; chemotaktischer Faktor für Monozyten

Tab. 1.2.4.: Überblick über sepsisrelevante Chemokine

1.3 Der CC-Chemokinrezeptor 4 (CCR 4) und seine Liganden TARC und MDC

1.3.1 Der CC-Chemokinrezeptor 4 (CCR4)

Damit Lymphozyten am Ort eines Entzündungsgeschehens ihre Effektorfunktionen entfalten können, müssen sie zunächst in das Entzündungsgebiet gelangen. Dies geschieht sowohl über die bereits beschriebene Expression von VLA-4 und die Adhäsion an das Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) des Gefäßendothels in der entzündeten Region als auch über chemische Konzentrationsgradienten von Chemokinen (Chemoattractants), welche Lymphozyten anlocken. Auf T_H2-Lymphozyten wird charakteristischerweise der Chemokinrezeptor CCR4 exprimiert. Die derzeit einzig bekannten Liganden von CCR4 sind Thymus and activation-regulated chemokine (TARC) und Macrophage derived chemokine (MDC). Der CCR4 ist ein transmembranärer (heptahelikaler), G-Protein-gekoppelter Rezeptor (zu 49% identisch mit CCR1) mit einer extrazellulären Disulfidbrücke, der insbesondere auf CD4-T-Gedächtniszellen und CD4⁺-T_H2-Lymphozyten, aber auch auf NK-Zellen, Monozyten, Neutrophilen und basophilen Granulozyten und Megakaryozyten ausgeprägt ist [2, 19, 47, 55, 78].

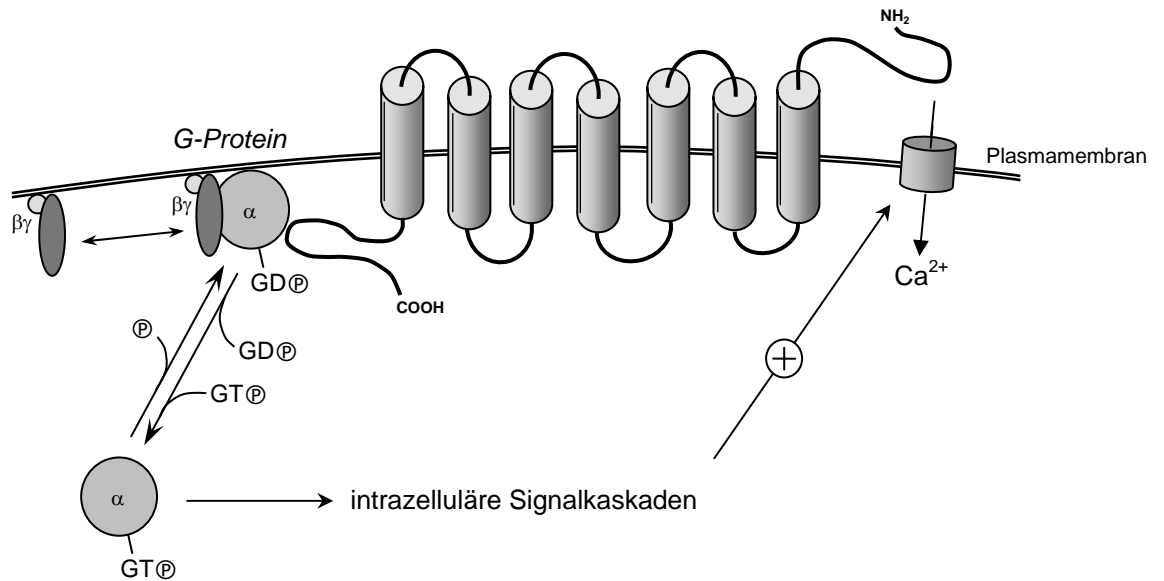


Abb.1.3.1.: Struktur des heptahelikalen, G-Protein-gekoppelten CC-Chemokinrezeptors 4

Nachdem kurz nach der Entdeckung von CCR4 zunächst RANTES, MCP-1 und MIP-1 α als Liganden vermutet wurden, konnte inzwischen mehrfach bewiesen werden, dass nur TARC und MDC spezifisch an CCR4 binden [2, 47, 78]. TARC und MDC lösen in CCR4⁺-Zellen einen messbaren Calcium-Influx aus und rufen eine positive Migrationsantwort der Zellen hervor, die durch monoklonale Antikörper gegen CCR4 (anti-CCR4 mAbs) signifikant unterbunden werden kann [2]. In verschiedenen Studien konnte übereinstimmend nachgewiesen werden, dass CCR4 auf Stimulation mit TGF β hin vermehrt, nach Zugabe von IFN α zu T-Zellen vermindert auf der Zelloberfläche exprimiert wird [8,55]. Der CCR4 wird von vielen Autoren als populationsspezifischer Marker für T_H2-Zellen vorgeschlagen, da er zum einen auf bis zu 95 % bestimmter T_H2-Zellen anzutreffen ist [8] und andererseits die Expression von CCR4 positiv mit der Produktion der T_H2-typischen Zytokine IL-4 und IL-5 assoziiert ist, nicht jedoch mit der von IFN γ , dem T_H1-spezifischen Zytokin [2]. Weiterhin konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Inkubation undifferenzierter T_H-Zellen mit T_H2-spezifischen Zytokinen (z.B. IL-4) zu einer Polarisation zu CCR4⁺-T_H2-Zellen führte [37], die Zugabe von IL-12 jedoch eine T_H1 Antwort begünstigte. Auch die Stimulation des TCR mit anti-CD3 mAbs und anti-CD28 mAbs bedingte eine höhere Dichte der CCR4 auf T_H2-Zellen [11, 37, 47].

So ist der CCR4 nach dem aktuellen Stand der Forschung ein v.a. auf systemisch zirkulierenden CD4-T-Gedächtniszellen und T_H2-Effektorzellen exprimierter Homing-Rezeptor, der über Konzentrationsgradienten seiner spezifischen Liganden TARC und

MDC die gezielte regionale Rekrutierung dieser Zellen in Entzündungsregionen gewährleistet [8].

1.3.2 Thymus and activation-regulated chemokine (TARC)

Der als erstes dem CCR4 zugeordnete Ligand war TARC (CCL17). TARC ist ein auf dem Chromosom 16q13 codiertes Protein, das konstitutiv im Thymus exprimiert wird, in deutlich geringeren Mengen in Lunge, Colon, Dünndarm und praktisch nicht in der Leber [77, 78]. Als produzierende Zellen sind bis heute Thymuszellen, periphere mononukleäre Blutzellen, CD4⁺-Zellen, APC (Makrophagen und dendritische Zellen), Bronchialepithel- und vaskuläre Endothelzellen genannt worden [2, 56, 77, 78]. TARC ist Agonist am CCR4 und am hochgradig homologen CCR8, der als ein Marker für frisch aktivierte T_H2-Zellen gilt [11, 26]. Endothelzellen im Entzündungsgebiet exprimieren TARC. Dieses löst über CCR4 eine intrazelluläre Calciumerhöhung in T_H2-Zellen aus, worauf diese mit dem Gefäßendothel in Interaktion treten (Integrin-abhängige Adhäsion) [8, 41] und chemotaktisch in den Entzündungsherd gesteuert werden [55, 77]. Die Produktion von TARC scheint durch die gleichzeitige Anwesenheit von TNF α und IL-4 (verstärkt durch IFN- γ) z.B. in Bronchialepithelzellen [56] nachweislich erhöht. Dies kann als Gegenspieler einer überschießenden T_H1-Antwort angesehen werden, denn mit Erhöhung der Konzentrationen der T_H1-spezifischen Zytokine TNF α und IFN γ werden über eine Sekretion von TARC CCR4⁺-T_H2-Zellen angelockt, um das Gleichgewicht wieder herzustellen. Experimente zur Migrationsbeobachtung in einem bakteriellen Hepatitismodell in der Maus mit anti-TARC mAbs bestätigten die verminderte Einwanderung von T_H2-Zellen durch lokal niedrige IL-4-Spiegel (T_H2) und relativ erhöhte IFN γ -Spiegel (T_H1) [77].

1.3.3 Macrophage-derived chemokine (MDC)

Der zweite bekannte Ligand des CCR4 ist das MDC (CCL22, STCP-1 = stimulated T cell chemotactic protein), das ebenfalls auf dem humanen Chromosom 16q13 codiert ist und zu 32% die gleiche Aminosäuresequenz wie TARC aufweist. Zunächst wurde lediglich eine konstitutive Produktion von MDC durch Makrophagen, dendritische Zellen, lymphatische Organe (Thymus, Milz, Lymphknoten) und Dünndarm vermutet

und damit die Hauptaufgabe von MDC in der Reifung und Differenzierung von CCR4⁺-Thymozyten gesehen. Jedoch konnte durch unabhängige Arbeitsgruppen nachgewiesen werden, dass MDC sowohl komplex reguliert als auch induziert werden kann. Insbesondere LPS, IL-1, TNF α , IL-4 und IL-13 stimulieren die Produktion von MDC, wohingegen IFN γ und nach TCR-Stimulation auch IL-12 (aber nicht das synergistisch wirkende IL-18) und IFN α hemmende Wirkungen haben [2, 24, 25, 41, 54, 56].

MDC löst wie TARC einen Calciumeinstrom in CCR4⁺-Zellen aus. Die Affinität von MDC zum CCR4 ist aber deutlich höher als die von TARC, so dass letzteres kompetitiv vom Rezeptor verdrängt werden kann. Auch in der Migrationswirkung auf CCR4⁺-Zellen (z.B. T_H2 und T_C2) wirkt MDC signifikant stärker als TARC [25]. Da mit den einwandernden T_H2-Lymphozyten das Zytokinmuster in Richtung IL-4 und IL-13 verschoben wird, ist der Kreis zu einem „amplification loop“ der CCR4⁺-Zellen geschlossen, der experimentell mit anti-MDC mAbs abgeschwächt werden kann (TARC wirkt pro-migratorisch) [37, 41, 77].

T_H2-Lymphozyten produzieren nach Stimulation des TCR mit anti-CD3- und anti-CD28 mAbs TARC. Sowohl T_H1- als auch T_H2-Lymphozyten antworten auf dieselbe Stimulation mit MDC-Sekretion. Somit wird die Komplexität und Sensibilität der Balance zwischen T_H1- und T_H2-Effektorzellen deutlich. Das Ziel ist eine effektive Abwehr zu garantieren, ohne dabei eine überschießende Immunantwort (T_H1-Polarisation) mit Schaden für den eigenen Organismus zu riskieren [24, 25].

Der CC-Chemokinrezeptor 4 und seine beiden Liganden TARC und MDC nehmen in der Systematik der Chemokine somit nicht nur aufgrund ihrer gemeinsamen Codierung auf dem Chromosom 16 eine besondere Stellung ein, sondern wecken auch mit ihrem Expressionsmuster, ihrer Rezeptorutilisation und komplexen immunologischen Funktion das Interesse der aktuellen Forschung auf diesem Gebiet.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Der laufende Zugewinn an Erkenntnissen über die Steuerung der immunologischen Abwehrmechanismen eines Organismus im Rahmen septischer Geschehen eröffnet die Möglichkeit, dieses Wissen in Zukunft in der Therapie anzuwenden. Verschiedene Methoden wurden bisher angewendet, um die Wirkung einzelner Elemente der Abwehr oder deren Fehlen auf die Immunantwort zu untersuchen. Neben der Ausschaltung des gewählten Antigens durch monoklonale, selektiv gerichtete Antikörper werden in zunehmendem Maße auch genetisch veränderte Versuchstiere eingesetzt.

Die Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) ist eine standardisierte operative Methode zur in vivo Simulation einer Anastomoseninsuffizienz nach Colonoperation in der Maus. Die Maus gerät in eine polymikrobielle Peritonitis mit nachfolgender Sepsis. Blut bzw. Serum, Organe und Peritoneallavage sind für in vitro Experimente leicht zugänglich.

Der CC-Chemokinrezeptor 4 (CCR4) konnte durch die Arbeitsgruppe von Y. Chvatchko [10] in Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund gezielt ausgeschaltet werden. Diese homozygot CCR4-negativen Mäuse sollten in der vorliegenden Arbeit mittels CASP umfassend auf ihr Verhalten in der Sepsis hin untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 *In vivo Methoden*

2.1.1 Genehmigung der Versuche, Versuchstiere und Tierhaltung

Die Tierversuche waren gemäß § 8a des Tierschutzgesetzes von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern) unter dem Aktenzeichen 211-2531-27/00 zuvor genehmigt worden.

Für die durchgeführten Versuche wurden weibliche Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen (Gewicht: 20 – 25g) verwendet. Die Mäuse vom Inzuchtstamm C57BL/6 (als Wildtyp) wurden von Harlan-Winkelmann und Charles River bezogen, die CCR4/-Mäuse (C57BL/6-Hintergrund) stammten aus eigener Zucht. Die Tiere wurden in einzelbelüfteten Macrolonkäfigen (Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) auf Einstreu bei Preßfutter (Altromin 1324 Standard-Diät, Lage, Deutschland) und angesäuertem Wasser ad libitum im Tierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Technischen Universität München, Klinikum Rechts der Isar, gehalten.

Alle Versuche wurden unter Einhaltung der deutschen Tierschutzverordnung durchgeführt.

2.1.2 Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) – Operation in der Maus

Die Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) [79] ist ein 1997 von N. Zantl et al. erstmals vorgestelltes operatives Verfahren, um eine bakterielle Peritonitis und Sepsis in der Maus zu induzieren. Um das postoperative Problem der Anastomoseninsuffizienz nach abdominalchirurgischen Eingriffen möglichst realistisch im Tiermodell zu simulieren, wird in das Colon ascendens ein Stent variablen Lumens so eingebracht, dass eine Verbindung zwischen Darmlumen und Bauchhöhle entsteht. Durch diese Öffnung tritt Darminhalt aus, was einen septischen Fokus darstellt. Mit zunehmendem Durchmesser des Stents verkürzt sich das Intervall bis zur Peritonitis und Sepsis und die Letalität bis 48 Stunden nach CASP steigt [80].

Stentgröße (G)	Letalität im Wildtyp (%)
22	38
18	64
16	95
14	100

Tab. 2.1.1. Letalität und Todeszeitpunkt nach CASP in Abhängigkeit von der Stentgröße im Wildtyp (C57BL/6) [80]

Gegenüber den einfacheren und weit verbreiteten Sepsismodellen wie intraperitonealer Injektion von Bakterien oder Lipopolysaccharid (LPS) bietet die CASP den Vorteil der viel realitätsnäheren Simulation einer Anastomoseninsuffizienz mit Austritt von Darminhalt in die Peritonealhöhle.

Bei der CLP-Operation [73] (Cecal Ligation and Puncture) wird nach vollständiger Ligatur des Zökums mit einer Nadel definierten Durchmessers eingestochen. Es bildet sich eine lokale Abszessformation, die erfolgreich abgekapselt wird (Überleben) oder rupturiert und so zum Tod im septischen Schock führt. Im Gegensatz dazu kommt es nach CASP zu einer diffusen Peritonitis, was eher dem Verlauf einer Anastomoseninsuffizienz nach abdominalchirurgischen Eingriffen entspricht [64].

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) als Operation zur Erzeugung einer Sepsis in der Maus gewählt. Als Stentgröße erschien ein Durchmesser von 16G aufgrund der zu erwartenden Mortalität von 95% und einer Überlebenszeit zwischen 18 und 48 Stunden am geeignetsten, um einen eventuellen Überlebensvorteil durch den Knockout des CCR4 zu zeigen.

2.1.2.1 Anästhesie und Narkose

Zur intraoperativen Anästhesie und Narkose wurde Diethylether (Hoechst, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Die Maus wird dazu in ein Gefäß gesetzt, auf dessen Boden sich eine mit Äther getränkte Kompresse befindet. Nach ca. 1 Minute tritt Bewusstlosigkeit ein. Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie atmet die Maus ein Äther-Luft-Gemisch aus einem 10 ml Zentrifugenröhrchen ein, auf dessen Boden sich ebenfalls eine mit Äther getränkte Kompresse befindet. Die Narkosetiefe wird anhand der Bewegung der Schnurrbarthaare überwacht und durch Variation der Entfernung

des Röhrchens von der Nasenspitze der Maus gesteuert. Nach Abschluss des Eingriffs wird das Röhrchen entfernt. Die Maus erwacht nach durchschnittlich 5 Minuten und beginnt rasch wieder mit der Nahrungsaufnahme und Körperpflege.

Zur postoperativen Schmerzfreiheit erhält die Maus Buprenorphin 0,1 mg/kg/Tag intramuskulär.

2.1.2.2 CASP – Operationsvorbereitungen, Instrumentarium und Material

Operationsunterlage, technische Ausstattung:

- in Plastikfolie eingeschweißte Korkplatte (ca. 25 x 20 cm)
- vier Klebestreifen (Leukosilk[®], 12mm, Beiersdorf AG Hamburg, Deutschland) zur Fixierung der auf dem Rücken liegenden, narkotisierten Maus an den Extremitäten
- Operationslampe
- Lupenbrille (dreifache Vergrößerung)

Operationsbesteck:

- Schere, Nadelhalter, gerade Pinzette und sterile Wattestäbchen

Nahtmaterial:

- 5/0 Faden für die Bauchnaht (Ethilon schwarz monofil 5/0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- 7/0 Faden für die Stent-Annaht (Ethilon schwarz monofil 7/0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)

Stent:

- Venenverweilkatheter der Grösse 16 G (Venflon, BOC, Ohmeda AB, Schweden)
- der Kunststoff des Venenverweilkatheters wird 3 mm hinter der Spitze mit dem Skalpell eingekerbt und 1 mm darüber zirkulär so eingeritzt, dass an dieser Stelle nur noch ein dünner Plastikmantel den Mandrin umgibt

2.1.2.3 16G CASP

1.) Eröffnung des Abdomens, Darstellung des ileozökalen Übergangs

Nach der Hautdesinfektion (Cutasept®F, farblos, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) wird das Abdomen durch eine mediane Laparotomie entlang der Linea alba auf einer Länge von ca. 1 cm eröffnet.

Mittels zweier Wattestäbchen wird der Darm im Bereich des ileozökalen Übergangs aus der Bauchhöhle heraus nach rechts luxiert. Mittels zweier tangentialer Stiche (7/0 Faden) und Verknötung wird die Annaht des Stents am Colon ascendens vorbereitet.

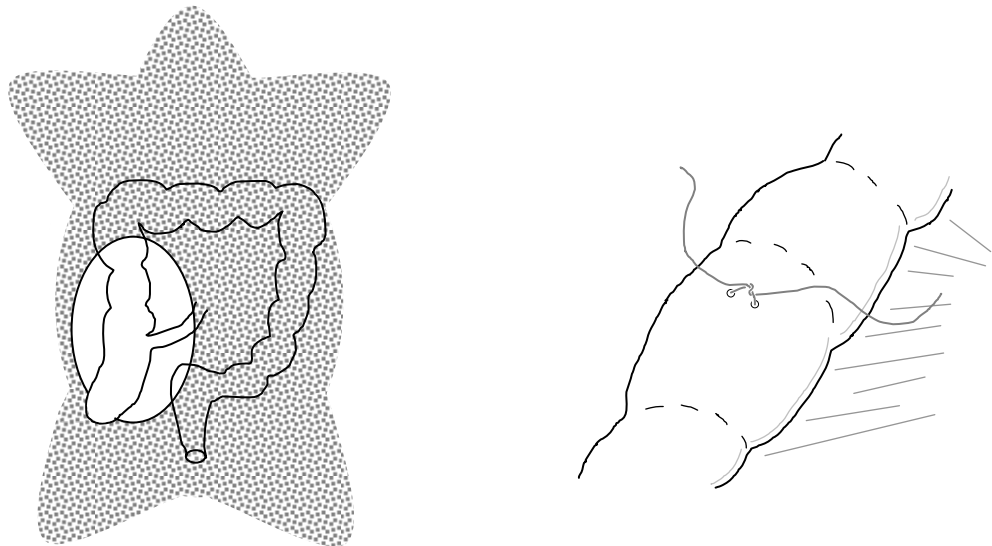


Abb. 2.1.1. Eröffnung des Abdomens, Darstellung des ileozökalen Übergangs und Vorbereitung der Stent-Annaht mit 7/0 Faden

2.) Implantation des Stents in das Colon ascendens

Der vorbereitete 16G-Venenverweilkatheter wird ca. 10 mm aboral der Ileozökalklappe antimesenterial in das Darmlumen eingestochen, bis die Kerbe in das Niveau der Serosa gelangt. Der zwischen Darmwand und zirkulärer Markierung gelegene Anteil des Venenverweilkatheters wird mit dem vorgelegten Faden fixiert. Anschließend wird der Mandrin aus dem Stent gezogen und das verbleibende Kunststoffröhrchen an der zirkulären Markierung durchtrennt. Der Stent sollte nun senkrecht zur Darmwand stehen und diese um ca. 1 mm überragen. Durch sanften

Druck auf das Zökum mit zwei Wattestäbchen wird durch den Stent Stuhl exprimiert und so die Durchgängigkeit des Stents überprüft.

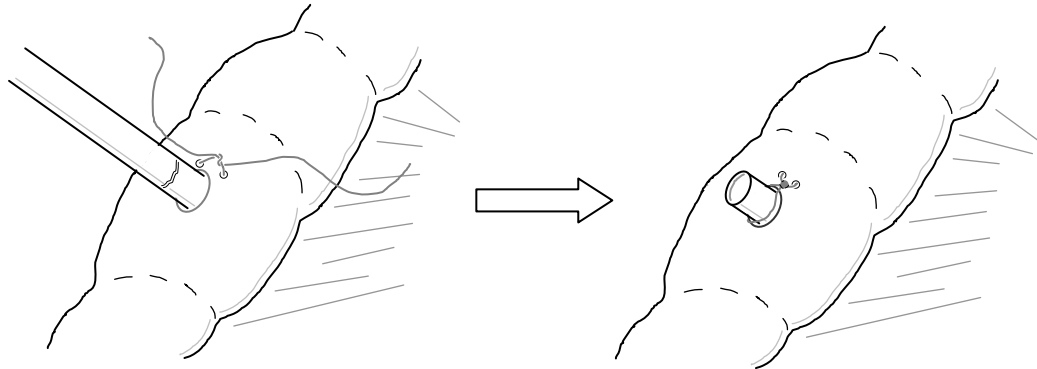


Abb. 2.1.2. Implantation des Stents in das Colon ascendens

3.) Verschluss des Abdomens, Wundversorgung

Nach Reposition des Darms erfolgt eine intraperitoneale Gabe von 0,5 ml steriler, pyrogenfreier Kochsalzlösung (0,9% NaCl), um perioperative Flüssigkeitsverluste zu kompensieren. Anschließend fortlaufender Verschluss von Bauchwand und Haut mit 5/0 Faden.

4.) Postoperative Versorgung

Nach Abschluss der OP wird das Diethyletherröhrchen entfernt und die Maus für 10 min unter eine Wärmelampe gesetzt. Sie läuft in der Regel nach ca. 15 min im Käfig umher, beginnt sich zu putzen und setzt die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme fort.

2.1.2.4 Chirurgische Intervention nach 16G CASP (16G CASPI)

In der Abdominalchirurgie wird bei einer Anastomoseninsuffizienz in Abhängigkeit von deren Ausmaß, der Klinik des Patienten und dem Sepsisverlauf eine Relaparotomie zur Herdsanierung durchgeführt.

Im CASP-Modell kann eine solche Intervention durch die sog. CASPI simuliert werden. 5 Stunden nach CASP wird die Maus relaparotomiert. Dabei wird der Stent einschließlich der Nähte entfernt und die Darmperforation mit einer Tabaksbeutelnaht (Ethilon schwarz monofil 10/0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)

verschlossen. Die Bauchhöhle wird mit 10 ml steriler, pyrogenfreier Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gespült (Peritoneallavage), um Stuhl, Bakterien und Exsudate der Peritonitis zu beseitigen. Anschliessend erfolgt der Wundverschluss wie bei der CASP-Operation.

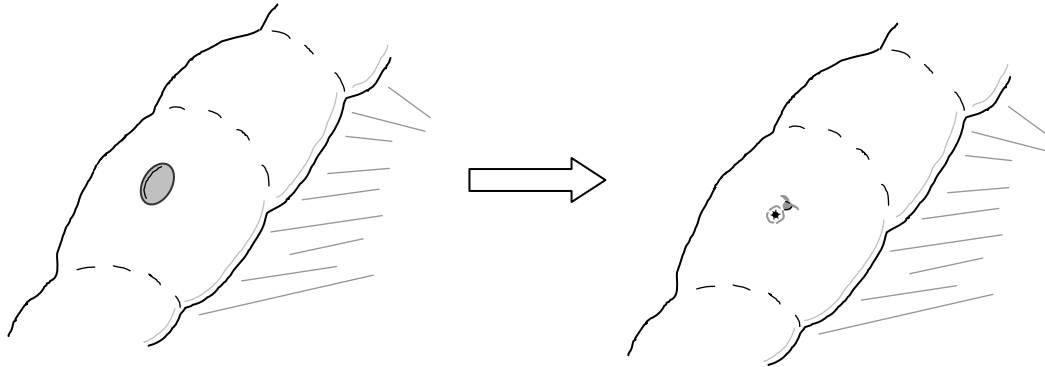


Abb.: 2.1.3. Verschluss des Loches in der Darmwand mittels Tabaksbeutelnaht in der Interventionsoperation bei CASPI

2.1.2.5 Schein-Operation zu Kontrollzwecken (sham CASP)

Um Veränderungen der Bakterienkonzentrationen in der Peritoneallavage und der qualitativen und quantitativen Ausschüttung von Zytokinen durch das reine Operationstrauma (Haut, Bauchwand, luxierter Darm, Stent als Fremdkörper, Verunreinigungen von Material und Instrumentarium) von den ausschließlich durch die CASP-Operation hervorgerufenen Veränderungen abgrenzen zu können, wurde die sham CASP durchgeführt.

Diese Operation folgt dem selben Ablauf wie die CASP, wobei der Stent lediglich antimesenterial am Colon ascendens angenäht wird. Die Integrität des Colon bleibt dabei erhalten, d.h. das Darmlumen wird nicht eröffnet. Demnach besteht nach der sham CASP *keine* Verbindung zwischen Darmlumen und Peritonealhöhle; eine Peritonitis mit anschließender Sepsis wird nicht induziert.

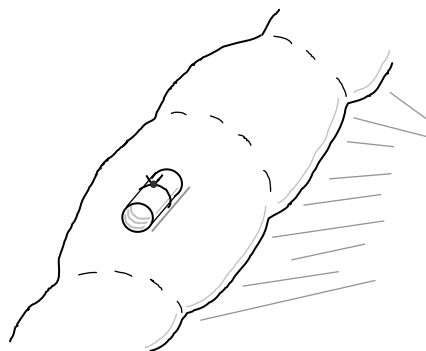


Abb. 2.1.4. Lage des Stents bei der sham CASP

2.1.2.6 Postoperative Überwachung und Dokumentation

In den ersten 48 Stunden nach CASP bzw. CASPI werden die Versuchstiere im Abstand von 4 Stunden kontrolliert, für weitere 14 Tage dann im Abstand von 8 Stunden.

Zur Dokumentation des Sepsisausmaßes wurde übereinstimmend mit geltenden Tierschutzbestimmungen von Zantl et al. ein Untersuchungsschema erstellt. Dabei wurden die in Tab. 2.1.2. aufgelisteten Parameter berücksichtigt, mit Punkten bewertet und die Summe gebildet. Wurde in mindestens zwei Parametern der Wert 3 erreicht, so wurden alle 3-Punkte-Werte mit 4 Punkten bewertet. Bei Summen über 12 Punkten wurde ein letaler Ausgang angenommen und das Tier schmerzfrei getötet.

Parameter	Untersuchung	Bewertung	Punkte
Erscheinungsbild	Inspektion	- normal, sauber gepflegtes Fell	0
		- gesträubtes Fell	1
		- nasses Fell	2
		- schleimige Augen	3
Atmung	Inspektion	- normal	0
		- beschleunigt	1
		- schwer	2
		- schwach	3
Gewichtsverlust	Waage	<5%	0
		<15%	1
		<20 %	2
		>20%	3
Spontanverhalten	Beobachtung	- normal, lebhaft, neugierig	0
		- verlangsamt, sitzende Haltung	1
		- träge, buckelige Haltung, schwankender Gang	2
		- Seitenlage	3
Provoziertes Verhalten	Beobachtung	- Maus flieht bei Käfigöffnung	0
		- flieht bei Annäherung der Hand	1
		- flieht erst bei Berührung	2
		- flieht gar nicht	3
Palpation des Abdomens	Palpation	- weich, kein Druckschmerz	0
		- weich, geringe Schmerzreaktion	1
		- Resistenz, deutliche Reaktion	2
		- hart, deutliche Schmerzreaktion	3

Kotbeschaffenheit	Inspektion	- viel Kot im Käfig, koten während Untersuchung	0
		- viel blutiger, schleimiger Kot	1
		- wenig Kot im Käfig	2
		- kein frischer Kot im Käfig	3

Tab. 2.1.2. Untersuchungsparameter und deren Bewertung in der Sepsis der Maus

Die Todeszeitpunkte in Stunden nach der 16G CASP-Operation wurden in einer Kaplan-Meier-Kurve (Überlebenskurve) vermerkt.

2.1.2.7 Versuchsguppen

Als Kontrollgruppe fungierten weibliche, 8 bis 10 Wochen alte C57BL/6 Mäuse (CCR4+/+). Es wurde sowohl die 16 G CASP, als auch die 16 G CASPI zunächst in der Wildtypmaus, dann in der CCR4-/- Maus durchgeführt. Die sham CASP wurde nur im Wildtyp operiert.

Folgende Versuchsgruppen wurden operiert:

Genotyp	Anzahl	Operation	Verwendung
CCR4+/+	20	16G CASP	Kinetik
	4	16G sham	Kinetik
	19	16G CASPI	Kinetik
CCR4-/-	20	16G CASP	Kinetik
	18	16G CASPI	Kinetik

Tab. 2.1.3. Operierte Versuchsgruppen für Kinetik

Genotyp	Anzahl	Operation	Verwendung
CCR4+/+	12	16G CASP	Organentnahme nach 3 h
	12		Organentnahme nach 6 h
	12		Organentnahme nach 12 h
	12		Organentnahme nach 20 h
	4	16G sham	Organentnahme nach 3 h
	4	CASP	Organentnahme nach 6 h
	4		Organentnahme nach 12 h
CCR4-/-	8	16G CASP	Organentnahme nach 3 h
	8		Organentnahme nach 6 h
	8		Organentnahme nach 12 h
	8		Organentnahme nach 20 h

Tab. 2.1.4. Operierte Versuchsgruppen für Organentnahme

2.2 Entnahme von Untersuchungsmaterialien aus Versuchstieren

2.2.1 Peritoneallavage in der Maus

Um quantitative Aussagen über den Bakteriengehalt in der Bauchhöhle des Versuchstieres nach CASP zu erhalten, wurde eine Peritoneallavage durchgeführt. Die Maus wird hierfür mit CO₂ in einem gasdichten Spezialkäfig schmerzlos euthanasiert und mit Klebestreifen an Vorder- und Hinterbeinen auf dem Operationsbrett fixiert. Über eine 18G Kanüle werden 4 ml aus einer mit 10 ml steriler PBS-Lösung gefüllten Spritze durch die Bauchwand in die Bauchhöhle im Wechsel 3 mal eingespritzt und anschließend wieder aspiriert. Bis zur weiteren Verarbeitung des gewonnenen Materials wurde die Peritoneallavage auf Eis in einer Kühlbox gelagert.

2.2.2 Serumgewinnung von der Maus

Zur Serumgewinnung erfolgt nach Euthanasie durch CO₂ die mediane Laparotomie vom Xiphoid bis zur Symphyse. Anschließend wird der Darm nach rechts aus dem Abdomen herausluxiert. Dies ermöglicht einen freien Zugang zur retroperitoneal gelegenen Vena cava, die nach Durchtrennung des Peritoneums mit einer heparinisierten Insulinspritze punktiert wird. Durch vorsichtige Aspiration können so bis zu 0,6ml Blut gewonnen werden. Bis zur weiteren Verarbeitung wird das so gewonnene Blut auf Eis gelagert, anschließend in kleine Serumröhrchen überführt und bei 13.000 U min⁻¹ für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand im Röhrchen entspricht dem Serum, welches abgezogen und in ein frisches Eppendorf-Cup überführt werden kann. Das Serum wird bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.3 Organentnahmen (Lunge, Leber, Milz und Nieren)

Nach Euthanasie, Peritoneallavage und Gewinnung von Blut wird das median eröffnete Abdomen zur besseren Übersicht vorsichtig mittels zweier Stecknadeln aufgespannt. Der Thorax wird mit je einem lateral angesetzten Schnitt von diaphragmal nach cranial durch die Haut und die Rippen so eröffnet, dass er im folgenden Schritt mittels eines Nadelhalters am Processus xiphoideus sterni nach cranial über den Kopf hin aufgeklappt werden kann. So entsteht ein freier Zugang zu

Lunge, Trachea, Herz, Aorta und Thymus. Anschließend erfolgt die Organentnahme in der beschriebenen Art und Weise:

Lunge: Mit einer 10ml Spritze (Kanüle: 22G) mit 0,9%iger Kochsalzlösung wird der rechte Herzventrikel punktiert und mit hohem Druck die Lungenblutleiter gespült, was sich an deren Entfärbung von rosa nach weiß und einer massiven Aufblähung erkennen lässt. Anschließend werden die beiden Lungenflügel am Hilus abgetrennt, in ein RNase-freies Eppendorf-Cup gegeben und sofort in bereitgestelltem flüssigen Stickstoff schockgefroren.

Leber: Die Gallenblase wird vorsichtig von der Leberunterkante gelöst, die vier Leberlappen einzeln entnommen und auf vier RNase-freie Eppendorf-Cups verteilt in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Milz: Die Milz wird mit der Pinzette nach medial gezogen, am Hilus abgetrennt und dann ebenfalls in einem RNase-freien Eppendorf-Cup schockgefroren.

Nieren: Die Nieren werden von der jeweils cranial aufsitzenden Nebenniere getrennt, aus der umgebenden Kapsel gelöst und hilusnah ohne Gefäßstiel und Ureter abgesetzt. Beide Organe werden in je ein RNase-freies Eppendorf-Cup gegeben und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die auf diese Weise entnommenen Organe wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

2.3 In vitro Methoden

2.3.1 Bakteriologische Untersuchung der Peritoneallavage

Von der Peritoneallavage wurden Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 mit PBS-Lösung angelegt und davon dann 10 µl mit einem sterilisierten Glasspatel auf Blutagarplatten (Columbia, 5% Schafsblut) ausgestrichen. Nach Bebrütung der Kulturplatten für 24 Stunden bei 37°C wurden die Bakterienkolonien ausgezählt, mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und die Ergebnisse als KBE / ml (= koloniebildende Einheiten pro ml) erfasst.

2.3.2 Bakteriologische Untersuchung der Organe

Die 20 Stunden nach CASP entnommenen Organe wurden mit einem Pürierstab einzeln zerkleinert und mit 1,5 ml Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Das Blut wurde direkt im Verhältnis 1:10 verdünnt. Jeweils 10 µl der Suspension wurde mit einem sterilisierten Glasspatel auf Blutagarplatten (Columbia, 5% Schafsblut) aufgetragen. Nach Bebrütung der Platten für ebenfalls 24 Stunden bei 37°C wurden die KBE wie oben beschrieben ausgezählt.

2.3.3 Serum- und Organ-ELISAs

Die im Rahmen einer Sepsis im Serum und in einzelnen Organen ansteigenden Zytokinkonzentrationen wurden nach der quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik mittels ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) erfaßt. Dabei wurde eine mit hochaffinen und spezifisch gegen das gesuchte Molekül gerichteten Antikörpern beschichtete 96 well-Mikrotiterplatte eingesetzt. Diese gebundenen, immobilisierten Antikörper binden nach Zugabe der Probe die darin enthaltenen, gesuchten Moleküle vollständig (Antigen-Antikörperreaktion) und verhindern so im nachfolgenden Waschschrift, dass diese mit den übrigen, nicht gebundenen Probenbestandteilen entfernt werden. Im nächsten Schritt wird ein zweiter, mit einem Enzym bestückter und spezifisch gegen das gesuchte Molekül gerichteter Antikörper hinzugesetzt, der an die vom ersten Antikörper gebundenen Moleküle anhaftet. Das Molekül befindet sich nun zwischen zwei Antikörpern („Sandwich“). Durch einen erneuten Waschschrift werden alle nicht gebundenen


zweiten Antikörper entfernt. Wird nun ein Substrat, welches von dem am zweiten Antikörper gebundenen Enzym zu einem Farbstoff umgesetzt werden kann, zugegeben, so ist die bis zur Stoppreaktion entstandene Farbintensität proportional zur Menge des gesuchten Moleküls in der eingesetzten Probe [35].

2.3.3.1 Verwendete Materialien für Serum- und Organ-ELISAs

- IL-10, IL-12 p40, TNF α und IFN γ :
Quantikine[®]M, Mouse Immunoassay, Catalog Number M1000, M1240 bzw. MTA00, R&D Systems, Inc., 614 McKinley Place N.E., Minneapolis, Mn 55413, USA, <http://www.rndsystems.com>
- IL-18:
mouseIL-18 ELISA Kit, Code.No. 7625, MBL Medical & Biological Laboratories CO., LTD, 5-10 Marunouchi 3 chrome, Nakaku Nagoya 460-0002 Japan, <http://www.mbl.co.jp>

2.3.3.2 Protokoll des ELISA

- Aufbereitung der entnommenen Lebern und Milzen (jeweils 100mg) durch Zugabe von 100 μ l Protease-Inhibitor (10x konzentriert; Roche # 1836153) und 900 μ l PBS. Pürieren der Organe in einem Eppendorfgesäß, kurzes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes kurzes Auftauen im heißen Wasserbad. Zentrifugation bei 10.000 min⁻¹ und 4°C für 20 min. Der Überstand kann unverdünnt für die Organ-ELISAs eingesetzt werden.
- Verdünnung der Serumproben mit dem jeweils vorgegebenen Diluent (IL-10: 1:10, TNF α : 1:2, IL-12p40: 1:2, IL-18: 1:5)
- Vorbereitung des jeweiligen Standards in einer Verdünnungsreihe mit dem entsprechenden Diluent
- Beschicken der Mikrotiterplatte mit den von den Herstellern empfohlenen Standardverdünnungen und den Proben (100 μ l) in je ein Well
- Versiegelung der Mikrotiterplatte mit Klebefolie und Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Mikrotiterplatten-Shaker

- 1. Waschschrift im Autowasher
Waschpuffer und Waschprogramm:
 - IL-10, IL-12p40, TNF α und IFN γ : 5 x 400 μ l R&D-Wash Buffer
 - IL-18: 4 x 300 μ l MBL-Washing buffer
- Zugabe von 100 μ l Conjugate (zweiter Antikörper) in jedes Well, Versiegelung der Mikrotiterplatte mit Klebefolie und Inkubation für 2 Stunden (IL-18: 1 Stunde) bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Mikrotiterplatten-Shaker
- 2. Waschschrift im Autowasher wie unter 1.
- Zugabe von 100 μ l Substrat in jedes Well, Versiegelung der Mikrotiterplatte mit Klebefolie und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Shaker
- Unterbrechung der Farbreaktion durch Zugabe von 100 μ l Stop Solution in jedes Well
- Messung der optischen Dichte der einzelnen Wells im Photometer bei $\lambda = 450$ nm und bei $\lambda = 620$ nm als Referenz
- Auswertung der Messwerte und Ermittlung einer Standardkurve aus den Werten der Standardverdünnungsreihe (Molecular Dynamics XperimentTM), daraus Errechnung der Molekülkonzentrationen (pg / ml) in den eingesetzten Proben
- Multiplikation der Probenmesswerte mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor
- Bestimmung des Gesamteiweißes für die Organ-ELISAs durch photometrische Messung der Absorption bei 550nm nach Zugabe von 1ml BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Prod  3221 und 23224) zu 20 μ l Probe bzw. zur BSA-Standardreihe (Bovines Serum Albumin, Sigma) und Inkubation für 1 Stunde bei 37°C.

2.3.4 Durchflußzytometrie (FACS) – Analyse der Peritoneallavage

Mit Hilfe einer FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorter) wurde die gewonnene Peritoneallavage auf die Anzahl und Art von eingewanderten Zellen sowie deren Aktivierung hin untersucht. Die Peritoneallavage wurde dazu zentrifugiert und das Pellet aus Zellen mit Erythrozytolyspuffer (9 Vol.T. 0,83% NH₄Cl, 1 Vol.T. Tris (594 g/l), pH mit HCl auf 7,2 eingestellt, 10-fach konzentriert) und FACS-Puffer (PBS, 0,01% Natriumazid, 2% FCS und EDTA 1mM) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml FACS-Puffer gelöst. 30µl davon wurden mit Eosin gefärbt um in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu ermitteln. Die Zellsuspension wurde dann gleichmäßig auf je 4 FACS-Röhrchen verteilt und zentrifugiert, so dass die Zellen wiederum als Pellet vorlagen. Die anschließenden Färbungen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern erfolgte nach unten stehendem Schema. Durch Zugabe von kaltem FACS-Puffer und einem nachfolgenden Waschschrift wurde die Färbung gestoppt. Zur Fixierung der gefärbten Zellen wurden diese mit PBS und Formalin 4% versetzt und nach Zentrifugation und Absaugen des Überstands in 200µl FACS-Puffer resuspendiert. Bis zur Vermessung im FACS-Gerät wurden die Zellen bei 4°C gelagert.

Die Untersuchung der gefärbten Zellen im FACS-Gerät (FACSCalibur™, Beckton-Dickinson) beruht auf folgendem Prinzip:

Die mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern besetzten Zellen werden vom Zytrofluorographen in einer laminaren Strömung durch eine Messkammer gesaugt, in der sie im Idealfall einzeln von einem Laserlicht bestrahlt werden. Verschiedene Detektoren, die Lichtverstärkern und Prismen nachgeschaltet sind, erlauben es, die Zelle nach relativer Zellgröße (FSC = forward scatter / Vorwärtsstreulicht), relativer Granulierung (SSC = sideward scatter / Seitwärtsstreulicht) und Fluoreszenz der jeweils zugegebenen antigenspezifischen Fluorochrom-markierten Antikörper (z.B. rot = PE; blau = APC; grün = Fitc) einer Zellpopulation zuzuordnen [4, 65].

Verwendete Fluorochrome:

PE	= Phycoerythrin:	Anregung: 488nm, Emission: 576nm
APC	= Allophycocyanin:	Anregung: 595-640nm, Emission: 660nm
Fitc	= Fluoresceinisothiozyanat:	Anregung: 488nm, Emission: 525nm

Verwendete Antikörper:

- F_c*-Block: spezifischer Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop des *F_cγR_{III}*-Rezeptors, verhindert nicht-Antigen-spezifische Bindung von Immunglobulinen an den *F_cγR_{III}*-Rezeptor auf u.a. Granulozyten (BD Biosciences, 2.4G2, Cat. No. 01241D, Verdünnung 1:100)
- Anti-Gr1-*PE*: spezifischer Antikörper gegen Gr1 (= Ly-6G) auf Granulozyten (BD Biosciences, RB6-8C5, Cat. No. 01215A, Verdünnung 1:300, PE-markiert)
- Anti-Mac-1-*APC*: spezifischer Antikörper gegen CD11b/CD18 (=Mac-1, Komplementrezeptor 3, LFA-1 $\alpha_M\beta_2$) auf u.a. Granulozyten (BD Biosciences, M1/70, Cat. No. 01719A, Verdünnung 1: 300, APC-markiert)
- Anti-IgG-*Fitc*: spezifischer Antikörper gegen ein Epitop in der CH3-Domäne von IgG_{2b}, dient als Kontrolle der Färbung mit Anti-*F_cγR_{III}*-*Fitc* (BD Biosciences, R12-3, Cat. No. 02034D, Verdünnung 1:50, Fitc-markiert)
- Anti-CD47-*Fitc*: spezifischer Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von CD47 (= Integrin-Associated-Protein (IAP) auf u.a. Makrophagen und Granulozyten (BD Biosciences, miap301, Cat. No. 28134D, Verdünnung 1:50, Fitc-markiert)
- Anti-*F_cγR_{III}*-*Fitc*: spezifischer Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop des *F_cγR_{III}*-Rezeptors auf u.a. Granulozyten (BD Biosciences, 2.4G2, Cat. No. 01244D, Verdünnung 1:50, Fitc-markiert)

Granulozyten werden durch die Oberflächenantigene Gr1 und Mac-1 ausreichend gegenüber anderen Zellpopulationen charakterisiert, wenn sie in der Auswertung des FACS durch die Analyse von Zellgröße (FSC) und Granulierung (SSC) von Makrophagen und Monozyten abgegrenzt wurden.

Verteilung und Funktionen von Gr1 und Mac-1 [4, 28]:

	Synonym(e)	Vorkommen	Funktion
Gr1	CD97, Ly-6G	Neutrophile Granulozyten, aktivierte B- und T-Lymphozyten, Monozyten	bindet DAF (decay accelerating factor; CD55) [regulierendes Protein körpereigener Zellen im alternativen Weg der Komplementaktivierung], Granulozytendifferenzierung und -reifung im Knochenmark
Mac-1	LFA-1 $\alpha_M\beta_2$, CR3, CD 11b:CD18	Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen	Integrin, Erkennung von LPS, Expression nach Aktivierung schnell verstärkt

Tab.: 2.3.1.: Verteilung und Funktionen von Gr1 und Mac-1

Durch eine Bestimmung der Expressionsdichte von CD47 und $F_c\gamma R_{III}$ auf den Granulozyten ist ein Rückschluss auf deren Aktivierungsgrad möglich.

Verteilung und Funktionen von CD47 und $F_c\gamma R_{III}$ [4, 28]:

	Synonym(e)	Vorkommen	Funktion
CD47	IAP (= Integrin- associated protein)	alle Zellen	auf Leukozyten für Extravasation und Aktivierung charakteris- tisch
$F_c\gamma R_{III}$	CD16	neutrophile Granulozyten, NK-Zellen, Makrophagen	vermittelt Phagozytose und antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

Tab.: 2.3.2.: Verteilung und Funktionen von CD47 und $F_c\gamma R_{III}$

Um die Aktivierung der in die Peritonealhöhle eingewanderten Granulozyten nach 16G CASP zu untersuchen, wurde folgendes Färbeschema angewendet:

Reihe	F_c -Block	Granulozytenfärbungen	Aktivierungsfärbung
1	+	Ungefärbt	ungefärbt
2	+	Anti-Gr1-PE	Anti-IgG-Fitc
3	+	und	Anti-CD47-Fitc
4	-	Anti-Mac-1-APC	Anti- $F_c\gamma R_{III}$ -Fitc

Tab. 2.3.3.: FACS-Färbeschema zur Analyse von Granulozyten in der Peritoneallavage

2.3.5 Rekrutierung von Peritonealmakrophagen mittels Thioglykolinjektion

Um zu untersuchen, ob ein quantitativer Unterschied in der Migrationsfähigkeit von Makrophagen in die Peritonealhöhle zwischen dem Wildtyp (CCR4^{+/+}) und den CCR4^{-/-} Knockout-Mäusen besteht, wurde je drei Tieren jeweils 3 ml Thioglykolat intraperitoneal injiziert. Nach fünf Tagen erfolgte eine Peritoneallavage mit 10 ml PBS. Die durch anschließende Zentrifugation gewonnenen Peritonealmakrophagen konnten in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt werden.

2.3.6 Statistik

Die Ergebnisse der Versuche wurden mit dem Programm SPSS statistisch ausgewertet. Zugrundegelegt wurden der Log-Rank-Test bei den Kaplan-Meier-Darstellungen der Überlebenskurven sowie der Mann-Whitney-Test bei den *in vitro* Versuchen.

Das Signifikanzniveau wurde mit $p = 5\%$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Kinetik

3.1.1 Kinetik der 16G CASP: Einfluss von CCR4

Zum Vergleich der Letalität nach 16G CASP zwischen C57BL/6 (= CCR4+/+) und CCR4-/- Mäusen wurden je 20 Tiere operiert und postinterventionell für 240 Stunden engmaschig überwacht. Als Kontrolle wurde die sham-Operation an vier C57BL/6 - Mäusen durchgeführt.

Nach Erwachen der Mäuse aus der Narkose regenerierten sie sich allesamt relativ schnell und nahmen innerhalb von 20 bis 30 Minuten die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme wieder auf. Sie begannen mit der Fellpflege, setzten Kot ab und zeigten typisches Sozialverhalten.

Im weiteren Verlauf entwickelte ein Großteil der Mäuse die in der Tabelle 2.1.2 aufgelisteten Symptome der Peritonitis bzw. Sepsis in unterschiedlichem Ausmaß. Zur Beurteilung der Schwere der septischen Erkrankung wurde das o.g. Punkteschema angewendet. Bei einer Summe von 12 Punkten oder mehr wurde die Maus schmerzlos getötet. Ein Teil der Tiere erholte sich und entwickelte keine weiteren septischen Episoden, ein Teil der Tiere verstarb jedoch in der Sepsis bzw. musste symptombedingt euthanasiert werden.

Bei der C57BL/6-Kontrollgruppe (= CCR4+/+) wurde die Gesamtletalität von 95% (entspricht einem Überleben von 5%) bereits 48 Stunden nach 16G CASP erreicht und änderte sich dann nicht mehr. Zu diesem Zeitpunkt waren in der CCR4 -/- Gruppe noch ca. 35% der Tiere am Leben, dieser Anteil verringerte sich bis 132 Stunden nach 16G CASP auf den Endwert von 20% (log-rank Test: $p=0,0996$, nicht signifikant). Die Tiere der sham-Gruppe zeigten erwartungsgemäß keine Sepsiszeichen und überlebten ausnahmslos.

Die so erhaltenen Überlebenszeiten nach 16G CASP sind in der folgenden Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.

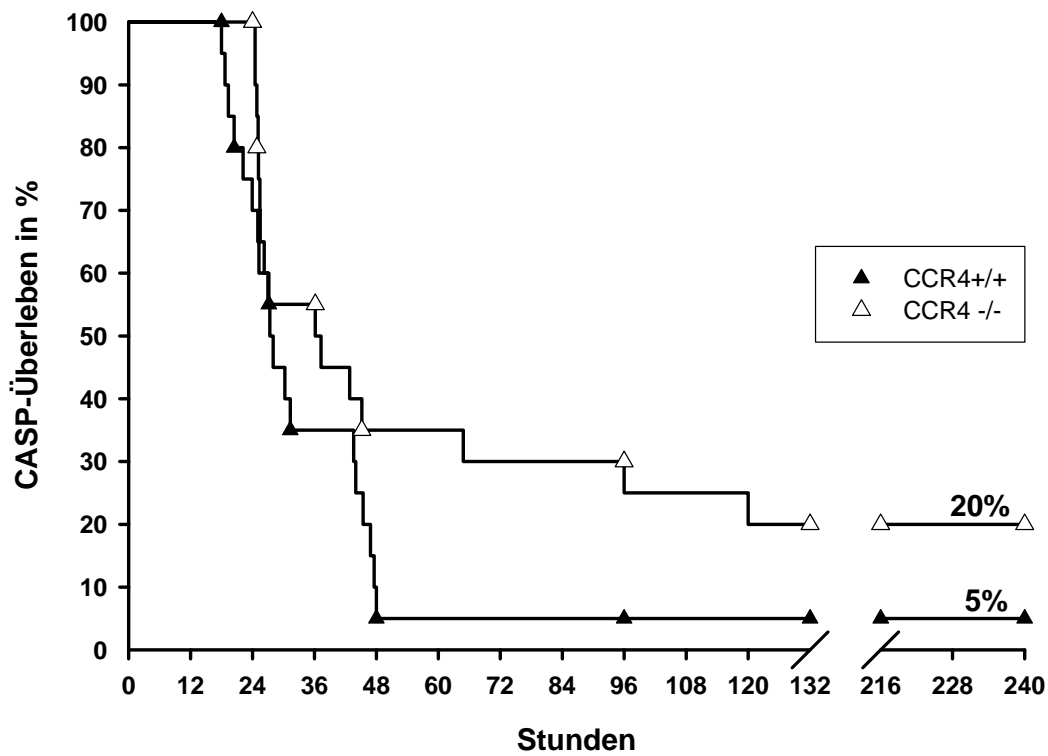


Abb. 3.1.1: Überleben nach 16G CASP CCR4+/+ vs. CCR4-/-: $n_{CCR4+/+} = 20$ und $n_{CCR4-/-} = 20$, p -Wert im log-rank Test 240 Stunden nach 16G CASP: $p = 0,0996$

3.1.2 Kinetik der 16G CASPI: Einfluss von CCR4

Die Ergebnisse der 16G CASP zeigten, dass die CCR4^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den CCR4^{+/+} Wildtyp-Mäusen einen mäßigen, aber nicht signifikanten Überlebensvorteil aufweisen und zudem zeitlich verzögert sterben. Durch eine chirurgische Intervention in der frühen Sepsisphase (5h post CASP) sollte nun untersucht werden, ob sich dieser zeitliche Überlebensvorteil der CCR4^{-/-} Mäuse in einen definitiven Überlebensvorteil umsetzen lässt.

Um die Bedeutung des frühen Sepsisgeschehens und die Auswirkungen des CCR4^{-/-} Gendefektes zu untersuchen, wurde die 16G CASPI bei 20 C57BL/6 (= CCR4^{+/+}) und 16 CCR4^{-/-} Mäusen durchgeführt. Die Intervention mit Entfernung des 16G Stents fand 5 Stunden nach dem CASP-Eingriff statt. Die Tiere wurden ebenfalls für 240 Stunden engmaschig überwacht.

Zum Zeitpunkt des Revisionseingriffes zeigten die operierten Tiere noch keine der o.g. Sepsismerkmale - kein Tier war bis dahin verstorben. Nach der Sanierung erholten sich die Mäuse ähnlich rasch wie nach der ersten Operation. Im weiteren Verlauf stellten sich bei einem Teil der Tiere die bekannten Sepsissymptome ein. Allerdings fiel im Vergleich zur 16G CASP der Anteil der betroffenen Tiere deutlich geringer aus.

In der C57BL/6-Kontrollgruppe (= CCR4^{+/+}) waren nach 48 Stunden noch 20%, in der Versuchsgruppe (= CCR4^{-/-}) noch 62,5% der Tiere am Leben. Mit einem Gesamtüberleben von 50% in der CCR4^{-/-} Gruppe zeigt sich nach 16G CASP ein signifikanter Überlebensvorteil (log-rank Test: $p = 0,0246$, signifikant) gegenüber der Kontrollgruppe mit 20%. Auffallend ist auch der flachere und erst später einsetzende Abfall der Kurve in der zugehörigen Kaplan-Meier-Darstellung.

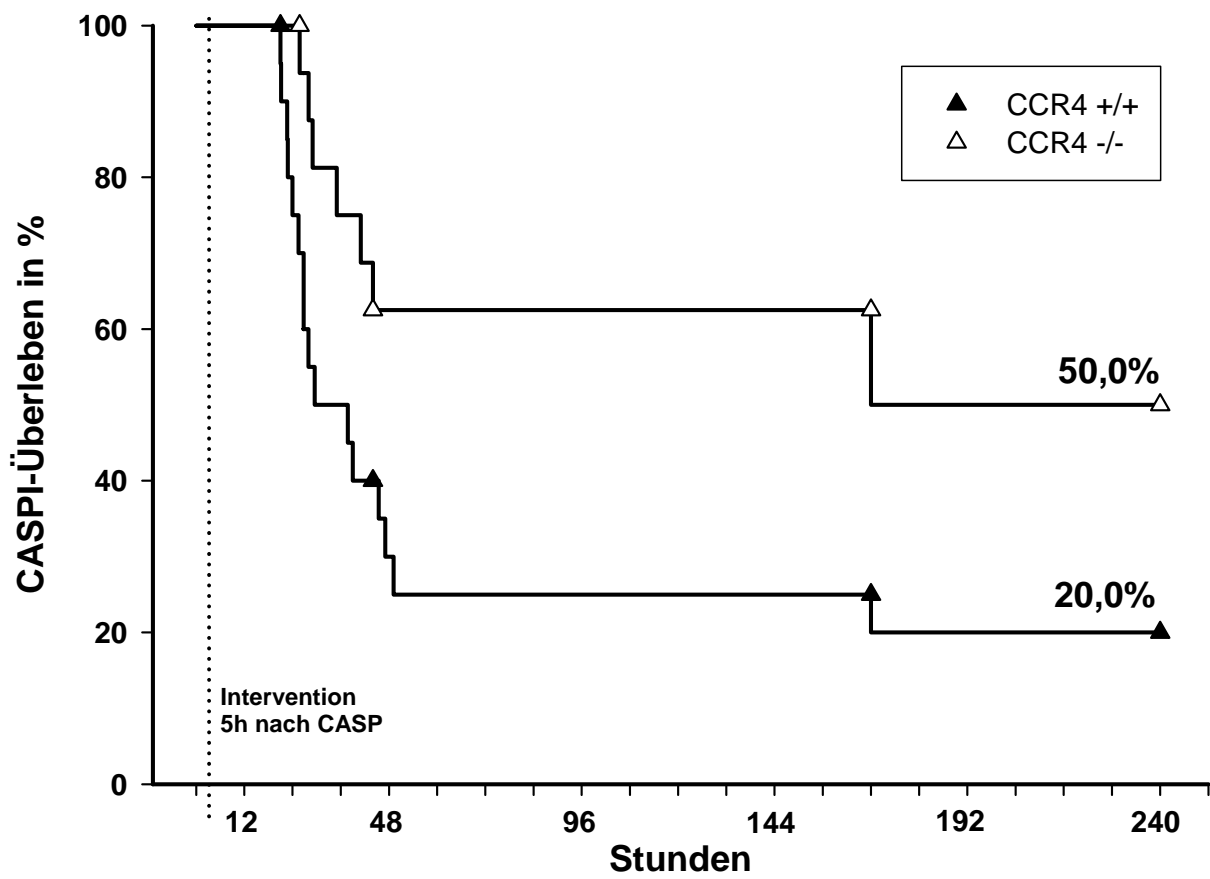


Abb. 3.1.2: Überleben nach 16G CASPI CCR4^{+/+} vs. CCR4^{-/-}:
 $n_{CCR4^{+/+}} = 20$ und $n_{CCR4^{-/-}} = 16$,
 p-Wert im log-rank Test 240 Stunden nach 16G CASP:
 $p = 0,0246$

In nachstehender Tabelle sind zusammenfassend die Einzelwerte des Überlebens nach 16G CASP und 16G CASPI aufgelistet.

Operation	Versuchsgruppe	n	Überleben in Stunden (gerundet)
16G CASP	WT (CCR4 +/+)	20	18; 2x 19; 20; 22; 24; 2x 25; 2x 27; 28; 30; 31; 2x 44; 45; 47; 2x 48; 1x >240
	CCR4 -/-	20	6x 25; 2x 26; 27; 36; 37; 43; 45; 65; 96; 120; 4x >240
16G CASPI	WT (CCR4 +/+)	20	2x 21; 2x 23; 24; 26; 2x 27; 28; 30; 38; 39; 45; 47; 49; 167; 4x >240
	CCR4 -/-	16	26; 28; 29; 35; 41; 44; 2x 168; 8x >240

Tab.: 3.1.1. Überleben der operierten Tiere nach 16G CASP und 16G CASPI

3.2 Bakteriologie

3.2.1 Bakteriologie der Peritoneallavage

Die Analyse der durch den Stent in die Peritonealhöhle eingetretenen Bakterien konnte durch Aufbringen von Verdünnungsreihen der Peritoneallavage auf Blutagarplatten durchgeführt werden. Ziel war es, gegebenenfalls sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu ermitteln.

3.2.1.1 Quantitative bakteriologische Analyse der Peritoneallavage nach 16G CASP

Die Anzahl der Kolonien wurden von den bebrüteten Blutagarplatten abgelesen und mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert, um die koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml Peritoneallavage zu errechnen.

Die KBE / ml Peritoneallavage 3 und 6 Stunden nach 16G CASP-Operation lagen bei den CCR4^{-/-} -Mäusen und den CCR4^{+/+} -Kontrollen noch nahe beieinander. Die KBE/ml innerhalb der Gruppen wiesen teilweise große Standardabweichungen auf. Die Vergleiche 12 bzw. 20 Stunden nach 16G CASP zeigten jedoch eine deutlich niedrigere Konzentration an Bakterien in der Peritoneallavage der CCR4^{-/-} -Mäuse. Nach 12 h betrug die durchschnittliche Bakterienkonzentration der Peritoneallavage der CCR4^{+/+} -Gruppe das 24,5fache ($n_{\text{CCR4}^{+/+}} = 3$ und $n_{\text{CCR4}^{-/-}} = 4$). Der p-Wert im Mann-Whitney Test liegt bei 0,057 und ist somit nahezu signifikant. Die Auswertung der Ergebnisse nach 20 h ergaben bei einer konstant gebliebenen mittleren Bakterienkonzentration der Peritoneallavage der CCR4^{-/-} -Gruppe einen 123fach höheren Wert für die CCR4^{+/+} - Kontrolle. Der p-Wert im Mann-Whitney Test lag hierbei bei $p = 0,1$ ($n_{\text{CCR4}^{+/+}} = 3$ und $n_{\text{CCR4}^{-/-}} = 3$).

Die Lavagen der sham-Operationen waren stets steril. Die folgende Grafik zeigt den zeitlichen Verlauf der KBE/ml im Vergleich C57BL/6 gegenüber CCR4^{-/-}.

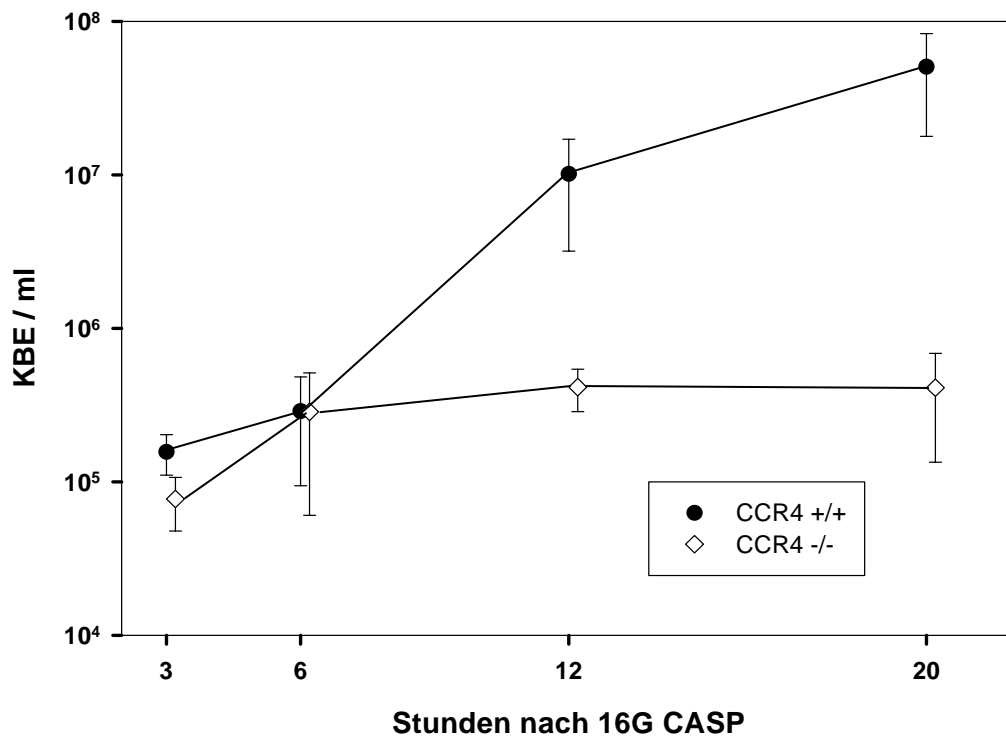


Abb.: 3.2.1. Bakteriologische Analyse der Peritoneallavage nach 16G CASP
CCR4+/+ vs. CCR4-/-:

Zeitpunkt (h)	n _{CCR +/+}	n _{CCR -/-}	p-Wert im Mann-Whitney Test
3	4	4	0,486
6	4	3	0,629
12	3	4	0,057
20	3	3	0,100

3.2.1.2 Qualitative bakteriologische Analyse der Peritoneallavage nach 16G CASP

Voraussetzung für einen Vergleich der Sepsis beider Tiergruppen ist eine identische bakterielle Darmnormalflora. Dies konnte durch Ausstreichen von direkt entnommenem Dickdarmsstuhl von je 4 CCR4+/+ und CCR4-/- - Mäusen nachgewiesen werden.

Die auf den mit Peritoneallavage ausgestrichenen und bebrüteten Blutagarplatten sichtbaren Bakterienkolonien wurden nach Wachstumsmorphologie, Farbe und hämolytischem Verhalten grob unterschieden. Erwartungsgemäß waren auch hier die beobachteten Bakterienspezies identisch.

Es wurden folgende Bakterienfamilien / -arten in Abhängigkeit von den Untersuchungszeitpunkten gefunden (Nennung in absteigender Häufigkeit):

	3h	6h	12h	20h
CCR4 +/+	- Enterokokken - Sporenbildner	- Enterokokken - gramnegative Stäbchen	- gramnegative Stäbchen - Enterokokken	- gramnegative Stäbchen - Enterokokken
CCR4 -/-	- Enterokokken - Sporenbildner	- Enterokokken	- gramnegative Stäbchen - Enterokokken	- gramnegative Stäbchen - Enterokokken

Tab. 3.2.1. Qualitative bakteriologische Analyse der Peritoneallavage

In der Frühphase der abdominalen Sepsis waren Enterokokken auffallend stark repräsentiert (60 – 75% der Kolonien). Sporenbildende Bakterien fanden sich ausschließlich nach 3 h. Während nach 6 h bei den CCR4+/+ -Mäusen gramnegative Stäbchen zu finden waren, traten diese in der CCR4-/- -Gruppe erst nach 12h auf. Ab 12 h nach 16G CASP dominierten in beiden Gruppen gramnegative Stäbchen. Trotz der nun starken Unterschiede in der quantitativen Auswertung (siehe Abb.: 3.2.1) war hier kein Unterschied in der qualitativen Analyse zu vermerken.

3.2.2 Bakteriologie der Organe

Der systemische bakterielle Befall im Rahmen der Sepsis sollte durch Analyse der Bakterienkonzentrationen in Leber, Lunge, Milz, Niere und Blut 20 h nach 16G CASP untersucht werden. Durch Aufbringen der verdünnten Organsuspensionen auf Blutagarplatten wurden die KBE/ml Organsuspension ermittelt. Ziel war es, quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Organen einerseits und den Versuchsgruppen andererseits zu ermitteln.

Leber: Die Leber war das deutlich am stärksten bakteriell befallene Organ. Mit einer 25fach höheren Konzentration der Bakterien in den Lebern der CCR4^{+/+} - Tiere und einem p-Wert von $p = 0,057$ ist der Unterschied zu der CCR4^{-/-} - Versuchsgruppe beinahe signifikant.

Lunge: Der bakterielle Befall der Lunge zeigt im Vergleich einen um den Faktor 3,5 höheren Wert bei den CCR4^{+/+} -Mäusen, der p-Wert beträgt $p = 0,4$.

Milz: Die Milzen der Knockout-Tiere wiesen deutlich weniger KBE/ml Organsuspension auf als die der Wildtypkontrollen (Faktor 119), bei $p = 0,1$ zeigt sich jedoch keine Signifikanz.

Niere: Die Auszählung der Bakterienkonzentration in der Organsuspension der Nieren ergab einen 5,6fach höheren Mittelwert in den CCR4^{+/+} -Organen, der p-Wert errechnete sich zu $p = 0,2$.

Blut: Die Ausstriche des verdünnten Blutes ergaben eine darin um den Faktor 95 höhere Konzentration an Bakterien in den CCR4^{+/+} -Tieren, der p-Wert liegt bei $p = 0,1$.

In Abbildung 3.2.2 sind die Ergebnisse der bakteriologischen Analysen der Organe dargestellt.

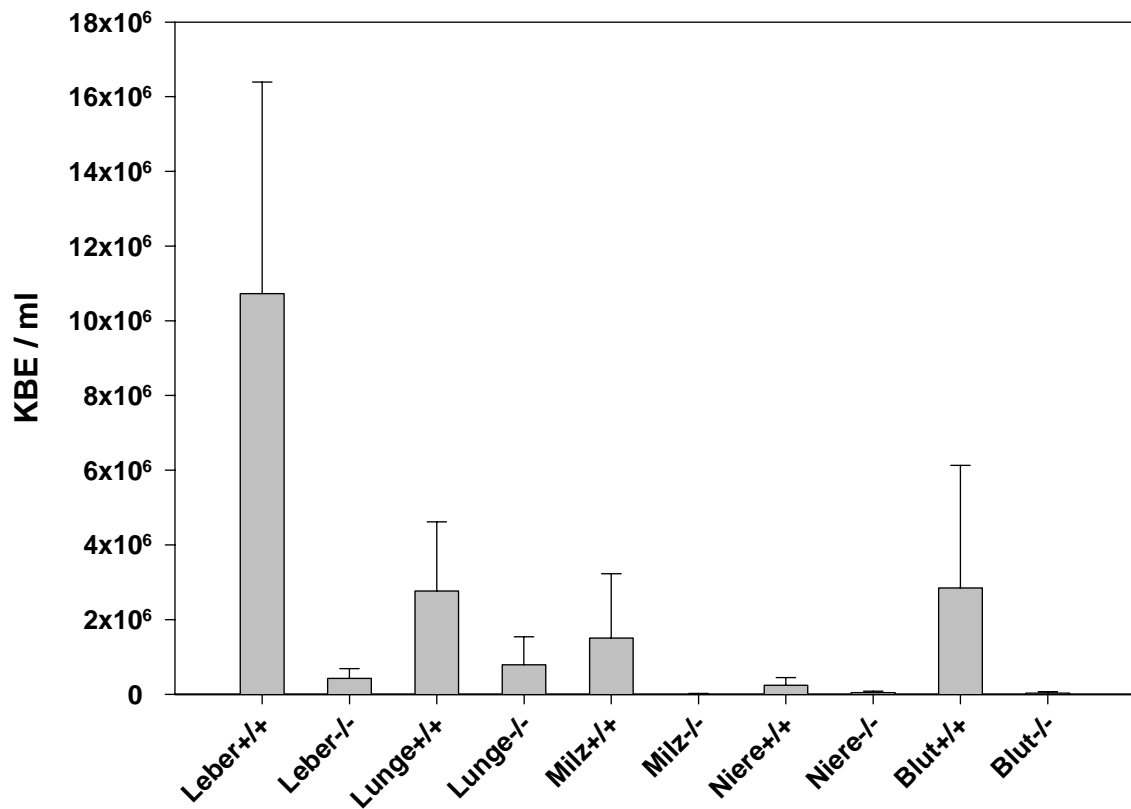


Abb.: 3.2.2. Bakteriologische Analyse der Organsuspensionen 20 h nach 16G CASP CCR4+/+ vs. CCR4-/-:

Organ	n _{CCR4 +/+}	n _{CCR4 -/-}	p-Wert (CCR4+/+ vs. CCR4-/-) Mann-Whitney Test
Leber	4	3	0,057
Lunge	3	2	0,400
Milz	3	3	0,100
Niere	3	3	0,200
Blut	3	3	0,100

3.3 Systemische Zytokinspiegel

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen von IL-10, TNF α , IL-12p40 und IL-18 im Serum mittels ELISA nach 16G CASP dargestellt. Die Auswahl der Zytokine beruhte auf Ergebnissen früherer CASP-Versuche und allgemeiner Erkenntnisse in der abdominalen Sepsisforschung. Für IL-10 konnte gezeigt werden, dass es neben seinen bekannten antiinflammatorischen Effekten im Entzündungsgeschehen auch eine protektive Funktion in der septischen Peritonitis hat [16, 57]. TNF α , IL-12p40 und IL-18 sind als typische Vertreter der proinflammatorischen Zytokine bekannt (vgl. Kap. 1.2.2 und 1.2.3) [14, 15, 28, 29, 36, 38, 61].

3.3.1 IL-10

Bei den sham-Kontrollen lagen die IL-10 -Konzentrationen im Serum bereits nach 3 Stunden unter 3000 pg/ml und näherten sich nach 6 und 12 Stunden der unteren Nachweisgrenze ($n_{\text{sham } 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 3 / 4 / 2$).

Bei den CCR4^{+/+} -Wildtyp-Kontrollen ($n_{\text{CCR4 } +/+ 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 3 / 4 / 4$) stiegen die IL-10 – Werte deutlich an und erreichten 12h postoperativ einen Durchschnittswert von fast 35.000 pg/ml. Das Serum der CCR4^{-/-} -Knockout-Mäuse ($n_{\text{CCR4 } -/- 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 2 / 3 / 3$) zeigte zu allen drei Meßzeitpunkten IL-10-Konzentrationen um 20.000 pg/ml. Damit lag der IL-10-Spiegel in der Gruppe der CCR4-defizienten Mäuse nach 6 und 12 Stunden deutlich unter der der CCR4^{+/+} Kontrolle. Der beobachtete Unterschied ist zu keinem der Zeitpunkte signifikant, verfehlt dies nach 12 Stunden jedoch nur knapp (6h: $p > 0,23$; 12h: $p = 0,057$).

In Abb. 3.1.1. sind die zeitlichen Verläufe der Konzentrationen von IL-10 im Serum der sham-, CCR4^{+/+} - und der CCR4^{-/-} -Gruppe abgebildet.

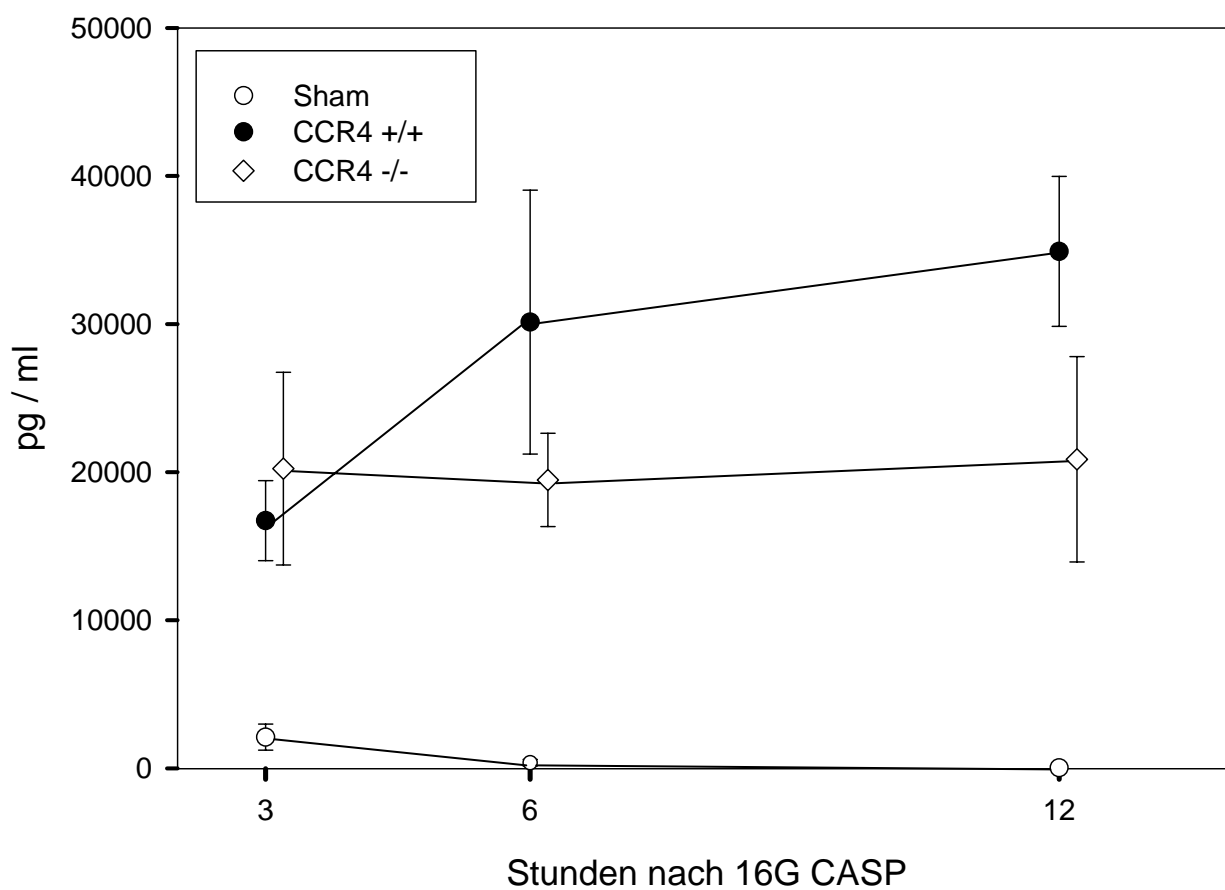


Abb. 3.3.1.: IL-10 im Serum nach 16G CASP CCR4+/+ vs. CCR4-/-:

Zeitpunkt (h)	n _{sham}	n _{CCR4 +/+}	n _{CCR4 -/-}	p-Wert (CCR4+/+ vs. CCR4-/-) Mann-Whitney Test
3	3	3	2	0,800
6	4	4	3	0,229
12	2	4	3	0,057

3.3.2 TNF α

TNF α im Serum steigt 3 Stunden nach der sham-Operation auf Werte um 20 pg/ml an und fällt dann auf weniger als 10 pg/ml ab ($n_{\text{sham } 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 3 / 3 / 3$).

Im CCR4^{+/+} -Wildtyp nimmt der TNF α -Anstieg einen steilen Verlauf, liegt nach 6 Stunden bei über 220 pg/ml und nach 12 Stunden über 310 pg/ml ($n_{\text{CCR4 } +/+ 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 5 / 3 / 3$). Die Standardabweichung ist v.a. nach 6 Stunden ($\sigma = 83,23$) sehr groß.

In der CCR4^{-/-} -Gruppe steigt TNF α langsam auf Werte um 50 pg/ml nach 6 Stunden an, nach 12 Stunden ist es bereits wieder auf weniger als 40 pg/ml gefallen ($n_{\text{CCR4 } -/- 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 3 / 4 / 3$).

Die gemessenen Unterschiede zwischen den CCR4^{+/+} -Kontrollen und den CCR4^{-/-} -Mäusen sind zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant (3h: $p = 0,071$; 6h: $p = 0,057$; 12h: $p = 0,1$), nach 6 Stunden jedoch sehr nahe daran.

Der Konzentrationsverlauf von TNF α im Serum nach 16G CASP in den drei beobachteten Gruppen ist in Abb. 3.3.2. grafisch dargestellt.

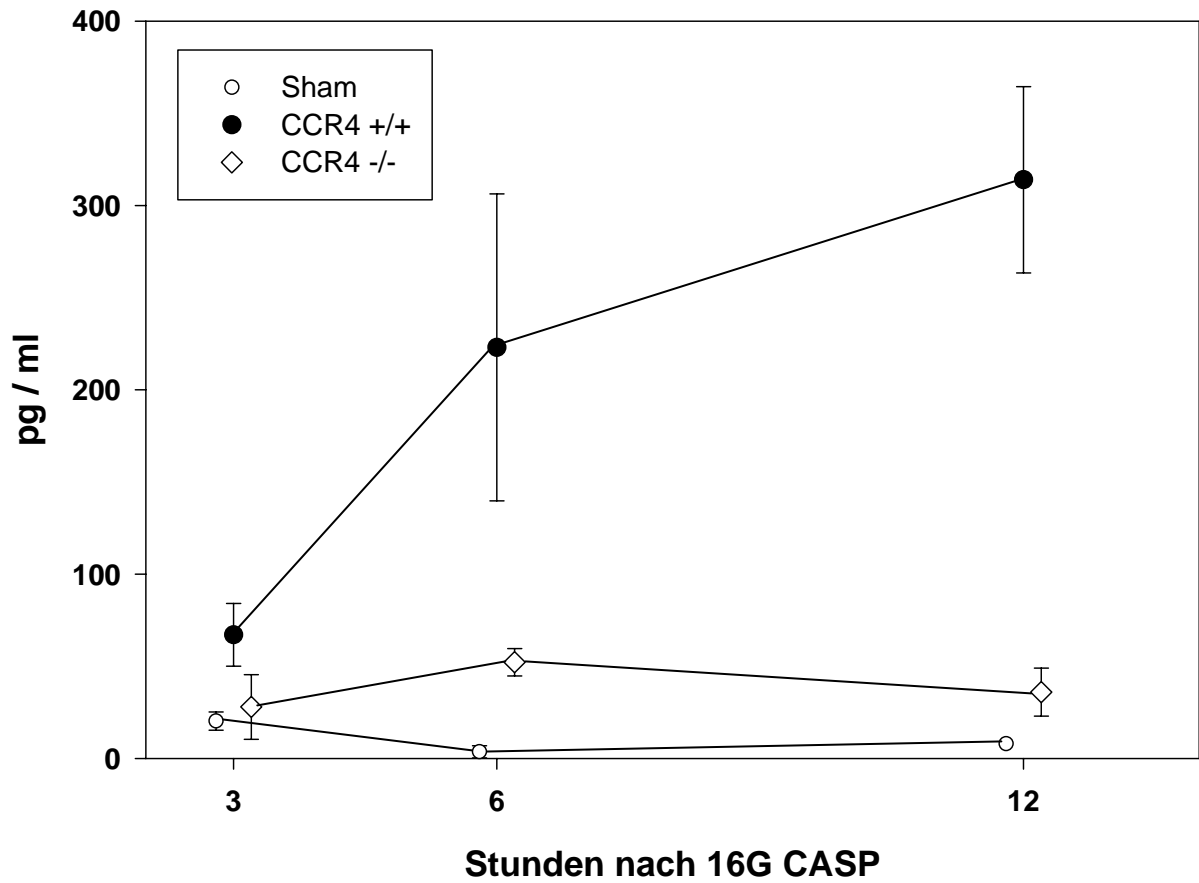


Abb. 3.3.2.: $TNF\alpha$ im Serum nach 16G CASP CCR4+/+ vs. CCR4-/-:

Zeitpunkt (h)	n_{sham}	$n_{\text{CCR4 +/+}}$	$n_{\text{CCR4 -/-}}$	p-Wert (CCR4+/+ vs. CCR4-/-) Mann-Whitney Test
3	3	5	3	0,071
6	3	3	4	0,057
12	3	3	3	0,100

3.3.3 IL-12p40

Der Serumspiegel von IL-12p40 bei Messung 3 und 6 Stunden nach sham-Operation liegt mit Durchschnittswerten um 250 pg/ml nur geringfügig unter den Ergebnissen der Wildtyp-Kontrollen mit 320 bzw. 340 pg/ml ($n_{\text{sham } 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 4 / 3 / 5$ und $n_{\text{CCR4 } +/+ 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 7 / 5 / 5$). Nach 12 Stunden ist IL-12p40 dann abgefallen, in der sham-Gruppe unter 50 pg/ml bei den CCR4+/+ unter 200 pg/ml.

Bei den CCR4-Knockout-Mäusen fällt nach 3 Stunden eine mit 660 pg/ml sehr hohe IL-12p40-Konzentration auf ($n_{\text{CCR4 } -/- 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 2 / 3 / 3$). Mit einem p-Wert von $p = 0,056$ ist der Unterschied nahezu signifikant. Bei den Untersuchungen 6 und 12 Stunden nach 16G CASP sind die Spiegel deutlich gesunken (6h: 437 pg/ml; 12h: 384 pg/ml), jedoch weiterhin deutlich über den Werten der CCR4-positiven Kontrollen. Signifikanz wird nicht erreicht.

In Abb. 3.3.3. ist der Serumspiegel von IL-12p40 in den drei Versuchsgruppen zu den drei Meßzeitpunkten dargestellt.

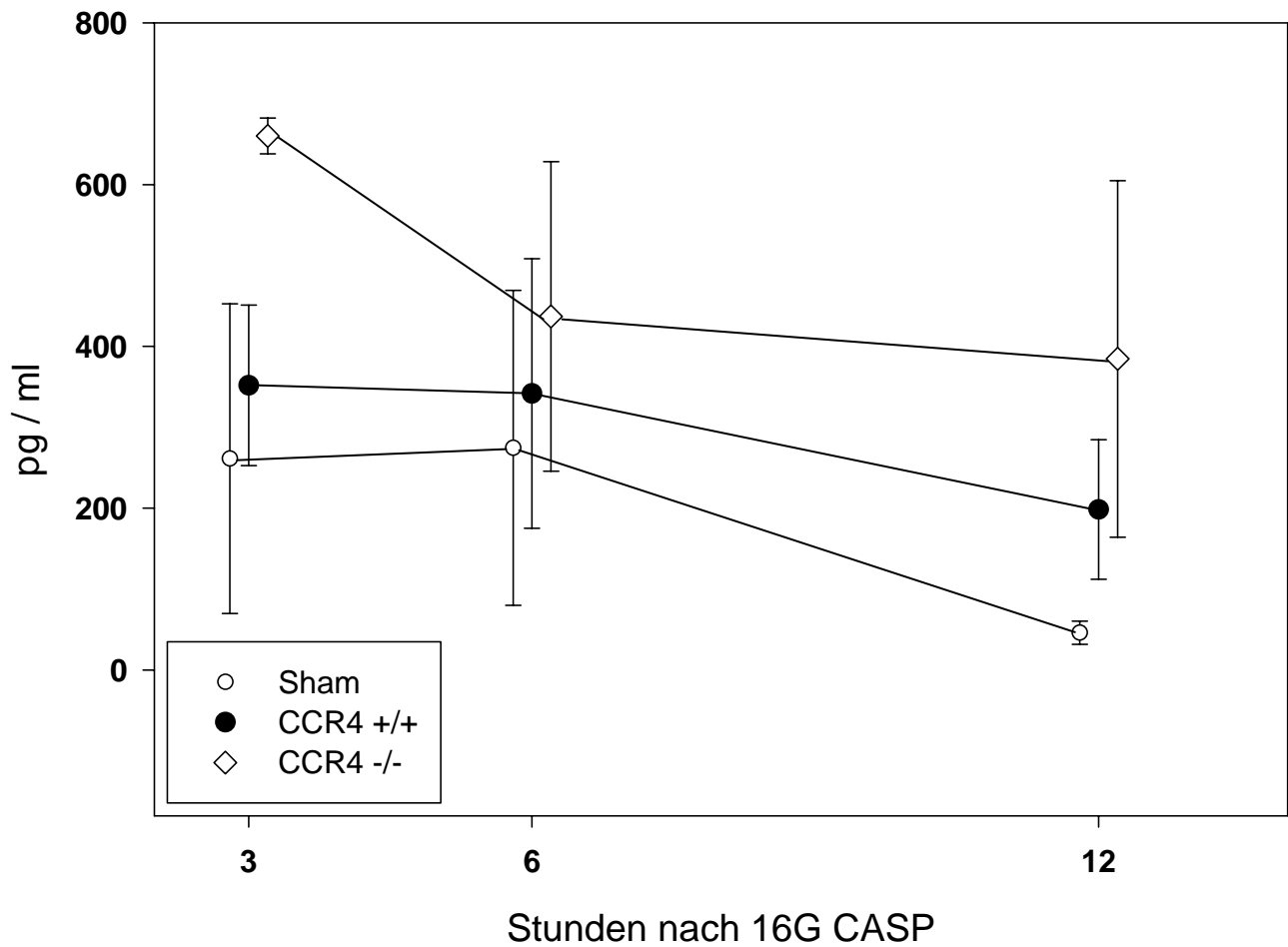


Abb. 3.3.3.: IL-12p40 im Serum nach 16G CASP CCR4+/+ vs. CCR4-/-:

Zeitpunkt (h)	n _{sham}	n _{CCR4 +/+}	n _{CCR4 -/-}	p-Wert (CCR4+/+ vs. CCR4-/-) Mann-Whitney Test
3	4	7	2	0,056
6	3	5	3	0,786
12	5	5	3	0,250

3.3.4 IL-18

IL-18 im Serum nach sham-Operation zeigt im Verlauf der drei Untersuchungszeitpunkte einen geringen Abfall von 39 pg/ml nach 3 Stunden auf 24 pg/ml nach 12 Stunden ($n_{\text{sham } 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 3 / 2 / 3$).

Im gleichen Zeitraum steigt im Serum der CCR4^{+/+}-Kontrolltiere die durchschnittliche IL-18-Konzentration kontinuierlich an (3h: 136 pg/ml; 6h: 212 pg/ml; 12h: 312 pg/ml; $n_{\text{CCR4 } +/+ 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 7 / 6 / 6$).

Dahingegen zeigt der Verlauf im Serum der CCR4-defizienten Mäuse einen relativ hohen Wert für IL-18 nach 3 Stunden (218 pg/ml). Es folgte ein langsamer Abfall auf 213 pg/ml nach 6 Stunden und 191 pg/ml nach 12 Stunden ($n_{\text{CCR4 } -/- 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 4 / 8 / 7$). Im Vergleich zu den CCR4^{+/+}-Tieren ergibt sich hier ein signifikanter Unterschied bei 3 Stunden ($p= 0,042$) und bei 12 Stunden ($p= 0,014$).

In Abb. 3.3.4. sind die Ergebnisse der Messungen von IL-18 im Serum mittels ELISA-Technik grafisch dargestellt.

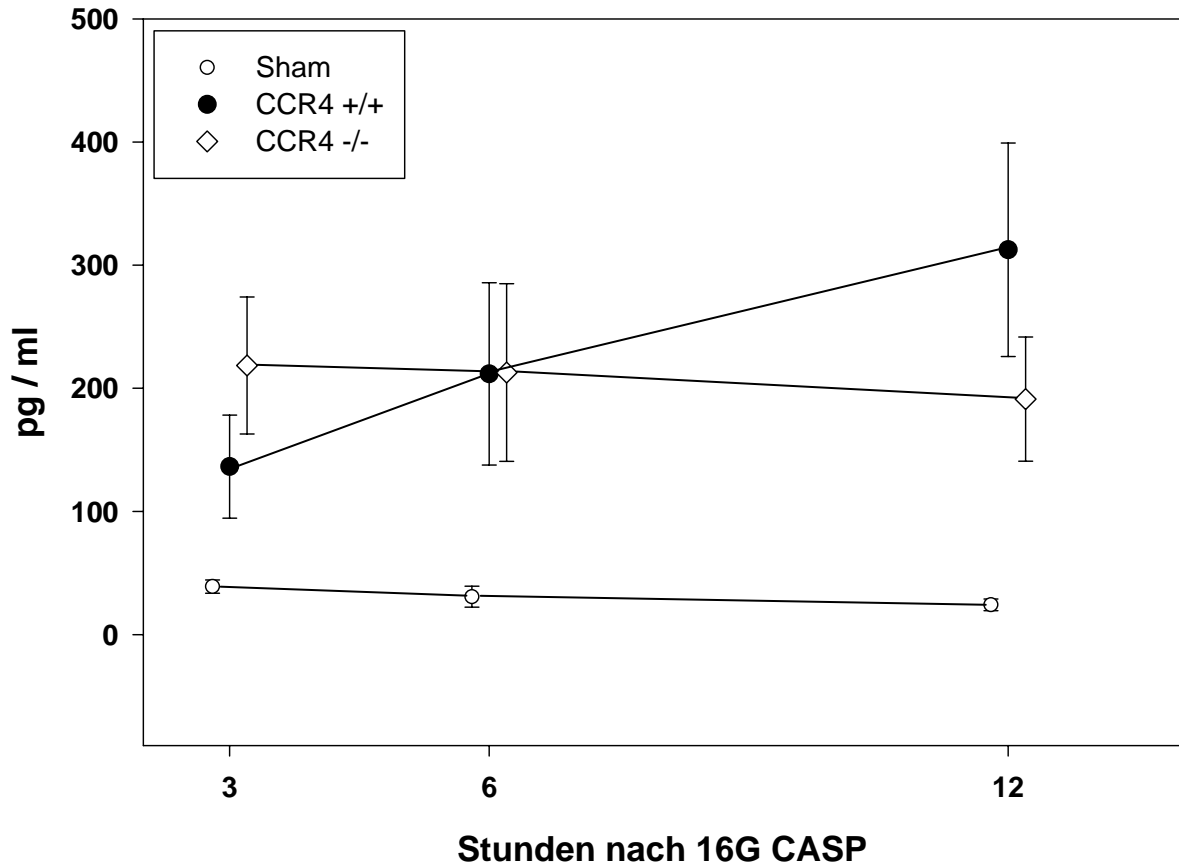


Abb. 3.3.4.: IL-18 im Serum nach 16G CASP CCR4+/+ vs. CCR4-/-:

Zeitpunkt (h)	n _{sham}	n _{CCR4 +/+}	n _{CCR4 -/-}	p-Wert (CCR4+/+ vs. CCR4-/-) Mann-Whitney Test
3	3	7	4	0,042
6	2	6	8	0,950
12	3	6	7	0,014

3.4 Zytokinspiegel in Organen

In früheren CASP-Versuchen konnte gezeigt werden, daß IFN γ im Serum nicht, in Organen jedoch gut nachweisbar ist [80]. Deshalb wurde bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit IFN γ gezielt nur in der Leber (typische Produktionsstätte von an inflammatorischen Prozessen beteiligten Proteinen) und in der Milz (primäres Organ der immunologischen Bekämpfung systemischer bakterieller Infektionen) bestimmt.

3.4.1 IFN γ in der Leber

Die in den Lebern gemessenen IFN γ -Spiegel der sham-operierten Mäuse zeigten zu den drei Zeitpunkten niedrige Werte unter 2 pg/mg Protein ($n_{\text{sham } 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 4 / 4 / 4$).

Ebenso lagen die Konzentrationen in den Lebern der CCR4^{+/+}-Mäuse nahe der Nachweisgrenze und nur geringfügig über den sham-Werten ($n_{\text{CCR4 } +/+ 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 4 / 4 / 4$). Nach 6 Stunden war der höchste erfasste Wert mit 3,6 pg/mg Protein erreicht. Nach 12 Stunden war IFN γ in etwa genauso hoch wie in den sham-operierten Kontrollen. Auch die untersuchten CCR4^{-/-}-Mäuse wiesen in der Leber sehr geringe IFN γ -Mengen nahe der unteren Nachweisgrenze auf ($n_{\text{CCR4 } -/- 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 4 / 4 / 4$).

Unterschiede in der IFN γ -Menge sind aufgrund der Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze nicht sicher auszumachen und die Standardabweichungen teilweise sehr groß. Die unten gezeigte statistische Auswertung ist angesichts dessen nur mit äußerster Vorsicht zu betrachten.

In Abb. 3.4.1. sind die gemessenen IFN γ -Konzentrationen der sham-, CCR4^{+/+}- und CCR4^{-/-}-Lebern grafisch dargestellt.

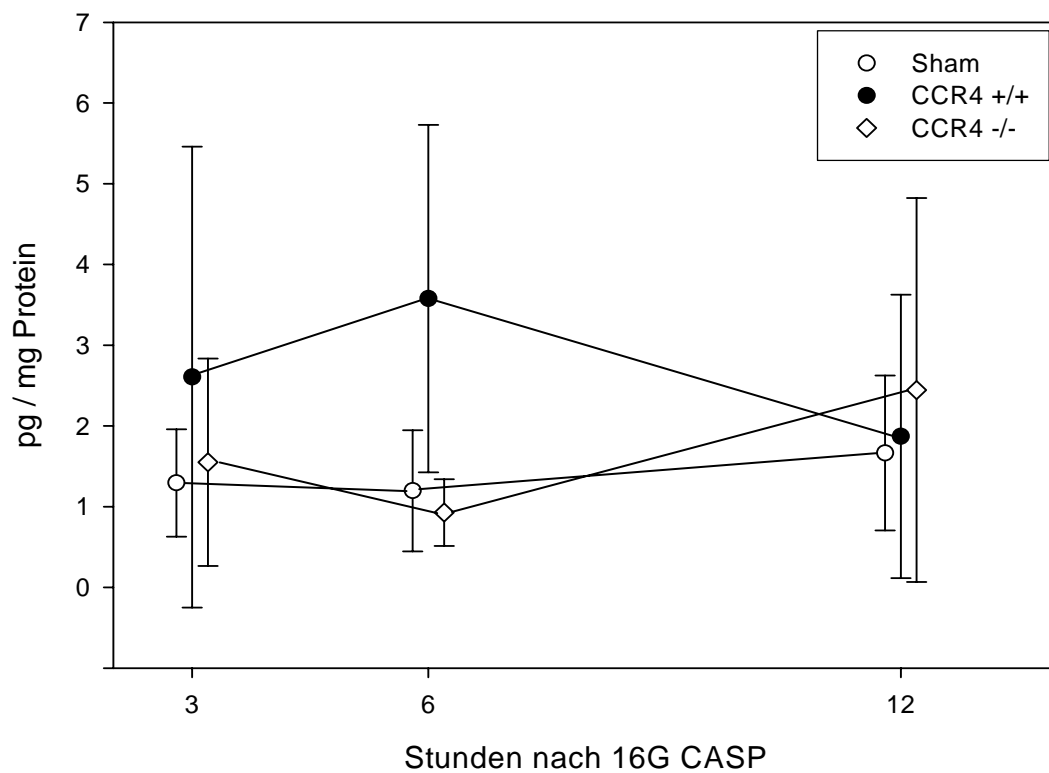


Abb. 3.4.1.: $IFN\gamma$ in der Leber nach 16G CASP CCR4+/+ v. CCR4-/-:

Zeitpunkt (h)	n _{sham}	n _{CCR4 +/+}	n _{CCR4 -/-}	p-Wert (CCR4+/+ vs. CCR4-/-) Mann-Whitney Test
3	4	4	4	0,63
6	4	4	4	0,20
12	4	4	4	0,86

3.4.2 IFN γ in der Milz

Die IFN γ -Konzentrationen in den Milzen sinken in der sham-Gruppe von 12 pg/mg Protein nach 3 Stunden auf 2 pg/mg Protein nach 12 Stunden ab ($n_{\text{sham } 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 2 / 4 / 4$).

In den Milzen der CCR4^{+/+}-Mäuse wurden folgende Spiegel von IFN γ gemessen:

Nach 3 Stunden betrug er 12,6 pg/mg Protein, nach 6 Stunden 13,3 pg/mg Protein und nach 12 Stunden noch 4,5 pg/mg Protein ($n_{\text{CCR4 } +/+ 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 2 / 4 / 4$).

Zu allen drei Messzeitpunkten wurden in den Milzen der CCR4^{-/-}-Mäuse IFN γ -Konzentrationen gefunden, die mit 3,87 pg/mg Protein bzw. 4,8 pg/mg Protein und 1,8 pg/mg Protein deutlich unter denen der CCR4-positiven Kontrollen lagen ($n_{\text{CCR4 } -/- 3\text{h}/6\text{h}/12\text{h}} = 4 / 4 / 4$). Der Vergleich 6 Stunden nach 16G CASP zeigt mit $p = 0,057$ nahezu Signifikanz.

In Abb. 3.4.2. sind die ermittelten Messwerte nebeneinander grafisch aufgetragen.

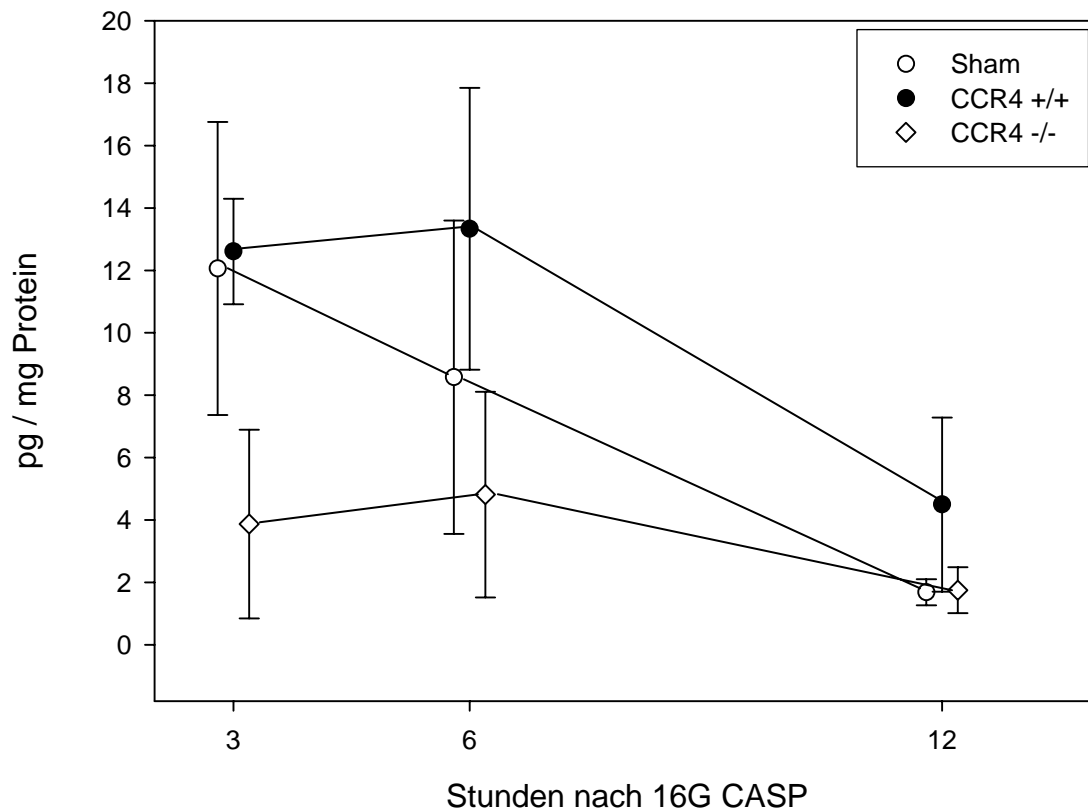


Abb. 3.4.2.: $IFN\gamma$ in der Milz nach 16G CASP CCR4+/+ v. CCR4-/-:

Zeitpunkt (h)	n _{sham}	n _{CCR4 +/+}	n _{CCR4 -/-}	p-Wert (CCR4+/+ vs. CCR4-/-) Mann-Whitney Test
3	2	2	4	nicht durchgeführt
6	4	4	4	0,057
12	4	4	4	0,40

3.5 Akute zelluläre Immunreaktion in der Bauchhöhle

Granulozyten werden durch die Oberflächenantigene Gr1 und Mac-1 ausreichend gegenüber anderen Zellpopulationen charakterisiert, wenn sie in der Auswertung des FACS durch die Analyse von Zellgröße (FSC) und Granulierung (SSC) von Makrophagen und Monozyten abgegrenzt wurden. GR 1 wurde mit PE und Mac-1 mit APC markiert. Die Aktivierungsfärbungen erfolgten jeweils mit Fitc-markierten Antikörpern gegen CD47 bzw. $F_c\gamma R_{III}$ (vgl. Kap. 2.3.4.).

Im Folgenden sind ausgewählte Ergebnisse der FACS-Analysen der Peritoneallavagen dargestellt. Exemplarisch sind die Ergebnisse je einer Analyse von sham-, Wildtyp- und CCR4^{-/-}-Mäusen nach 3 bzw. 12 Stunden abgebildet. Zu keinem Zeitpunkt waren signifikante Unterschiede weder in der Einwanderung nach intraperitoneal noch im Aktivierungsgrad der eingewanderten Zellen zwischen den CCR4-defizienten und den rezeptorpositiven Kontrollen zu messen.

Als Software zur Auswertung wurde das Programm FlowJo Ver.4.5.8 (Tree Star, Inc, Stanford University) verwendet. Zunächst wurden in den Negativkontrollen die spontan nachweisbaren Fluoreszenzen der nicht gefärbten Ansätze grafisch gegeneinander aufgetragen und so die Größe und Ausdehnung der negativen Populationen ermittelt. Der Anhaltswert mit einem Soll von mehr als 90% der Zellen in der Negativpopulation wurde bei der Wahl der Quadrantentrennlinien berücksichtigt; diese Sektoreneinteilung wurde auf die anschließenden Analysen übertragen und fortgeführt.

Die Abb. 3.5.1 – 3 zeigen die Dot Plots der Negativkontrollen, in den Ecken der Quadranten stehen die prozentualen Angaben der Anzahl der gemessenen Ereignisse der Messung.

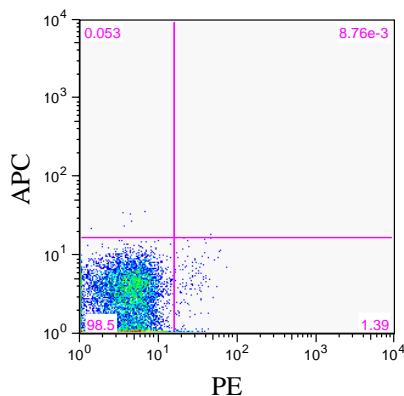


Abb. 3.5.1: Negativkontrolle PE vs. APC

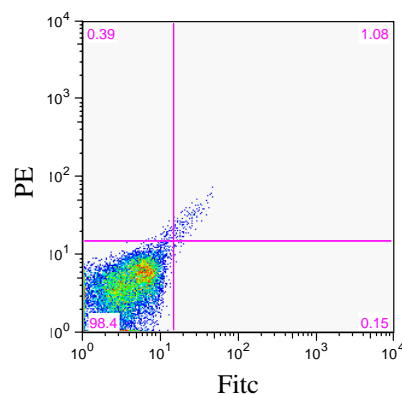


Abb. 3.5.2: Negativkontrolle Fitc vs. PE

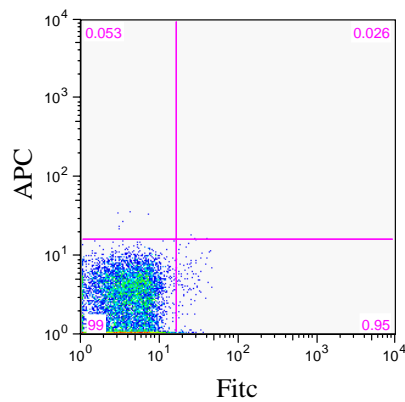


Abb. 3.5.3: Negativkontrolle Fitc vs. APC

Um die zu untersuchenden Zellpopulationen auszuwählen wurde in der grafischen Auftragung der relativen Zellgröße (FSC) gegen die relative Granulierung (SSC) das Life Gate festgelegt (siehe Abb. 3.5.4). Alle folgenden Analysen beziehen sich ausschließlich auf diese festgelegte Zellpopulation.

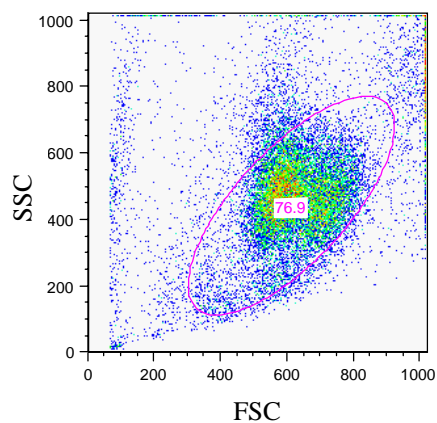


Abb. 3.5.4: Grafische Auftragung der relativen Zellgröße vs. die relative Granulierung; Festlegung des Life Gates

3.5.1 Expressionsverhalten des Oberflächenrezeptors CD47

Um zu untersuchen, ob bezüglich der Aktivierung der eingewanderten Zellen zwischen CCR4^{+/+} - und CCR4^{-/-} -Mäusen nach 16G CASP ein meßbarer Unterschied besteht, wurden FACS-Analysen der Peritoneallavage mit einem

spezifisch gegen das Oberflächenprotein CD47 gerichteten Antikörper durchgeführt. Die Expressionsdichte von CD47 gilt als Marker für den Aktivierungsgrad der tragenden Abwehrzelle (s. Kap. 2.3.4). Die Abbildungen 3.5.5 zeigen diese Messungen an sham-operierten, sowie CCR4^{+/+} - und CCR4^{-/-} -Mäusen 3 Stunden nach 16G CASP; in den Abbildungen 3.5.6 finden sich analog die Ergebnisse 12 Stunden nach dem Eingriff.

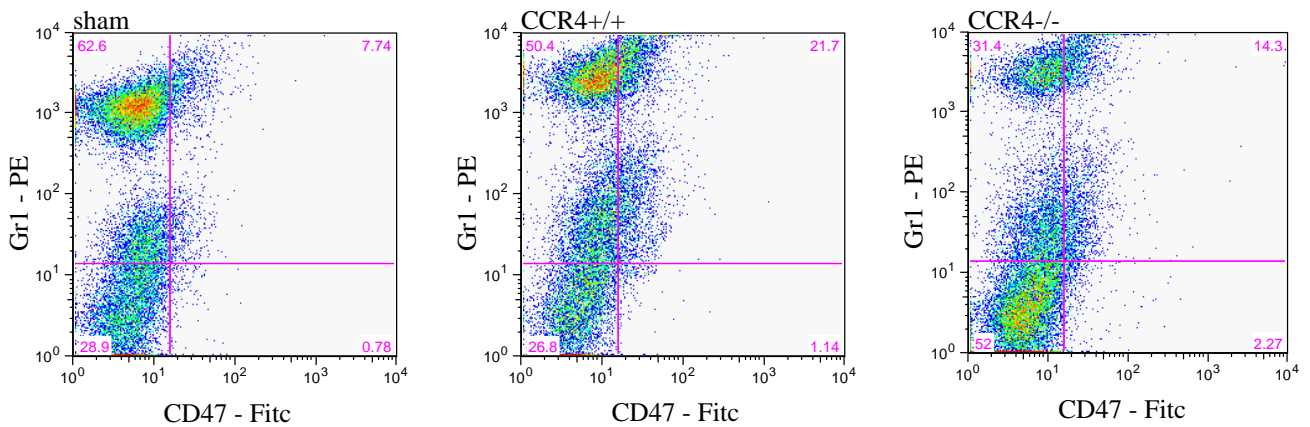


Abb. 3.5.5: Expression von CD47 auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 3 Stunden nach sham bzw. 16G CASP bei CCR4^{+/+} und CCR4^{-/-} -Mäusen

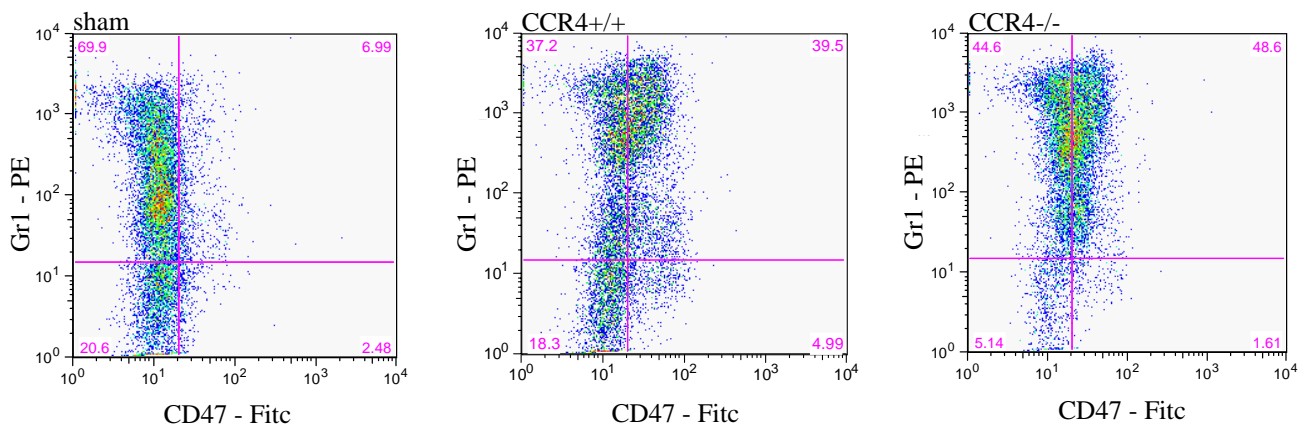


Abb. 3.5.6: Expression von CD47 auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 12 Stunden nach sham bzw. 16G CASP bei CCR4^{+/+} und CCR4^{-/-} -Mäusen

Die Dot Plots zeigen die Färbungen mit gegen den aktivitätstypischen Oberflächenmarker CD47 gerichteten Antikörpern und dem Granulozytenmarker Gr1. Die stark Gr1-positive Population stellt die Granulozyten dar. Die Zellen mit niedriger Expressionsdichte des CD47 sind vor allem Makrophagen.

In den sham-Kontrollen zeigten sich erwartungsgemäß mit Prozentsätzen von 7,7 % nach 3 Stunden bzw. 7 % nach 12 Stunden niedrige Dichten des CD47 – Proteins. Dahingegen fand sich in der CCR4 +/+ -Kontrolle eine Aktivierung sowohl der Granulozyten als auch der Makrophagen mit rund 22 % nach 3 Stunden und 40 % nach 12 Stunden. Bei den CCR4 -/- -Mäusen konnten für die Gr1-PE / CD47 – Fitc doppelpositiven Zellen Prozentsätze von 14 % bzw. 49 % gemessen werden, die in der Größenordnung der Wildtypkontrollen lagen. Dennoch scheint hier im Vergleich zu den CCR4 – positiven Kontrollen eventuell eine verzögerte Aktivierung stattzufinden.

Somit ergaben sich in der Aktivitätsmessung über die Analyse der Expressionsdichte von CD47 3 Stunden nach 16G CASP für die Knockout-Maus keine eindeutigen Unterschiede (vgl Abb. 3.5.7).

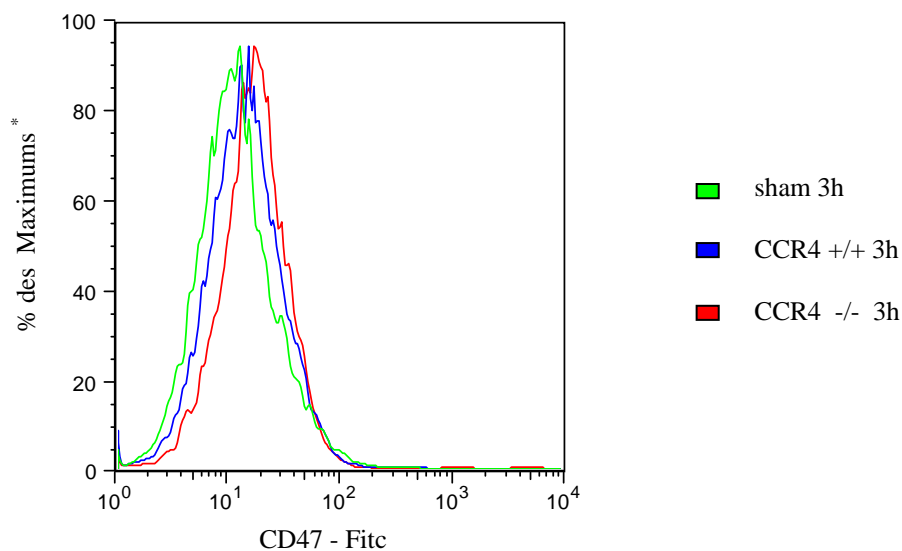


Abb. 3.5.7: Grafische Gegenüberstellung der Expressionsdichte von CD47 3 Stunden nach sham-OP bzw. 16G CASP bei CCR4+/+ und CCR4-/- -Mäusen;

* „% des Maximums“ ist der Quotient der Anzahl an Ereignissen bei den verschiedenen Fluoreszenzintensitäten bezogen auf die höchste gemessene Anzahl an Ereignissen der jeweiligen Messung; dadurch ergibt sich eine Vergleichbarkeit der im Histogramm gegenübergestellten Grafen, die zum Teil deutlich verschiedene Anzahlen an Ereignissen aufweisen

3.5.2 Expressionsverhalten des Oberflächenrezeptors $F_c\gamma R_{III}$

Mit dem Ziel, einen möglichen Unterschied in der Aktivierung von in die Bauchhöhle eingewanderten Granulozyten bei CCR4-positiven und CCR4-negativen Mäusen nach 16G CASP zu finden, wurden die in der Peritoneallavage isolierten Zellen mit einem spezifisch gegen den $F_c\gamma$ -Rezeptor III gerichteten Antikörper gefärbt. Dieser Oberflächenrezeptor auf Granulozyten, aber auch NK-Zellen und Makrophagen vermittelt Phagozytose und die zellvermittelte Zytotoxizität nach Bindung / Markierung der Antigene durch Antikörper der Klasse IgG. Um unspezifische Bindungen von Immunglobulinen an den $F_c\gamma R_{III}$ von der gerichteten Interaktion mit dem Fitc-markierten Antikörper zu differenzieren, wurde die im Abschnitt 2.3.4 beschriebene Kontrollfärbung mit Fitc-markierten Antikörpern gegen die CH3-Domäne von IgG durchgeführt.

Die folgenden Abbildungen 3.5.8 – 11 zeigen diese Auswertungen an sham-operierten, sowie CCR4+/+ - und CCR4-/- -Mäusen 3 Stunden nach 16G CASP bei Färbung gegen Gr1 - PE. In den Abbildungen 3.5.12 – 15 sind die Messungen nach 12 Stunden dargestellt.

Messungen 3 Stunden nach 16G CASP:

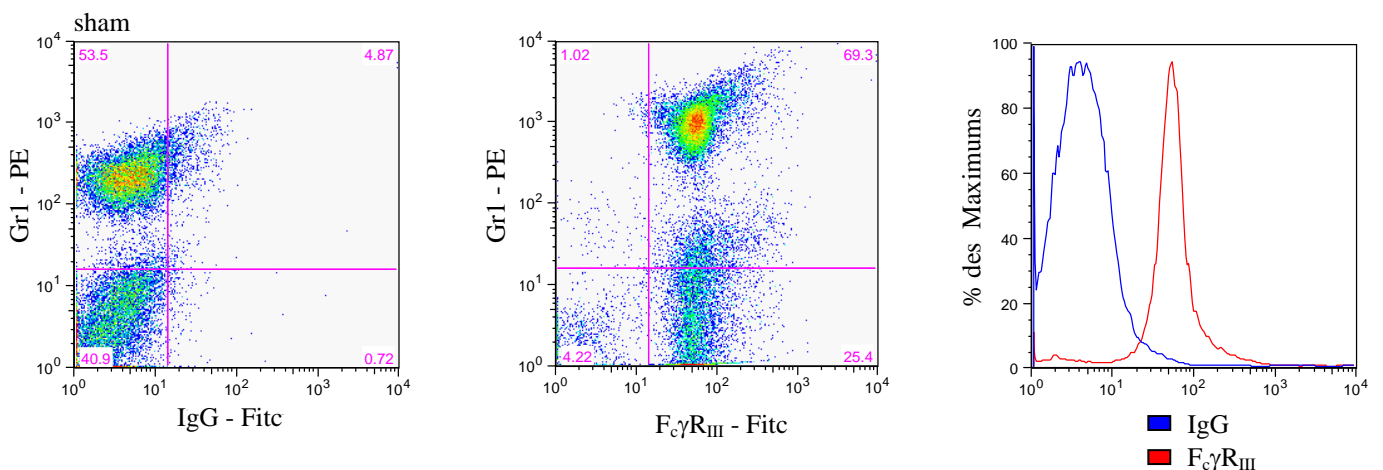


Abb. 3.5.8: Kontrolle der unspezifischen IgG-Bindung im Vergleich zur Expression von $F_c\gamma R_{III}$ auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 3 Stunden nach sham-Operation

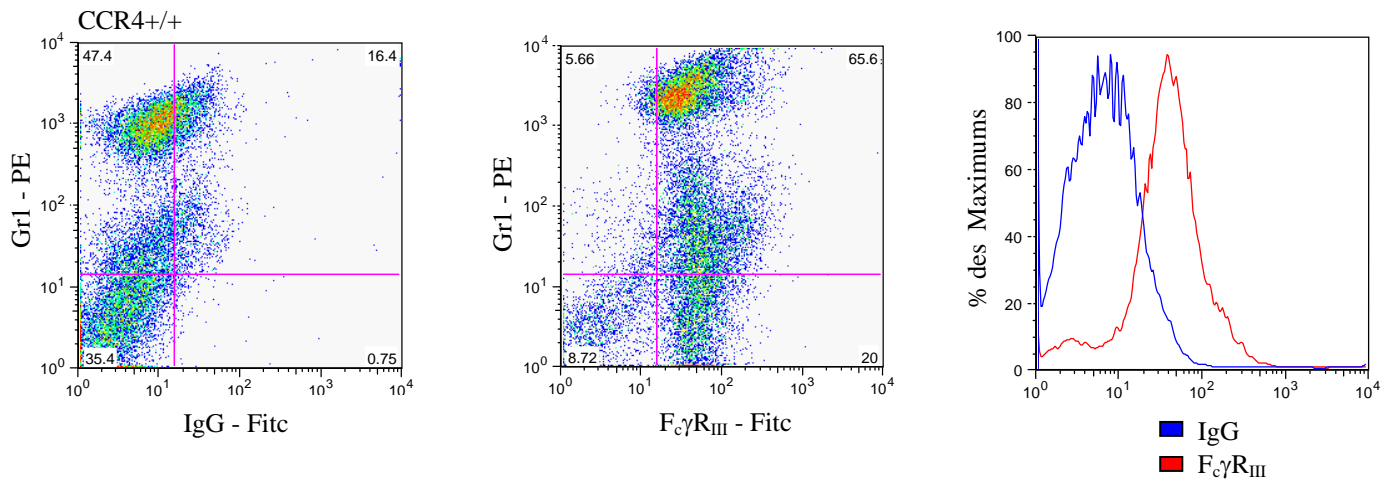


Abb. 3.5.9: Kontrolle der unspezifischen IgG-Bindung im Vergleich zur Expression von $F_c\gamma R_{III}$ auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallave 3 Stunden nach 16G CASP bei CCR4+/+ - Mäusen

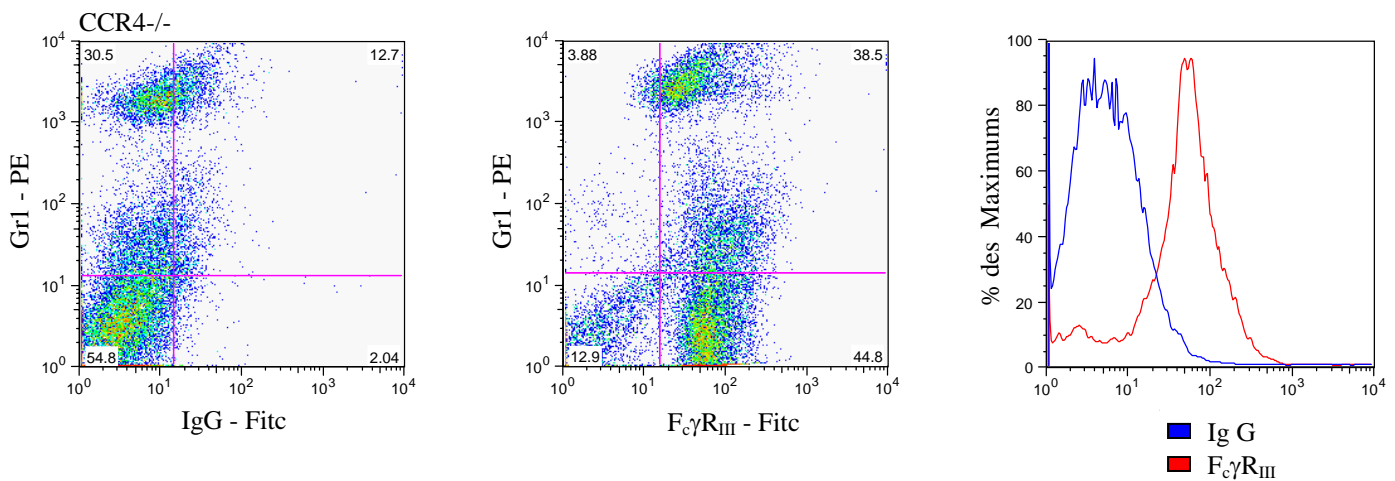


Abb. 3.5.10: Kontrolle der unspezifischen IgG-Bindung im Vergleich zur Expression von $F_c\gamma R_{III}$ auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallave 3 Stunden nach 16G CASP bei CCR4-/- -Mäusen

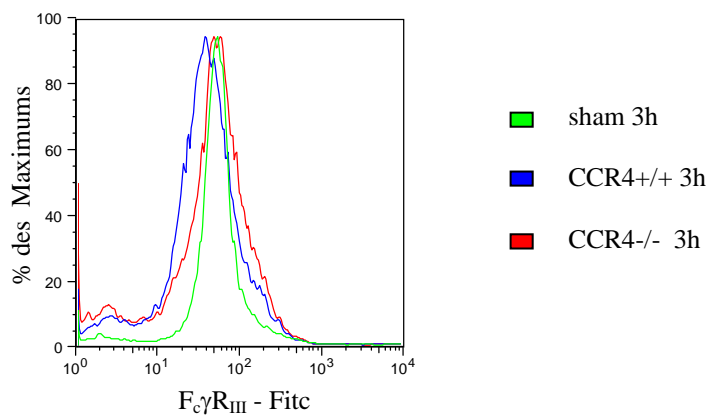


Abb. 3.5.11: Grafische Gegenüberstellung der Expressionsdichte des $F_c\gamma R_{III}$ 3 Stunden nach sham-OP bzw. 16G CASP bei CCR4+/+ und CCR4-/- -Mäusen

Messungen 12 Stunden nach 16G CASP:

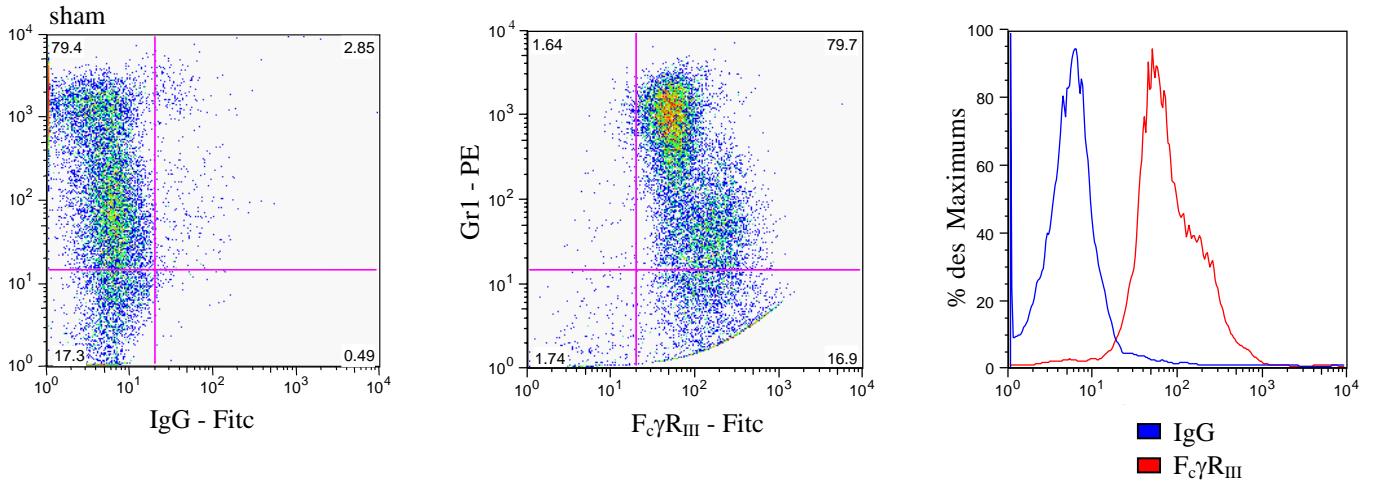


Abb. 3.5.12: Kontrolle der unspezifischen IgG-Bindung im Vergleich zur Expression von $F_c\gamma R_{III}$ auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 12 Stunden nach sham-Operation

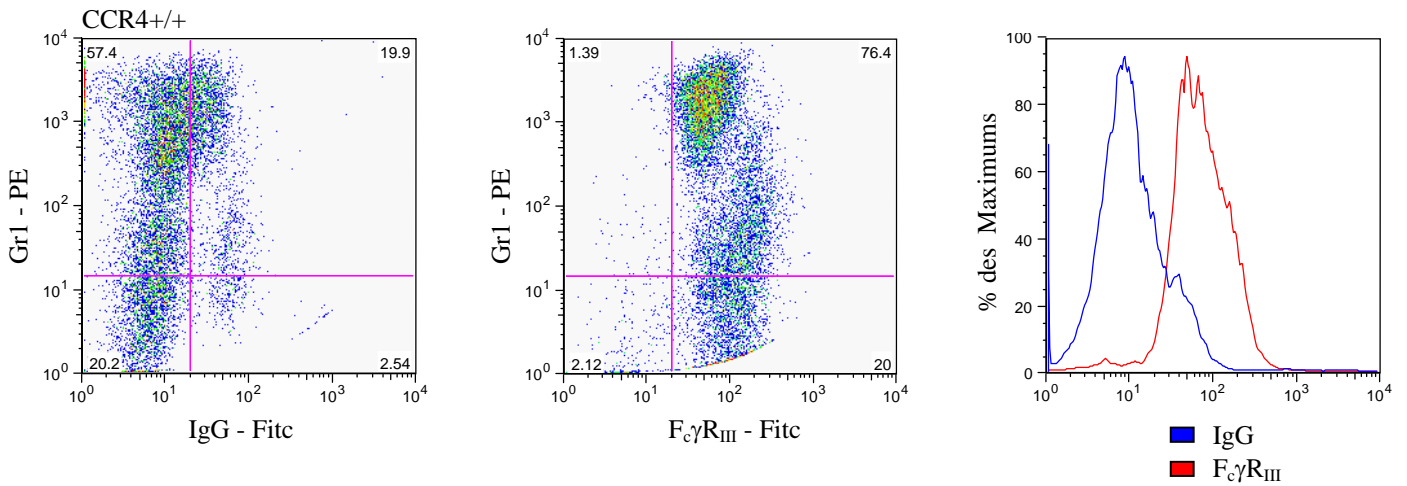


Abb. 3.5.13: Kontrolle der unspezifischen IgG-Bindung im Vergleich zur Expression von $F_c\gamma R_{III}$ auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 12 Stunden nach 16G CASP bei CCR4^{+/+} - Mäusen

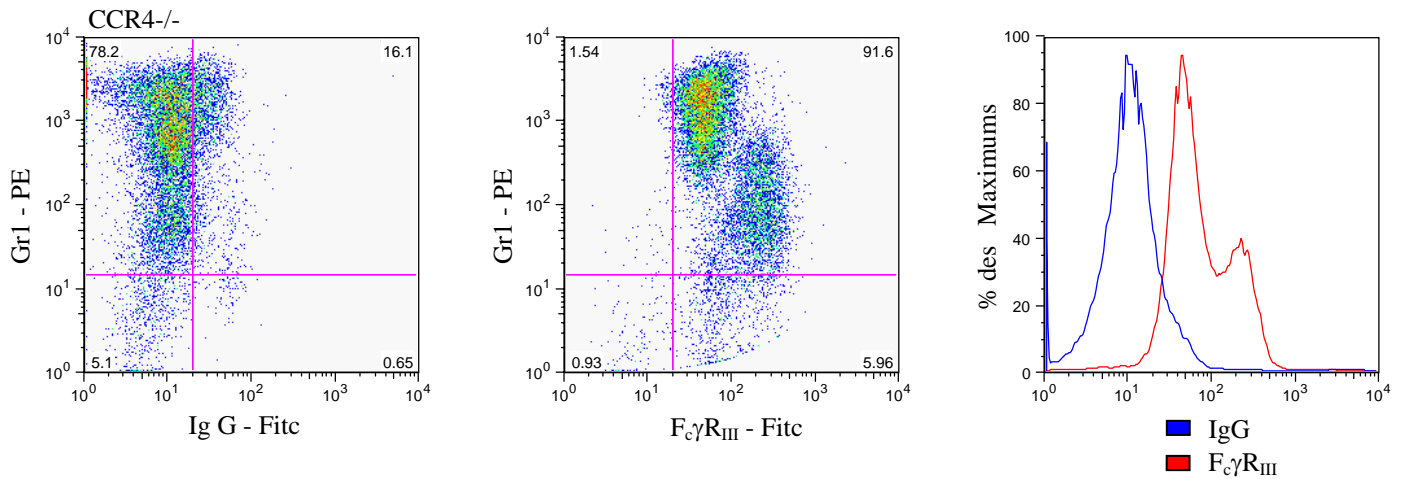


Abb. 3.5.14: Kontrolle der unspezifischen IgG-Bindung im Vergleich zur Expression von $F_c\gamma R_{III}$ auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 12 Stunden nach 16G CASP bei CCR4^{-/-} - Mäusen

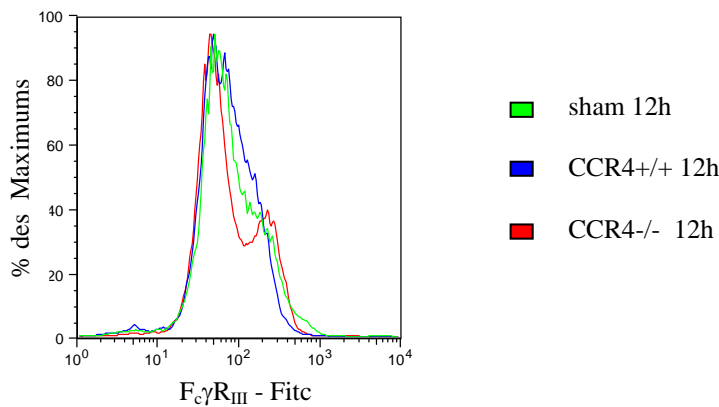


Abb. 3.5.15: Grafische Gegenüberstellung der Expressionsdichte des $F_c\gamma R_{III}$ 12 Stunden nach sham-OP bzw. 16G CASP bei CCR4^{+/+} und CCR4^{-/-} -Mäusen

Der Vergleich der IgG-Fitc-Färbung mit der jeweils entsprechenden $F_c\gamma R_{III}$ -Fitc-Färbung zeigt in allen sechs Abbildungsreihen, dass die Spezifität der Bindung des anti- $F_c\gamma R_{III}$ -Antikörpers nachgewiesen werden konnte. Die IgG-Färbung weist im rechten oberen Quadranten eine deutlich geringere Fitc-Fluoreszenz als die korrespondierende anti- $F_c\gamma R_{III}$ -Markierung auf. Dies ist in den jeweils zuletzt gezeigten Kurvendarstellungen der Fitc-Intensität in Bezug auf % des Maximums (s.o.) nochmals vergleichend dargestellt. Es zeigt sich der jeweils deutliche Shift nach rechts als Zeichen der gewünschten gerichteten Markierung des $F_c\gamma R_{III}$.

Der Vergleich der drei verschiedenen Versuchsgruppen untereinander zeigt bei den Gr1-PE / FcγR_{III}-Fitc doppelpositiven Zellcounts sowohl nach 3 als auch nach 12 Stunden geringe Unterschiede in der Aktivierung dieser Zellen.

Analog der CD47 – Messung kann eine bei 3 Stunden scheinbar verzögerte, nach 12 Stunden aber meßbare Zunahme der Expression von FcγR_{III} auf Gr1-PE tragenden Peritonealzellen bei den CCR4 – Knockout – Mäusen vermerkt werden.

3.6 Rekrutierung von Peritonealmakrophagen nach Thioglykolinjektion

Fünf Tage nach intraperitonealer Injektion von 3 ml Thioglykolat wurden die in die Peritonealhöhle eingewanderten Makrophagen im Mikroskop ausgezählt. In der CCR4-negativen Versuchsgruppe liegt der Mittelwert der Anzahl eingewanderter Makrophagen deutlich unter dem der rezeptorpositiven Vergleichstiere.

In Tab. 3.6.1. sind die Ergebnisse einzeln aufgelistet.

	Auszählung der Zellen	Mittelwert	p-Wert (CCR4+/+ vs. CCR4-/-) Mann-Whitney Test
CCR4 +/+	3,7 x 10 ⁶ Zellen / ml	4,0 x 10 ⁶ Zellen / ml	p=0,10
	4,5 x 10 ⁶ Zellen / ml		
	3,7 x 10 ⁶ Zellen / ml		
CCR4 -/-	2,3 x 10 ⁶ Zellen / ml	2,4 x 10 ⁶ Zellen / ml	
	2,7 x 10 ⁶ Zellen / ml		
	2,3 x 10 ⁶ Zellen / ml		

Tab. 3.6.1: Auszählung der Peritonealmakrophagen nach intraperitonealer Thioglykolinjektion

4 Diskussion

Die pathogenetischen Grundlagen und Zusammenhänge der Sepsis als schwerwiegende Komplikation nach abdominalchirurgischen Eingriffen ist Gegenstand intensiver Forschung. Mit dem ständig wachsenden Zugewinn an Wissen über die Interaktionen von zellulären und humoralen Komponenten immunologischer Prozesse steigt auch das Interesse an den Auswirkungen gezielter Knockouts einzelner Faktoren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen des Knockouts des CC-Chemokinrezeptors 4 auf die Sepsis nach Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) bei Mäusen zu erfassen. Die CASP mit einem Stentdurchmesser von 16G hat sich als geeignetes, subletales Mausmodell für die abdominelle, polymikrobielle Sepsis erwiesen [64, 79, 80].

Das Überleben nach 16G CASP zeigte einen deutlichen Vorteil für die CCR4^{-/-}-Mäuse, die mit einem Gesamtüberleben von 20% besser abschnitten als die CCR4^{+/+}-Kontrollen mit nur 5% ($p=0,0996$, nicht signifikant). Auffallend war der Vergleich 48h nach 16G CASP, denn zu diesem Zeitpunkt war in der C57BL/6-Kontrollgruppe (= CCR4^{+/+}) die Letalität von 95% bereits erreicht, in der CCR4^{-/-}-Gruppe waren noch ca. 35% der Tiere am Leben (vgl. Abb. 3.1.1). Dies spricht zusammen mit dem zeitlich verzögert einsetzenden Versterben der CCR4^{-/-}-Mäuse für einen gegenüber dem Wildtyp veränderten Ablauf der Immunmechanismen. In der CCR4-defizienten Maus wirkte sich dies positiv auf das Gesamtüberleben aus. Übereinstimmende Ergebnisse fanden Chvatchko et al. nach der intraperitonealen Injektion von LPS (60 mg/kg) oder LPS (1/2/4 μ g) und D-Galactosamin (8 mg) [10]. Um die genaueren Hintergründe dieser Beobachtungen zu erfahren, wurden für septische Geschehen typische Zytokine untersucht und der Effekt der 16G CASPI geprüft. Wenn die CCR4^{-/-}-Mäuse tatsächlich verzögert oder in der Anfangsphase der Peritonitis bzw. Sepsis nach 16G CASP anders reagieren als der Wildtyp, so müßte eine frühzeitige Intervention den Überlebensvorteil noch deutlicher offenbaren.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten 16G CASPI (5h) ließ sich eindeutig nachweisen, dass der CCR4-Knockout die Reaktion des Organismus dahingehend verändert, dass die Sanierung des septischen Fokus die Gesamtletalität weiter reduziert. In der Kontrollgruppe (= CCR4^{+/+}) waren nach 48 Stunden noch 20%, in der Versuchsgruppe (= CCR4^{-/-}) noch 62,5% der Tiere am Leben. Da 50% der Tiere in der

CCR4^{-/-} -Gruppe die 16G CASPI überlebten, in der CCR4^{+/+} -Kontrollgruppe hingegen nur 20%, ergibt sich ein signifikanter ($p= 0,0246$) Vorteil aus dem Verlust des CC Chemokinrezeptors 4. Auch Chvatchko et al. bemerkten neben dem Überlebensvorteil eine in der Frühphase der durch LPS induzierten Peritonitis abgeschwächte Reaktion auf den immunologischen Reiz. Dies könnte einerseits durch eine effektiver einsetzende Abwehr erklärt werden, andererseits durch weniger starke (Neben-)Wirkungen der Zytokine aufgrund geringerer Serumspiegel in der Knockout-Maus. Die Beobachtung, dass Zytokine neben den erwünschten Effekten auf das immunologische Geschehen auch negative Auswirkungen haben, ist schon länger bekannt [16, 40, 50, 71]. So scheint für die positiven Effekte des CCR4^{-/-} -Verlustes (wie weiter unten beschrieben) eine geringere „Vergiftung“ mit Zytokinen sowohl in der Frühphase als auch im Verlauf der Sepsis entscheidend zu sein.

Betrachtet man die durchgeführten bakteriologischen Analysen der Peritoneallavage nach 16G CASP, so ergab sich erwartungsgemäß - trotz starker Unterschiede in der quantitativen Auswertung - kein Unterschied in der qualitativen Aufschlüsselung (siehe Tab. 3.2.1). Dies war eine Grundvoraussetzung für die Aussagefähigkeit aller Beobachtungen, da nur bei einer identischen bakteriellen Ausgangs- bzw. Normalflora des Darmes von gleichen Reizen und somit Abwehrreaktionen des Immunsystems ausgegangen werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass der CCR4-Knockout womöglich entscheidende Auswirkungen auf die Abwehr von Bakterien hat. In der frühen Phase der Peritonitis 3 und 6 Stunden nach 16G CASP zeigten sich keine großen Unterschiede in den KBE/ml. Tendentiell lagen die Werte der CCR4^{+/+} -Mäuse jedoch geringfügig höher. Enterokokken dominierten zu diesem Zeitpunkt mit 60 – 75% der Kolonien in beiden Gruppen. Während bei den CCR4^{+/+} -Mäusen nach 6 Stunden gramnegative Stäbchen zu finden waren, traten diese in der CCR4^{-/-} -Gruppe erst nach 12 Stunden auf. Ab 12 Stunden nach 16G CASP dominierten in beiden Gruppen gramnegative Stäbchen. Die quantitativen Vergleiche 12 bzw. 20 Stunden nach 16G CASP zeigten jedoch eine deutlich niedrigere Konzentration an Bakterien in der Peritoneallavage der CCR4^{-/-} -Mäuse. Nach 12 Stunden betrug die durchschnittliche Bakterienkonzentration der Peritoneallavage der CCR4^{+/+} -Gruppe das 24,5fache, der p -Wert lag bei $p= 0,057$ und war somit nahezu signifikant. Die mittlere Bakterienkonzentration der Peritoneallavage in der CCR4^{-/-} -Gruppe blieb von da an nahezu konstant, die CCR4^{+/+} -Kontrolle erreichte nach 20 Stunden einen 123fach höheren Wert ($p= 0,1$). Da über den 16G Stent gleiche Mengen Fäzes in die

Peritonealhöhle austreten, scheinen die CCR4-defizienten Mäuse besser mit der bakteriellen Invasion fertig zu werden. Auch scheint das Auftreten der gramnegativen Stäbchenbakterien verzögert zu werden.

Sowohl die zellulären Untersuchungen nach CASP als auch die Messungen von Chvatchko et al. am LPS-Modell [10] ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der nach intraperitoneal eingewanderten Granulozyten. Dieses Ergebnis ist durchaus zu erwarten gewesen, da der CC-Chemokinrezeptor 4 nicht typischerweise auf diesen Zellen in hoher Dichte exprimiert wird und zahlreiche andere, stärker chemotaktisch wirkende Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und Integrine die Migration steuern. Auch konnte mittels der durchgeführten Aktivitätsfärbungen auf CD47 und $Fc\gamma R_{III}$ keine signifikant erhöhte oder verminderte Aktivierung der eingewanderten Granulozyten im Vergleich zur CCR4^{+/+}-Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Ähnliche Ergebnisse wurden schon in anderen Arbeiten beobachtet. In experimentellen Peritonitis-Modellen konnte gezeigt werden, dass Neutralisation mittels Antikörpern oder Knockouts von MIP-2 und Mastzellen (Histaminproduktion) [43] sowie MIP-1 α [49] teilweise signifikant die Extravasation von Leukozyten reduziert und das Überleben einer schweren Peritonitis verbessert. Durch Gabe von anti-MIP-2-Antikörpern vor Induktion einer bakteriellen Sepsis im CLP-Modell in der Maus sank die peritoneale Besiedelung mit neutrophilen Granulozyten [44], stieg die Überlebensrate der so therapierten Gruppe und die Sepsis fiel schwächer aus [71].

Diese Ergebnisse zeigten das bereits erwähnte, vielfach beobachtete Phänomen, dass scheinbar für die Bekämpfung der bakteriellen Peritonitis nützliche Chemokine (Extravasation, Chemotaxis, Aktivierung von Leukozyten) ebenso schädlich für den Verlauf der Sepsis sein können.

Die Vermutung liegt nahe, dass weniger die unspezifisch-zellulären, granulozytären sondern hauptsächlich die humoralen (Zytokine, Chemokine) und die davon abhängigen spezifischen (T-Zellen) Anteile der Immunabwehr durch den CCR4-Knockout beeinflusst werden.

Wie auch bereits Chvatchko et al. zeigen konnten, ist die Anzahl der nach intraperitonealer Thioglykolinjektion eingewanderten Makrophagen in CCR4^{-/-}-Mäusen niedriger. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe mittels FACS-Analyse nachweisen, dass Lymphozyten und F4/80⁺ Makrophagen, eine Subpopulation von Makrophagen in der Peritoneallavage von CCR4^{-/-}-Mäusen, einige Zeit nach LPS-Stimulation deutlich abgenommen haben. Dies stimmt mit der von ihnen beobachteten

zeitlich sinkenden mRNA-Expression der für Makrophagen typischen Chemokine MIP-2 [15] und MDC [20] in Peritonealzellen überein. Gleiches ist für die 16G CASP anzunehmen. Es wird spekuliert, dass in CCR4-defizienten Mäusen ein Defekt vorliegt, der es erschwert, diese Zellen in der Peritonealhöhle zurückzuhalten. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf den Grund der „LPS-Resistenz“ [10] und somit auch des besseren Überlebens nach 16G CASP bei CCR4-negativen Mäusen sein. Es wird eine auf den septischen Reiz hin stark einsetzende, sehr schnell eine hohe Aktivität erreichende und schließlich eine den Organismus gefährdende peritoneale, später systemische Immunreaktion angenommen. Während sich im Wildtyp die Wirkungen und auch unerwünschten (überschießenden) Nebenwirkungen der zellulären und humoralen Immunantwort maximal entwickeln, sistiert die Abwehr in CCR4^{-/-}-Mäusen auf einem niedrigeren, dadurch weniger autoaggressiven und somit effizienteren Niveau. So wirkt sich der Immundefekt bezüglich des CC Chemokinrezeptors 4 vielleicht durch eine drosselnde Wirkung auf die selbstgefährdende Immunantwort positiv auf die Bekämpfung der Sepsis und das Überleben aus.

In den bakteriologischen Untersuchungen der Organe konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich der CCR4-Knockout nicht nur auf das peritoneale Geschehen auswirkt, sondern erwartungsgemäß die systemische Immunantwort insgesamt verändert. Verschiedene Organe reagieren mit einem organtypischen Expressionsmuster an Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Integrinen und folglich auch verschiedenen Einwanderungsprofilen von Abwehrzellen [44, 75]. Somit ist zu erklären, dass die verschiedenen Organe unterschiedlich auf septische Reize reagieren und sich dies in der Sekretion von Chemokinen und Zytokinen [43, 44, 71, 59] sowie konsekutiv der Abwehr gegenüber Bakterien widerspiegelt. Die Leber, die nach dem Blut über den portalvenösen Zufluss als erstes Organ mit der Peritonitis konfrontiert wird, ist in den CCR4^{-/-}-Mäusen im Durchschnitt um den Faktor 25 geringer bakteriell besiedelt. Der p-Wert erreicht hier mit $p=0,057$ nahezu Signifikanz. Auch in der Milz, im Blut und in der Lunge konnten sichtbare Unterschiede im bakteriellen Befall festgestellt werden. Der Gendefekt bewirkt somit in den CCR4^{-/-}-Mäusen eine geringere Ausbreitung der in den Blutkreislauf übergetretenen Bakterien und/oder hat eine effektivere Abwehr vor Ort zur Folge.

Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob in CCR4-defizienten Mäusen eine veränderte Zytokinproduktion in den Organen nachweisbar ist. Mittels ELISA wurden die Konzentrationen von IFN γ in Leber und Milz verglichen; aus Vorversuchen war bekannt, dass IFN γ im Serum nicht nachweisbar ist [80]. IFN γ ist ein starkes proinflammatorisches

Zytokin, welches die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine sowie die Phagozytose und Antigenpräsentation von mononukleären Phagozyten steigert. So spielt $\text{IFN}\gamma$ eine Rolle bei der Abwehr von Bakterien, in der Mobilisierung weiterer Abwehrinstanzen, aber auch in der Entstehung des gefährlichen septischen Schocks mit autoaggressiver Zerstörung von Organsystemen. Mäuse ohne $\text{IFN}\gamma$ oder ohne $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptor zeigten in anderen Arbeiten einerseits ein deutlich schlechteres Überleben nach 18G CASP [80], andererseits aber eine geringere Empfindlichkeit gegenüber hochdosierten LPS-Injektionen [9, 22]. Die in der Leber gemessenen Konzentrationen von $\text{IFN}\gamma$ lagen in allen Versuchsgruppen nahe der Nachweisgrenze und sind somit nur begrenzt verwertbar. In den $\text{CCR4}^{+/+}$ -Mäusen lagen sie 3 und 6 Stunden nach 16G CASP über den Kontrollwerten der sham-Operationen, wohingegen die $\text{CCR4}^{-/-}$ -Mäuse zu allen Messzeitpunkten in der Nähe der Konzentrationen nach sham-CASP auf bleibend niedrigem Niveau lagen. In der Milz war das Ergebnis der Messungen von $\text{IFN}\gamma$ deutlicher. In den CCR4 -defizienten Mäusen blieb der $\text{IFN}\gamma$ -Spiegel auf niedrigem Niveau, wohingegen er in der CCR4 -positiven Vergleichsgruppe von anfänglich hohen Konzentrationen bis 12 Stunden nach dem Eingriff abfiel. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Mäuse ohne CCR4 -Chemokinrezeptor 4 nach 16G CASP nicht mit einem drastischen Anstieg der $\text{IFN}\gamma$ -Produktion (in Leber und Milz) antworten (können), da auch die sham-operierten $\text{CCR4}^{+/+}$ -Mäuse mit anfänglich hohen Spiegeln reagieren.

Diese Beobachtungen passen zu der von Zantl et al. aufgestellten Hypothese, daß $\text{IFN}\gamma$ vor allem in der Milz als Abwehrstation eines systemischen Bakterienbefalls notwendig ist [80]. Dahingehend produzieren die $\text{CCR4}^{-/-}$ -Mäuse scheinbar ausreichende, wenn auch geringe Mengen an $\text{IFN}\gamma$, da $\text{IFN}\gamma$ -defiziente Mäuse die 18G CASP nicht überleben. Andererseits liegen die $\text{IFN}\gamma$ -Konzentrationen aber auch niedrig genug, um die CCR4 -Knockout-Mäuse vor einer durch zu hohe Spiegel verursachten autoaggressiven Wirkung des $\text{IFN}\gamma$ zu bewahren. So könnte der Verlust des CCR4 -Chemokinrezeptors 4 einen positiven Effekt auf die balancierte $\text{IFN}\gamma$ -Produktion nach 16G CASP haben.

Da das SIRS und vor allem die Sepsis ein den gesamten Organismus betreffender Prozess sind, wurden neben den lokalen Zytokinbestimmungen auch Untersuchungen im Serum durchgeführt. Mittels ELISA wurden IL-10, $\text{TNF}\alpha$, IL-12p40 und IL-18 im Serum jeweils 3, 6 und 12 Stunden nach 16G CASP gemessen.

IL-10 ist bekannt als vorwiegend antiinflammatorisches Zytokin, welches unter anderem die überschießende Produktion proinflammatorischer Zytokine, die Antigenpräsentation durch mononukleäre Phagozyten sowie den „oxidative burst“ drosselt [12, 45]. Emmanuilidis et al. konnten nachweisen, dass systemisches IL-10 bei Peritonitis zum weitaus größten Anteil aus hepatischen Makrophagen, den Kupffer-Zellen stammt [16]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass IL-10 eine protektive Rolle in der septischen Peritonitis bei Mäusen hat [60, 68, 70]. Insbesondere scheinen anfänglich hohe und im weiteren Verlauf relativ niedrige Serumspiegel von IL-10 den besten Effekt auf die Abwehr einer Peritonitis zu haben. Hohe Konzentrationen an IL-10 zu Beginn der Peritonitis könnten notwendig sein, da so eine schädliche, überschießende Zytokinantwort früh gedämpft werden könnte. In der Spätphase der Sepsis hingegen verursachen hohe Spiegel womöglich immunsuppressive Mechanismen und/oder eine Dysbalance zwischen T_H1- und T_H2-Zellen [16, 58, 72, 80]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ELISAs zur Bestimmung der IL-10-Spiegel nach 16G CASP zeigten für die CCR4^{-/-}-Gruppe einen hohen Anfangswert nach 3 Stunden, der in der gleichen Größenordnung wie der der CCR4^{+/+}-Mäuse lag. Im weiteren Verlauf nach 6 und 12 Stunden blieben die IL-10-Konzentrationen in der CCR4-defizienten Gruppe auf diesem Niveau ohne weiter anzusteigen, was in der CCR4-positiven Kontrollgruppe hingegen der Fall war. Somit ergab sich für die CCR4-Knockout-Mäuse die oben genannte, scheinbar protektive Konstellation einer anfangs hohen und bremsend wirkenden, später dann aber niedrigen und somit nicht immunsuppressiv wirkenden IL-10-Serumkonzentration.

TNF α mit seinen lokalen und auch systemischen Effekten [15, 28, 36, 29, 38, 39] auf das Sepsisgeschehen wurde in den Serumproben der CCR4^{-/-}-Mäuse zu allen drei Zeitpunkten nach 16G CASP in deutlich geringeren, nach 6 Stunden nahezu signifikant niedrigeren Konzentrationen gemessen als in den CCR4-positiven Kontrollen. Diese zeigten einen kräftigen Anstieg des TNF α -Spiegels, der nach 12 Stunden einen 12fach höheren Wert als in den Knockoutmäusen erreichte. Diese Ergebnisse decken sich mit den bereits im LPS-Modell und durch in vitro Stimulation von CCR4^{-/-}-Peritonealzellen mit LPS beobachteten, dort signifikant niedrigen Messwerten für TNF α , MIP-1 α und IL-1 β [10]. Somit scheint die LPS-Resistenz und das bessere Überleben nach 16G CASP unter anderem auf die verminderte TNF α -Produktion der CCR4^{-/-}-Mäuse zurückzuführen zu sein. Diese Beobachtung legen die bereits von Chvatchko et al. geäußerte Vermutung nahe, dass der CC-Chemokinrezeptor 4 (zumindest indirekt) in die Produktion von TNF α und anderen Zytokinen eingreift [8]. Daneben bleibt jedoch die

Möglichkeit, dass $\text{TNF}\alpha$ auch durch die Veränderungen in der Zytokinsekretion konsekutiv weniger produziert wird. Emmanuilidis et al. konnten dies in der CASP jedoch für $\text{TNF}\alpha$, IL-18 und IL-12 bei experimentell stark reduzierten IL-10-Spiegeln ausschließen [16].

Es kommt durch den Verlust des CCR4 *nicht* zu der überschießenden, gefährlichen Überproduktion von $\text{TNF}\alpha$, die vor allem in der Frühphase mit einer erhöhten Letalität assoziiert zu sein scheint [16, 29, 36, 40, 50]. Klinisch könnte der niedrigere $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel mitverantwortlich für die gegenüber dem Wildtyp verzögert einsetzende Sterblichkeit, das insgesamt höhere Überleben und natürlich den signifikanten Vorteil in der CASPI sein [13, 14].

Der zeitliche Verlauf von IL-12 als typischem proinflammatorischen Zytokin mit dem Effekt der Stimulation von zellvermittelter Immunabwehr, Induktion von $\text{IFN}\gamma$ und Aktivierung von $\text{T}_\text{H}1$ -Zellen [14, 62, 66] wurde mittels ELISA aus Serumproben untersucht. Die 40kD-Untereinheit des heterodimeren IL-12 (= IL-12p40) wurde in den Serumproben der CCR4^{-/-}-Mäuse zu allen drei Messzeitpunkten höher als in den CCR4^{+/+}-Kontrollen gemessen. In der frühen Phase (3 Stunden) der Peritonitis nach 16G CASP zeigte sich mit einem p-Wert von $p=0,056$ eine fast signifikant erhöhte IL-12p40-Konzentration bei den CCR4-defizienten Mäusen. Diese Beobachtung im Serum von CCR4^{-/-}-Mäusen, welche eine Sepsis nach 16G CASP und vor allem nach 16G CASPI deutlich besser überleben, lässt sich sehr gut mit bereits bekannten Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen vergleichen. So zeigte sich beispielsweise bei Patienten mit niedrigen IL-12-Spiegeln durch verminderte Produktion in Monozyten eine starke Korrelation zu einem postoperativ schweren septischen Verlauf [21]. Neutralisation von IL-12 mittels monoklonaler Antikörper zeigte einen drastischen Nachteil im Überleben nach CLP [61]. Weiterhin ist bekannt, dass eine frühe [21] und ausreichend hohe IL-12-Produktion [14, 74] entscheidend für den positiven Verlauf einer Sepsis ist. Die IL-12-Serumwerte in der CCR4^{-/-}-Gruppe zeigten die beiden genannten, günstigen Charakteristika: ein früher, hoher IL-12-Peak und im Verlauf anhaltend hohe IL-12-Konzentrationen im Serum [14, 21, 58, 74]. Die vergleichsweise hohen IL-12-Spiegel (im Vergleich zu den CCR4-positiven Tieren) sind anscheinend aber nicht dermaßen erhöht, um zu einer überschießenden, autoaggressiven und damit in Hinsicht auf das Überleben nach 16G CASP wiederum schädlichen Wirkung des IL-12 zu führen. Vergleicht man die Messwerte der sham- und der CCR4^{+/+}-Gruppe, so konnte kein deutlicher Unterschied der Konzentrationen von IL-12p40 gefunden werden. Eine Induktion und somit Erhöhung

von IL-12p40 im Vergleich zur sham-Operation scheint durch Vorhandensein des CCR4 nicht zu erfolgen.

Das proinflammatorische Zytokin IL-18 hat zusammen mit IL-12, das die Expression des IL-18-Rezeptors steuert [33], eine synergistische Wirkung auf die Produktion von IFN γ [32, 46]. IL-18 $^{-/-}$ -Mäuse tolerieren eine 50% höhere LPS-Dosis als IL-18 $^{+/+}$ -Kontrollen [23] und überleben die 16G CASP signifikant besser [17]. Somit scheint IL-18 eine wichtige Rolle in der Abwehr einer Peritonitis bzw. Sepsis zuzukommen. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen stieg der IL-18-Spiegel im Serum der CCR4 $^{+/+}$ -Kontrolltiere kontinuierlich an. Dahingegen zeigte der Verlauf im Serum der CCR4-defizienten Mäuse einen signifikant erhöhten Wert für IL-18 nach 3 Stunden mit einem anschließenden Abfall auf einen signifikant erniedrigten Serumwert nach 12 Stunden. Für diese Konstellation ist in der Frühphase am ehesten die bekannte, synergistische Wirkung mit IL-12 von Bedeutung, da somit wahrscheinlich die frühe Wirkung hoher IL-12-Spiegel [21] unterstützt wird. In den späten Messungen könnte die dort signifikant erniedrigte IL-18-Serumkonzentration an der besseren Abwehr und dem damit besseren Überleben nach 16G CASP analog den für IL-18 $^{-/-}$ -Mäuse gemachten Beobachtungen beteiligt sein. Der Mechanismus der protektiven Wirkung niedrigerer IL-18-Spiegel könnte einerseits in einer Veränderung der Differenzierung von T $_H$ 1- und T $_H$ 2-Zellen liegen [34, 62], ebenso ist aber - vor allem angesichts des kurzen Zeitraumes nach CASP - eine Wirkung über die induzierte IFN γ -Sekretion denkbar. Die niedrige IL-18-Konzentration nach 12 Stunden könnte einen Einfluss auf die o.g. balancierte IFN γ -Produktion nach 16G CASP haben.

So legen die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse die Schlussfolgerung nahe, daß einerseits schon sehr früh die Weichen für den weiteren Verlauf einer Sepsis gestellt werden und sich andererseits der CCR4-Verlust genau dadurch so positiv auf das Überleben nach 16G CASP auswirkt, dass durch den Verlust eine überschießende Immunreaktion gebremst wird. Dies konnte in der zeitbezogenen Konstellation der im Serum gemessenen Zytokine nachvollzogen werden.

5 Zusammenfassung

Die Erforschung der Grundlagen septischer Geschehen für ein besseres Verständnis und dem Ziel, daraus eventuell neue Therapieansätze zu erlangen, ist Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte weltweit. Die Komplexität der immunologischen Abwehrmechanismen wird schrittweise entschlüsselt und um neu hinzu gewonnene Erkenntnisse ergänzt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des CC-Chemokinrezeptors 4, der insbesondere auf $CD4^+$ - T_H2 -Lymphozyten exprimiert wird, im Rahmen einer murinen Peritonitis näher zu untersuchen. Die Versuche wurden an genetisch veränderten, CCR4-defizienten Mäusen durchgeführt, die bereits im LPS-Injektionsmodell ein besseres Überleben bei Sepsis gezeigt hatten. Als Sepsismodell wurde die 16G CASP und die 16G CASPI verwendet, die als Modell einer postoperativen Anastomoseninsuffizienz mit Peritonitis entwickelt wurden.

Zunächst konnte in der Kinetik der 16G CASP ein besseres Überleben der CCR4-defizienten Mäuse beobachtet werden, welches in der CASPI mit Intervention nach 5 Stunden hochsignifikant ausfiel.

Ausgehend davon wurden *in vitro* Versuche durchgeführt. Die quantitative und qualitative Untersuchung der bakteriellen Verteilung nach Peritonitis umfasste die Analysen der Peritonealspülung und der entnommenen Organe. Hier zeigten sich lediglich in der Leber und in der Peritoneallavage 12 Stunden nach 16G CASP beinahe signifikante Ergebnisse zugunsten der Knockouts.

Die Messungen von Zytokinspiegeln im Serum zeigten eine als günstig zu interpretierende Konstellation mit anfänglich hohen (=bremsenden) und im zeitlichen Verlauf deutlich erniedrigten (=nicht immunsuppressiv wirkenden) IL-10-Spiegeln.

Auch das im Serum gemessene $TNF\alpha$ und das in der Milz gemessene $IFN\gamma$ lagen in der CCR4^{-/-}-Gruppe niedriger, was die Hypothese der gedrosselten, „balancierten“ Immunantwort auf niedrigerem Aktivitätsniveau stützt. Die Frühphase der abdominalen Sepsis zeigt sich nicht nur durch die Ergebnisse der CASPI als Zeitpunkt der Weichenstellung für den weiteren Verlauf der Sepsis zwischen Rezeptor-positiven und –negativen Versuchstieren. Auch die dann hohen Serumkonzentrationen von IL-12 und IL-18 (nach 3h: signifikant) passen zum besseren Coping der CCR4^{-/-}-Tiere mit der Peritonitis. Diese beiden Zytokine zeigen ebenfalls die bereits mehrfach beobachtete, schützend niedrige Präsenz (für IL-18 nach 12h: signifikant) im Serum in der Spätphase nach abdominaler Sepsis.

Mittels intraperitonealer Thioglykolinjektion konnte gezeigt werden, dass daraufhin weniger Makrophagen einwandern; in den FACS-Analysen zeigte sich nach 16G CASP jedoch kein eindeutiger Unterschied im Aktivierungsgrad der Peritonealmakrophagen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der genetische Knockout des CC Chemokinrezeptors 4 einen positiven Einfluss auf das Überleben nach 16G CASP hat. Diese klinische Beobachtung lässt sich durch zahlreiche in vitro Ergebnisse stützen, bestätigen und erklären.

Eingehende Untersuchungen weiterer Zytokine und Wiederholung der durchgeführten Zytokinmessungen mit größeren Fallzahlen werden derzeit durchgeführt.

6 Literaturverzeichnis

- 1 American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20 (1992) 864.
- 2 Andrew, D.P., Ruffing, N., Kim, C.H., Miao, W., Heath, H., Li, Y., Murphy, K., Campbell, J.J., Butcher, E.C., Wu, L. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J Immunol* 166(1) (2001) 103-111.
- 3 Barthlen, W., Zantl, N., Pfeffer, K., Heidecke, C.D., Holzmann, B., and Stadler, J. Impact of experimental peritonitis on bone marrow cell function. *Surgery* 126(1) (1999) 41-47.
- 4 BD Biosciences - Pharmingen2000, Life Science Research, Europe, Tullastraße 8-12, D-69126 Heidelberg, www.bdbiosciences.com
- 5 Blackwell, T. S., Christman J. W. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 77 (1996) 110-117.
- 6 Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsati, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., Sinigaglia, F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells / Th1) and Th2. *J Exp Med* 187 (1998) 129-134.
- 7 Brun-Buisson, C. The Epidemiology of the systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med* 26 (2000) 64 –74.
- 8 Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D.P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., Wu, L., Butcher, E.C. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 400 (6746) (1999) 776 – 780.
- 9 Car, B.D., Eng, V.M., Schnyder, B., Ozmen, L., Huang, S., Gallay, P., Heumann, D., Aguet, M., Ryffel, B. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J Exp Med* 179 (1994) 1437-1444.
- 10 Chvatchko, Y., Hoogewerf, A.J., Meyer, A., Alouani, S., Juillard, P., Buser, R., Conquet, F., Proudfoot, A.E., Wells, T.N., Power, C.A. A Key Role for CC Chemokine Receptor 4 in Lipopolysaccharide-induced Endotoxic Shock, *J Exp Med* 191(10) (2000) 1755 –1763.
- 11 D'Ambrosio, D., Iellem, A., Bonecchi, R., Mazzeo, D., Sozzani, S., Mantovani, A., Sinigaglia, F. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells, *J Immunol* 161(10) (1998) 5111-5115.
- 12 De Vries, J.E. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med* 27 (1995) 537.

-
- 13 Echtenacher, B., Falk, W., Männel, D.N., Krammer, P.H.. Requirement of endogenous tumor necrosis factor / cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J Immunol* 145 (1990) 3762 – 3766.
 - 14 Echtenacher, B., Freudenberg, M.A., Jack, R.S., Männel, D.N. Differences in Innate Defense Mechanisms in Endotoxemia and Polymicrobial Septic Peritonitis. *Infection and Immunity* 69(12) (2001) 7271-7276.
 - 15 Echtenacher, B., Weigl, K., Lehn, N., Männel, D.N. Tumor Necrosis Factor-Dependent Adhesions as a Major Protective Mechanism Early in Septic Peritonitis in Mice. *Infection and Immunity* 69(12) (2001) 3550-3555.
 - 16 Emmanuilidis, K., Weighardt, H., Maier, S., Gerauer, K., Fleischmann, T., Zheng, X.X., Hancock, W.W., Holzmann, B., Heidecke, C.D. Critical Role of Kupffer Cell-Derived IL-10 for Host Defense in Septic Peritonitis. *J Immunol* 167 (2001) 3919 – 3927.
 - 17 Fischer-Reska, I. Sepsis und Zytokine – die Rolle von IL-18 und anderen proinflammatorischen Zytokinen bei der abdominalen Sepsis der Maus. Unveröffentlichte Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig – Maximilians - Universität München (2001).
 - 18 Friedman et al. Has the mortality of the septic shock changed with time? *Cnt Care Med* 26 (1998) 2078 – 2086.
 - 19 Gear, A.R., Suttitanamongkol, S., Viisoreanu, D., Polanowska-Grabowska, R.K., Raha, S., Camerini, D. Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, and SDF-1 to stimulate platelet function. *Blood* 97(4) (2001) 937 – 945.
 - 20 Godiska, R., Chantry, D., Raport, C.J., Sozzani, S., Allavena, P., Leviten, D., Mantovani, A., Gray, P.W. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med* 185 (1997) 1595 – 1604.
 - 21 Hensler, T., Heidecke, C.D., Hecker, H., Heeg, K., Bartels, H., Zantl, N., Wagner, H., Siewert, J.R., Holzmann, B. Increased Susceptibility to Postoperative Sepsis in Patients with Impaired Monocyte IL-12 Production. *J Immunol* 161 (1998) 2655 – 2659.
 - 22 Heremans, H., Van Damme, J., Dillen, C., Dijkmans, R., Billiau, A.. Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like shock reactions in mice. *J Exp Med* 171 (1990) 1853 – 1869.
 - 23 Hochholzer, P., Lipford, G., Wagner, H., Pfeffer, K., Heeg, K. Role of Interleukin-18 (IL-18) during Lethal Shock: Decreased Lipopolysaccharide Sensitivity but normal Superantigen Reaction in IL-18-Deficient Mice. *Infection and Immunity* 68(6) (2000) 3502 – 3508.

-
- 24 Iellem, A., Colantonio, L., Bhakta, S., Sozzani, S., Mantovani, A., Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D. Inhibition by IL-12 and IFN- γ of I-309 and macrophage - derived chemokine production upon TCR triggering of human Th1 cells. *Eur J Immunol* 30(4) (2000) 1030 – 1039.
- 25 Imai, T., Chantry, D., Raport, C.J., Wood, C.L., Nishimura, M., Godiska, R., Yoshie, O., Gray, P.W. Macrophage - derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 273(3) (1998) 1764 – 1768.
- 26 Inngjerdigen, M., Damaj, B., Maghazachi, A.A. Human MK cells express CC chemokine receptors 4 and 8 and respond to thymus and activation - regulated chemokine, macrophage – derived chemokine, and I-309. *J Immunol* 164(8) (2000) 4048 –4054.
- 27 Isselbacher, K.J. Harrison's Innere Medizin, Dt. Ausg. der 13. Auflage, hrsg. von Schmailzl, K.J. *Blackwell Wiss.-Verl.*, Berlin (1995) Kap. 83 und 260.
- 28 Janeway, C., Travers, P., Immunologie, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, 2. Auflage (1997).
- 29 Jiang, Q., Cross, A. S., Singh, I. S., Chen, T. T., Viscardi, R. M., Hasday J. D. Febrile Core Temperature Is Essential for Optimal Host Defense in Bacterial Peritonitis. *Infection and Immunity* 68(3) (2000) 1265 – 1270.
- 30 Kaisho, T., Akira, S. Toll - like receptors as adjuvant receptors, *Biochimica et Biophysica Acta* 1589 (2002) 1-13.
- 31 Knaus, W.A. et al., APACHE III prognostic system: Risk prediction of hospital mortality for critically hospitalized adults. *Chest* 100 (1991) 1619.
- 32 Lauwerys, B.R., Garot, N., Renault, J.C., Houssiau F.A. Cytokine Production and Killer Activity of NK/T-NK Cells Derived with IL-2, IL-15, or the Combination of IL-12 and IL-18. *J Immunol* 165 (2000) 1847 – 1853.
- 33 Lawless, V.A., Zhang, S., Ozes, O.N., Bruns, H.A., Oldham, I., Hoey, T., Grusby, M.J., Kaplan, M.H., Stat4 Regulates Multiple Components of IFN- γ -Inducing Signaling Pathways. *J Immunol* 165 (2000) 6803 – 6808.
- 34 Leite-de-Moraes, M.C., Hameg, A., Pacillo, M., Koezuka, Y., Taniguchi, Y., Van Kaer, L., Schneider, E., Dy, M., Herbelin, A. IL-18 Enhances IL-4 Production by Ligand-Activated NKT Lymphocytes: A Pro-Th2 Effect of IL-18 Exert Through NKT Cells. *J Immunol* 166 (2001) 945 – 951.
- 35 Löffler, G., Petrides, P. Biochemie und Pathobiochemie. *Springer - Verlag*, Berlin Heidelberg New York, 5. Auflage (1997) 306.
- 36 Leon, L.R., White A.A., Kluger M.J. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. *Am J Physiol* 275 (1998) 269 – 277.

-
- 37 Lloyd, C.M., Delaney, T., Nguyen, T., Tian, J., Martinez-A., C., Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C. CC chemokine receptor (CCR)3/eotaxin is followed by CCR4/monocyte-derived chemokine in mediating pulmonary T helper lymphocyte type 2 recruitment after serial antigen challenge in vivo. *J Exp Med* 191(2) (2000) 265 – 74.
- 38 Männel, D.N., Echtenacher, B. TNF in the Inflammatory Response, *Chem Immunol* 74 (2000) 141 – 161.
- 39 Mammen, E. F. The haematological manifestations of sepsis. *J Antimikrob Chemother* 41 (1998) 17 – 24.
- 40 Mantovani, A. (ed): Chemokines. *Chem Immunol* 72 (1999) .
- 41 Mantovani, A., Gray, P.A., Van Damme, J., Sozzani, S. Macrophage - derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol* 68(3) (2000) 400 – 404.
- 42 Medzhitov, R., Janeway, C. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell* 91 (1997) 295 – 298.
- 43 Mercer-Jones, M.A., Shrotri, M.S., Heinzelmann, M., Peyton, J.C., Cheadle, W.G. Regulation of early peritoneal neutrophil migration by macrophage inflammatory protein-2 and mast cells in experimental peritonitis. *J Leukoc Biol* 65 (1999) 249 – 255.
- 44 Mercer-Jones, M. A., Shrotri, M. S., Peyton, J. C., Remick, D. G., Cheadle, W. G. Neutrophil sequestration in liver and lung is differentially regulated by C-X-C chemokines during experimental peritonitis. *Inflammation* 23(4) (1999) 305 – 319.
- 45 Mosmann, T.R. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 56(1) (1994) .
- 46 Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., Modolell, M. Murine Macrophages Secrete Interferone γ upon combined Stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel Pathway of Autocrine Macrophage Activation. *J Exp Med* 197(12) (1998) 2103 – 2108.
- 47 Murdoch, C., Finn, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95(10) (2000) 3032 – 3043.
- 48 Neumann, B., Zantl, N., Veihelmann, A., Emmanuilidis, K., Pfeffer, K., Heidecke, C.D., Holzmann, B. Mechanisms of acute inflammatory lung injury induced by abdominal sepsis. *Int Immunol* 11(2) (1999) 217 – 227.
- 49 Coates, N.J., McColl, S.R. Production of Chemokines In Vivo in Response to Microbial Stimulation. *J Immunol* 166 (2001) 5177 – 5182.
- 50 Parnham, M.J. Progress in Inflammation Research, Cytokines in Severe Sepsis and Septic Shock. Edited by Redl, H. and Schlag, G. *Birkhäuser Verlag* Basel/Switzerland (1999).
- 51 Paul, W., Seder, R. Lymphocyte Responses and Cytokines. *Cell* 76 (1994) 241 – 251.

-
- 52 Reddy, R.C., Chen, G.H., Newstead, M.W., Moore, T., Zeng, X. Tateda, K., Standiford, T.J. Alveolar macrophage deactivation in murine septic peritonitis: role of interleukin 10. *Infect Immun* 69(3) (2001) 1394 – 1401.
- 53 Remick, D.G., Green, L.B., Newcomb, D.E., Garg, S.J., Bolgos, G.L., Call, D.R.. *Am J Path* 159 (2001) 1149 – 1157.
- 54 Sallusto, F., Kremmer, E., Palermo, B., Hoy, A., Ponath, P., Qin, S., Förster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur J Immunol* 29(6) (1999) 2037 – 2045.
- 55 Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C.R., Lanzavecchia, A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187(6) (1998) 875 – 883.
- 56 Sekiya, T., Miyamasu, M., Imanishi, M., Yamada, H., Nakajima, T., Yamaguchi, M., Fujisawa, T., Pawankar, R., Sano, Y., Ohta, K., Ishii, A., Morita, Y., Yamamoto, K., Matsushima, K., Yoshie, O., Hirai, K. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 165(4) (2000) 2205 – 2213.
- 57 Sewnath, M.E., Olszyna, D.P., Birjmohun R., ten Kate, F.J., Gouma, D.J., van der Poll, T. IL-10-deficient mice demonstrate multiple organ failure and Increased Mortality During Escherichia coli Peritonitis Despite an Accelerated Bacteria Clearance. *J Immunol* 166 (2001) 6323 – 6331.
- 58 Song, G.Y., Chung, C.S., Chaudry, I.H., Ayala, A. What is the role of IL-10 in polymicrobial sepsis: anti-inflammatory agent or immunosuppressant? *Surgery*, 126 (1999) 378.
- 59 Standiford, T. J., Kunkel, S. L., Lukacs, N. W., Greenberger, M. J., Danforth, J. M., Kunkel, R. G., Strieter, R. M. Macrophage inflammatory protein-1 α mediates lung leukocyte recruitment, lung capillary leak, and early mortality in murine endotoxemia. *J Immunol* 155 (1995) 1515 – 1524.
- 60 Standiford, T.J., Strieter, R.M., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L. Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. *J Immunol* 155 (1995) 2222 – 2229.
- 61 Steinhauser, M.L., Hogaboam, C.M., Lukacs, N.W., Strieter, R.M., Kunkel, S.L. Multiple Roles for IL-12 in a Model of Acute Septic Peritonitis. *J Immunol* 162 (1999) 5437 – 5443.
- 62 Takeda, K., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Adachi, O., Yoshida, N., Kishimoto, T., Okamura, H., Nakanishi, K., Akira, S. Defective NK Cell Activity and Th1 Response in IL-18-Deficient Mice. *Immunity* 8 (1998) 383 – 390.
- 63 Tannahill, C.L., Fukuzuka, K., Marum, T., Abouhamze, Z., MacKay, S.L., Copeland, E.M. III, Moldawer, L.L. Discordant tumor necrosis factor - alpha superfamily gene expression in bacterial peritonitis and endotoxemic shock. *Surgery* 126(2) (1999) 349 – 357.

-
- 64 Traeger, T., Maier S., Entleutner, M., Westerholt, A., Kleist, B., Hüser, 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* 21(6) (2004) 505 – 11.
- 65 Trainingshandbuch Durchflußzytometrie, Einführung in die Durchflußzytometrie, BD Biosciences, Customer Education, Tullastraße 8-12, D-69126 Heidelberg, www.bd.com.
- 66 Trinchieri, G. Interleukin 12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen - specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13 (1995) 251 – 276.
- 67 Ulich, T. R., Guo, K., del Castillo, J. Endotoxin - induced cytokine gene expression in vivo. I. Expression of tumor necrosis factor mRNA in visceral organs under physiologic conditions and during endotoxemia. *Am J Pathol* 134(1) (1989) 11 – 14.
- 68 Van der Polt, T., Marchant, A., Burrman, W.A., Berman, L., Keogh, C.V., Lazarus, D.D., Nguyen, L., Goldman, M., Moldawer, L.L., Lowry, S. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol* 155 (1995) 5397.
- 69 Vincent, V.L. et al. SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 22 (1996) 707 – 710.
- 70 Walley, K.R., Lukacs, N.W., Standiford, T.J., Strieter, R.M., Kunkel, S.L. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun*, 64 (1996) 4733.
- 71 Walley, K. R., Lukacs, N.W., Standiford, T.J., Strieter, R.M., Kunkel, S.L. Elevated levels of macrophage inflammatory protein 2 in severe murine peritonitis increase neutrophil recruitment and mortality. *Infection and Immunity* 65 (1997) 3847 – 3851.
- 72 Weighardt H., Heidecke C.D., Emmanuilidis K., Maier S., Bartels H., Siewert J.R., Holzmann B. Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon- γ -resistant defects of monocyte cytokine production. *Surgery* 127(3) (2000) 309 – 315.
- 73 Wichtermann, K.A., Baue, A.E., Chaudry, I.H. Sepsis and septic shock – a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*, 29 (1980) 189 – 201.
- 74 Wick, M., Kollig, E., Walz, M., Muhr, G., Köller, M. High Systemic Interleukin-12 (IL-12) in Polytrauma Patients: Correlation to Clinical Parameters, in: Faist, E., (Hrsg.) 5th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis – Pathophysiology, Immune Consequences and Therapy. Munich, Germany, Feb 19 – March 4, 2000.
- 75 Wickel, D.J., Mercer-Jones, M.A., Peyto, J.C., Shrotri, M.S., Cheadle, W.G. Neutrophil sequestration during early fecal peritonitis is P-selectin dependent in peritoneum but selectin independent in lung. *Shock* 10 (1998) 265 – 269.
- 76 Yokoi, K., Mukaida, N., Harada, A., Watanabe, Y., Matsushima, K. Prevention of endotoxaemia - induced acute respiratory distress syndrome - like lung injury in rabbits by a monoklonal antibody to IL-8. *Lab Invest* 76 (1997) 375 – 384.

-
- 77 Yoneyama, H., Harada, A., Imai, T., Baba, M., Yoshie, O., Zhang, Y., Higashi, H., Murai, M., Asakura, H., Matsushima, K. Pivotal role of TARC, a CC chemokine, in bacteria - induced fulminant hepatic failure in mice. *J Clin Invest* 102(11) (1998) 1933 – 1941.
- 78 Yoshie, O., Imai, T., Nomiyama, H. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their Receptors. *J Leuk Biol* 62 (1997) 634 – 644.
- 79 Zantl, N., Holzmann, B., Pfeffer, K., Heidecke, C.D. Colon ascendens stent peritonitis (CASP): a novel surgical model for the induction of bacterial peritonitis/sepsis in mice. In “4th Intl. Congress on Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis. Mechanisms and therapeutic approaches”, Faist, E. (Ed.), Monduzzi Editore S.p.A., Bologna (1997) 467 – 471.
- 80 Zantl, N., Uebe, A., Neumann, B., Wagner, H., Siewert, J.R., Holzmann, B., Heidecke, C.D., Pfeffer, K. Essential role of IFN γ in survival of colon ascendens stent peritonitis (CASP), a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun* 66 (1998) 2300 – 2309.

7 Abbildungsverzeichnis

	Seite
1.2.1 Leukozytenrolling, Adhäsion an das Gefäßendothel und Leukozytendiapedese	15
1.2.2 Interaktion von Makrophagen und T _H -Lymphozyten bei der Abwehr von Bakterien	18
1.3.1 Struktur des heptahelikalen, G-Protein-gekoppelten CC-Chemokinrezeptors 4	26
2.1.1 Eröffnung des Abdomens, Darstellung des ileozökalen Übergangs und Vorbereitung der Stent-Annahrt mit 7/0 Faden	33
2.1.2 Implantation des Stents in das Colon ascendens	34
2.1.3 Verschluss des Loches in der Darmwand mittels Tabaksbeutelnaht in der Interventionsoperation bei CASPI	35
2.1.4 Lage des Stents bei der sham CASP	35
3.1.1 Überleben nach 16G CASP; CCR4+/+ vs. CCR4-/-	48
3.1.2 Überleben nach 16G CASPI; CCR4+/+ vs. CCR4-/-	50
3.2.1 Bakteriologische Analyse der Peritoneallavage nach 16G CASP; CCR4+/+ vs. CCR4-/-	52
3.2.2 Bakteriologische Analyse der Organsuspensionen 20h nach 16G CASP; CCR4+/+ vs. CCR4-/-	55
3.3.1 IL-10 im Serum nach 16G CASP; CCR4+/+ vs. CCR4-/-	57
3.3.2 TNF α im Serum nach 16G CASP; CCR4+/+ vs. CCR4-/-	59
3.3.3 IL-12p40 im Serum nach 16G CASP; CCR4+/+ vs. CCR4-/-	61
3.3.4 IL-18 im Serum nach 16G CASP; CCR4+/+ vs. CCR4-/-	63
3.4.1 IFN γ in der Leber nach 16G CASP; CCR4+/+ vs. CCR4-/-	65
3.4.2 IFN γ in der Milz nach 16G CASP; CCR4+/+ vs. CCR4-/-	67
3.5.1 FACS – Negativkontrolle PE vs. APC	68
3.5.2 FACS – Negativkontrolle Fitc vs. PE	68
3.5.3 FACS – Negativkontrolle Fitc vs. APC	69
3.5.4 Grafische Auftragung der relativen Zellgröße vs. die relative Granulierung; Festlegung des Life Gates	69
3.5.5 Expression von CD47 auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 3 Stunden nach sham bzw. 16G CASP bei CCR4+/+ und CCR4-/- -Mäusen	70
3.5.6 Expression von CD47 auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 12 Stunden nach sham bzw. 16G CASP bei CCR4+/+ und CCR4-/- -Mäusen	70

3.5.7 Grafische Gegenüberstellung der Expressionsdichte von CD47 3 Stunden nach sham-OP bzw. 16G CASP bei CCR4 ^{+/+} und CCR4 ^{-/-} -Mäusen	71
3.5.8 Kontrolle der unspezifischen IgG-Bindung im Vergleich zur Expression von F _c γR _{III} auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 3 Stunden nach sham-Operation	72
3.5.9 Kontrolle der unspezifischen IgG-Bindung im Vergleich zur Expression von F _c γR _{III} auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 3 Stunden nach 16G CASP bei CCR4 ^{+/+} - Mäusen	73
3.5.10 Kontrolle der unspezifischen IgG-Bindung im Vergleich zur Expression von F _c γR _{III} auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 3 Stunden nach 16G CASP bei CCR4 ^{-/-} - Mäusen	73
3.5.11 Grafische Gegenüberstellung der Expressionsdichte des F _c γR _{III} 3 Stunden nach sham-OP bzw. 16G CASP bei CCR4 ^{+/+} und CCR4 ^{-/-} -Mäusen	73
3.5.12 Kontrolle der unspezifischen IgG-Bindung im Vergleich zur Expression von F _c γR _{III} auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 12 Stunden nach sham-Operation	74
3.5.13 Kontrolle der unspezifischen IgG-Bindung im Vergleich zur Expression von F _c γR _{III} auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 12 Stunden nach 16G CASP bei CCR4 ^{+/+} - Mäusen	74
3.5.14 Kontrolle der unspezifischen IgG-Bindung im Vergleich zur Expression von F _c γR _{III} auf Gr1-positiven Zellen der Peritoneallavage 12 Stunden nach 16G CASP bei CCR4 ^{-/-} - Mäusen	75
3.5.15 Grafische Gegenüberstellung der Expressionsdichte des F _c γR _{III} 12 Stunden nach sham-OP bzw. 16G CASP bei CCR4 ^{+/+} und CCR4 ^{-/-} -Mäusen	75

8 Tabellenverzeichnis

	Seite
1.1.1 Stadien des Sepsis Syndroms	11
1.2.1 Bakterielle PAMPs (pathogen associated molecular patterns)	12
1.2.2 Lokale und systemische Effekte der von den Zellen der angeborenen Immunität freigesetzten Zytokine	13
1.2.3 Überblick über sepsisrelevante Zytokine	24
1.2.4 Überblick über sepsisrelevante Chemokine	24/25
2.1.1 Letalität und Todeszeitpunkt nach CASP in Abhängigkeit von der Stentgröße im Wildtyp (C57BL/6)	31
2.1.2 Untersuchungsparameter und deren Bewertung in der Sepsis der Maus	36/37
2.1.3 Operierte Versuchsgruppen für Kinetik	37
2.1.4 Operierte Versuchsgruppen für Organentnahme	37
2.3.1 Verteilung und Funktion von Gr1 und Mac-1	45
2.3.2 Verteilung und Funktion von CD47 und F _c γR _{III}	45
2.3.3 FACS-Färbeschema zur Analyse von Granulozyten in der Peritoneallavage	45
3.1.1 Überleben der operierten Tiere nach 16G CASP und 16G CASPI	50
3.2.1 Qualitative bakteriologische Analyse der Peritoneallavage	53
3.6.1 Auszählung der Peritonealmakrophagen nach intraperitonealer Thioglykollatinjektion	76

9 Danksagung

Im Februar 2000 begann ich in der chirurgischen Forschergruppe unter der Leitung von Prof. Dr. med. Claus-Dieter Heidecke (jetzt Universität Greifswald) die Operationstechnik der heterotopen Nierentransplantation bei Mäusen zu erlernen. Ziel des geplanten Dissertationsvorhabens war die Untersuchung des Einflusses des CCR4-Knockouts auf die chronische Abstoßung von Nierentransplantaten in Mäusen. Als im Herbst 2001 die Fortführung der Nierentransplantationen wegen nicht zu beherrschenden immunologischen Problemen in der allogenen Kontrollgruppe abgebrochen werden mussten, übernahm ich das Thema der vorliegenden Arbeit.

Die Durchführung dieser Arbeit konnte nur durch die Unterstützung und Hilfe zahlreicher Personen gelingen, denen an dieser Stelle vielmals gedankt sei.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Holzmann, der mir in den Laboratorien der „klinischen Forschergruppe Sepsis“ die Durchführung sämtlicher in vitro Versuche ermöglichte und diese Arbeit als Dissertation angenommen hat.

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer (jetzt Universität Düsseldorf), der die Fragestellung entworfen hat, danke ich weiterhin für die Möglichkeit der Nutzung der Tierställe, die Bereitstellung der Mäuse sowie der Operationsräume im Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München.

Ein großes Dankeschön geht an meinen Betreuer Herrn Dr. med. Klaus Gerauer, der mich und diese Arbeit durch seinen intensiven Einsatz in ihrem Verlauf stets gefördert hat.

Weiterhin danke ich vielmals Herrn Dr. med. Tobias Traeger, der durch seine Vorarbeiten und seinem Beitrag mit den CASP-Operationen entscheidend zum Fortgang der Experimente beigetragen hat.

Großer Dank geht an dieser Stelle auch an Herrn Dr. med. Wolfgang Reindl für die Unterstützung bei den FACS-Untersuchungen sowie Frau PD Dr. rer. nat. Heike Weighardt und Herrn Dr. med. Norbert Hüser für ihre unermüdlichen Ratschläge und Ideen, die diese Arbeit zusätzlich vorangebracht haben.

Bei Frau Tanja Roßmann-Bloek und Frau Felicitas Altmeyer bedanke ich mich vielmals für die Einweisung und Unterstützung bei den in vitro Versuchen.

Zuletzt geht mein herzliches Dankeschön an meine liebe Frau Kicki und meine lieben Kinder Kilian und Katja, die zahlreiche lange Stunden auf mich verzichten mussten und mich durch ihren aufmunternden Zuspruch im Vorantreiben dieser Arbeit stets bestärkt haben.