

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne))

Die Regulation der Akute-Phase-Proteine SAA, SAP und α 1-AT im Mausmodell des Septischen Schocks

Ulrike Schmidt

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. Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne)
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 17.02.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.07.2006 angenommen.

Lebenslauf

Größeres wolltest auch du, aber die Liebe zwingt
All uns nieder, das Leid beugt gewaltiger,
Doch es kehret umsonst nicht
Unser Bogen, woher er kommt.

(...)

Alles prüfe der Mensch, sagen die Himmlischen,
Daß er, kräftig genährt, danken für alles lern,
Und verstehe die Freiheit,
Aufzubrechen, wohin er will.

Friedrich Hölderlin (1770-1843)

In Erinnerung an meinen Vater.
In Dankbarkeit für meine Mutter
und Cornel.

Veröffentlichung

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht.

Ulrike Schmidt, Hermann Wagner, Thomas Miethke

CpG-DNA upregulates the major acute-phase proteins SAA and SAP.

Cell Microbiol. 1999; Jul;1(1):61-7

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichung	VII
Inhaltsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XIV
Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVIII
1 Einleitung	1
1.1 Definition und Aufgaben des Immunsystems	1
1.2 Aufbau des Immunsystems	1
1.2.1 Die unspezifische zellvermittelte Abwehrreaktion	2
1.2.2 Die unspezifische humorale Abwehrreaktion	3
1.2.3 Die durch B-Zellen und Antikörper vermittelte spezifische humorale Immunreaktion	4
1.2.4 Die durch T-Lymphozyten vermittelte spezifische zelluläre Immunreaktion	5
1.3 Struktur und Funktion des T-Zellrezeptors und der MHC-Moleküle	6
1.4 Superantigene	8
1.5 Die TNF/TNF-Rezeptor-Superfamilie	9
1.6 Definition, Symptome und Pathophysiologie des Septischen Schocks	11
1.7 Bakterielle DNS und synthetische CpG-Oligodeoxynukleotide (ODN) als Aktivatoren von Immunzellen	12
1.8 Die Akute-Phase-Proteine	14
1.8.1 Die Akute-Phase-Reaktion	14
1.8.2 Serum Amyloid A (SAA)	16
1.8.3 Serum Amyloid P (SAP)	18
2 Fragestellung und Zielsetzung	21
3 Material & Methoden	23
3.1 Bezugsnachweis	23
3.1.1 Chemikalien	23
3.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	24
3.1.3 Geräte	24
3.2 Pufferlösungen	25
3.3 Zytokine und Toxine	26
3.4 Antikörper	26
3.5 Oligodesoxynukleotide (ODN)	27
3.6 Versuchstiere	27
3.7 Tierversuche	27
3.7.1 Injektionsmodell	27
3.7.2 Organ- und Blutentnahme	28

3.7.3	Aufbereitung der entnommenen Organ- und Blutproben für die Analyse im Western-blot bzw. ELISA	28
3.7.4	Aufbereitung der Leberproben für die histologische Untersuchung	28
3.8	Histologische Untersuchung mittels konventioneller Färbung mit Hämatoxylin/Eosin	29
3.8.1	Färbelösungen	29
3.8.2	Fixierung und Färbung der Schnitte	29
3.9	Proteinbiochemische Methoden	30
3.9.1	Gelelektrophoretische Auftrennung des Leberhomogenisats und des Serums (SDS-PAGE)	30
3.9.2	Westernblot (Semidry-Blotting)	31
3.9.3	Detektion von SAP und α 1-AT	31
3.9.4	Detektion und Konzentrationsbestimmung von SAA mittels ELISA	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Experimentübergreifende, allgemeine Erläuterungen zum Versuchsaufbau und zur graphi-schen Darstellung der ELISA- und Westernblotanalysen	33
4.2	Etablierung eines Mausmodells zur Untersuchung der murinen APP im Septischen Schock .	34
4.2.1	Die Kinetiken von SAA und SAP nach Injektion von LPS	34
4.2.2	Die Kinetiken von SAA und SAP nach Injektion von $TNF\alpha$	36
4.2.3	Die DGal-medierte Blockade der IL-1 β -induzierten hepatischen SAP-Synthese kann durch die extrahepatische SAP-Synthese kompensiert werden.	37
4.2.4	Die IL-6-vermittelte Induktion der Expression von SAA und SAP	39
4.3	Die $TNF\alpha$ - und IL-1 β -vermittelte Induktion der Expression von SAA und SAP ist dosisab-hängig.	40
4.4	SEB induziert die Synthese von SAA und SAP <i>in vivo</i>	41
4.5	Die Bedeutung der TNF/TNFR-Familienmitglieder TNFRp55, LTR β und FAS für die In-duktion von SAA bzw. SAP.	42
4.5.1	Die SEB- sowie die LPS-vermittelte Induktion von SAA und SAP sind jeweils unab-hängig vom TNF-Rezeptor p55 (TNFRp55) und werden zudem durch die Verabrei-chung von DGal/LPS nicht beeinflusst.	43
4.5.2	Die SEB- sowie die LPS-vermittelte Induktion von SAA und SAP sind jeweils unab-hängig vom Lymphotoxin-Rezeptor β (LTR β)	46
4.5.3	Die intraperitoneale Applikation von Anti-FAS-AK hat keinen Einfluss auf die Syn-these von SAA und SAP <i>in vivo</i>	47
4.6	DNS aus <i>E. coli</i> induziert die Expression von SAA und SAP <i>in vivo</i>	51
4.6.1	<i>E. coli</i> -DNS induziert die Expression von SAA und SAP	51
4.6.2	CpG-Oligodesoynukleotide (CpG-ODN) induzieren die Synthese von SAA und SAP <i>in vivo</i>	52
4.6.3	Die CpG-ODN-vermittelte Induktion der Sythese von SAA und SAP ist unabhängig vom TNFRp55	55
5	Diskussion	57
5.1	Die Kinetiken der SAA-, SAP- und α 1-AT-Konzentrationen in Serum und Leber	57
5.1.1	Der Verlauf der Kinetiken der SAA- und SAP-Serum- bzw. Leberkonzentrationen ist unabhängig vom Induktor der SAA- bzw. SAP-Expression.	57
5.1.2	Die Regulation der Synthese des murinen α 1-AT.	59
5.2	Die suffiziente Synthese von Akute-Phase-Proteinen ist möglicherweise für das Überleben der Maus im Endo- bzw. Enterotoxinschock von essentieller Bedeutung.	60
5.3	Die Rezeptoren TNFRp55 und LT β sind für die Endo- bzw. Enterotoxin-vermittelte Induk-tion der Akute-Phase-Proteine SAA und SAP im Septischen Schock entbehrlich.	62
5.4	Die Aktivierung des FAS-Rezeptors durch intraperitoneal instillierten Anti-FAS-AK führt nicht zu einer Induktion der SAA- bzw. SAP-Synthese.	64
5.5	CpG-DNS induziert die Akute-Phase-Proteine SAA und SAP	65
5.6	Klinische Implikationen und Ausblick	66
6	Zusammenfassung	69

Literaturverzeichnis	73
Danksagung	89

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptorkomplex	6
4.1	Kinetiken der SAA-Serumkonzentration und SAP-Serum- und Leberkonzentrationen nach 100 μ g LPS i.p.	36
4.2	Kinetiken der SAA-Serumkonzentration und SAP-Serum- und Leberkonzentrationen nach 1 μ g TNF α . i.p.	37
4.3	Kinetiken der SAA-Serumkonzentration und SAP-Serum- und Leberkonzentrationen nach 1 μ g IL-1 β . i.p.	38
4.4	SAA- und SAP-Serumkonzentrationen und SAP- Leberkonzentrationen 6h nach Verabreichung von 500ng IL-6 i.p.	39
4.5	Die TNF α -vermittelte Induktion der Expression von SAA- und SAP ist dosisabhängig. . . .	40
4.6	Die IL-1 β -vermittelte Induktion der Expression von SAA- und SAP ist dosisabhängig. . . .	41
4.7	SEB induziert die Expression von SAA und SAP <i>in vivo</i>	42
4.8	TNF α ruft in TNFRp55 ^{-/-} -Mäusen keine Induktion von SAA oder SAP hervor - Kontrolle des Phänotyps der TNFRp55 ^{-/-} -Mäuse.	43
4.9	Die LPS-vermittelte Induktion von SAA und SAP ist unabhängig vom TNF-Rezeptor p55 und wird durch die kombinierte Verabreichung von DGAl/LPS nicht beeinflusst.	44
4.10	Die SEB-vermittelte Induktion von SAA und SAP ist unabhängig vom TNF-Rezeptor p55. . . .	45
4.11	Die SEB-vermittelte Induktion von SAA und SAP ist unabhängig vom Lymphotoxin-Rezeptor β (LTR β).	46
4.12	Die i.p. Injektionen von 10 μ g bzw. 100 μ g Anti-FAS-AK i.p. führen nicht zur Veränderung der SAP- bzw. α 1-AT Serumspiegel in Balb/c-Mäusen.	47
4.13	Die i.p. Injektion subletaler Konzentrationen von Anti-FAS-AK (Jo 2, Pharmingen) i.p. führt nicht zu Veränderungen der SAA-Serumspiegel in Balb/c-Mäusen.	48
4.14	Die i.p. Injektion von 100 μ g Anti-FAS-AK führt zu einer ausgedehnten hepatischen Gewebstestruktion, während die i.p. Injektion von 1 μ g Anti-FAS-AK keine histologisch nachweisbaren Veränderungen der Leber hervorruft.	49
4.15	Die i.p. Injektion subletaler Konzentrationen eines <i>weiteren</i> Anti-FAS-AK (RMF, Beckman-Coulter) i.p. führt ebenfalls nicht zu Veränderungen der SAA-Serumspiegel in Balb/c-Mäusen. . . .	50
4.16	DNS von <i>E. coli</i> induziert die Expression von SAA und SAP.	51
4.17	CpG-ODN induzieren die Synthese von SAA und SAP sowohl in Balb/c als auch in C57B/6-Mäusen.	52

Abbildungsverzeichnis

4.18 Die Kinetiken der durch CpG-ODN und LPS induzierten SAA- und SAP-Konzentrationen im Serum verlaufen nahezu identisch.	53
4.19 DGal blockiert CpG-ODN (1668)- induzierte SAA und SAP-Synthese.	54
4.20 Die CpG-ODN vermittelte Induktion von SAA und SAP ist unabhängig vom TNFRp55. . .	55
5.1 Schematische Darstellung der Regulation der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α – modifiziert nach Ceciliani et al. (CECILIANI 2002)	62

Tabellenverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der vier Bereiche des Abwehrsystems der Vertebraten.	2
3.1	Chemikalien	23
3.2	Reagenzien & Verbrauchsmaterial	24
3.3	Geräte	24
3.4	Pufferlösungen	25
3.5	Zytokine & Toxine	26
3.6	Antikörper	26
3.7	Oligodesoxynukleotide - ODN	27
3.8	Versuchstiere	27
3.9	Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele	30

Abkürzungsverzeichnis

α 1-AT	α 1-Antitrypsin
AK	Antikörper
APP	Akute-Phase-Proteine
APR	Akute-Phase-Reaktion
APS	Ammonium Persulfate
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C/EBP	engl. NF-IL-6/CAAT-enhancer binding protein
CARS	engl. compensatory anti-inflammatory response syndrome
CD	engl. cluster of differentiation
CpG	Cytosin-Guanosin
CRP	C-reaktives Protein
d.h.	das heißt
DGal	D-Galaktosamin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zellen
E.C.-DNS	DNS von <i>E. coli</i>
ELISA	engl. Enzyme linked immosorbent assay
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
EZM	Extrazelluläre Matrix
ggf.	gegebenenfalls
HDL	engl. High density lipoproteins, Lipoproteine hoher Dichte
HLA	Humanes-Leukozyten-Antigen
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
LT	Lymphotoxin
LTR β	Lymphotoxin β -Rezeptor
MHC	engl. Major Histocompatibility Complex
MMTV	engl. Mouse Mammary Tumor Virus
MODS	engl. multiple organ dysfunction syndrome, dt. Multiorganversagen
NCF	Neutrophiler chemotaktischer Faktor

Abkürzungsverzeichnis

NK	Natürliche Killerzellen
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAMP	engl. pathogen-associated molecular patterns, dt. Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen
PRR	engl. pattern recognition receptors, dt. Struktur-erkennende Rezeptoren
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.a.	siehe auch
SAA	Serum-Amyloid-A
SAF	engl. SAA-activating sequence - binding factor
SAP	Serum-Amyloid-P
SAS	engl. SAA-activating sequence, dt. SAA-aktivierende Sequenz
SE	Staphylokokken Enterotoxin
SIRS	engl. systemic inflammatory response syndrome
sog.	sogenannt
TEMED	1,2-Bis(dimethylamino)ethane
TIR	engl. toll/interleukin-1 receptor domain
TLR	engl. toll-like-receptors
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFRp55	TNF-Rezeptor p55
TNFRp75	TNF-Rezeptor p75
TSST-1	Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin 1
TZR	T-Zell-Rezeptor
u.a.	unter anderem
YY1	Yin-Yang 1 (Transkriptionsfaktor)
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Definition und Aufgaben des Immunsystems

Jedes Lebewesen befindet sich in ständiger Auseinandersetzung mit seiner Umwelt. Der Organismus höherer Lebewesen muß sich insbesondere vor der Infektion mit den, ihn ständig umgebenden, Krankheitserregern schützen, bzw. zur wirkungsvollen Bekämpfung einer bereits erfolgten Infektion in der Lage sein. Eindringen und Vermehrung von Krankheitserregern, also Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, würden, ohne Schutz durch ein spezielles Abwehrsystem, den sicheren Tod des betroffenen Organismus bedeuten. Die Gesamtheit der Abwehrmechanismen in höheren Lebewesen wird als Immunsystem bezeichnet.

Neben der Inaktivierung von Fremdorganismen, stellt das Erkennen und Zerstören abnormer körpereigener Zellen, bspw. maligner Tumorzellen, eine weitere überlebenswichtige Aufgabe des Immunsystems dar. Diese Aufgaben stellen eine wesentliche Forderung an das Immunsystem, nämlich die der Fähigkeit zur Unterscheidung von Fremd und Selbst. Den sogenannten Autoimmunerkrankungen liegt ätiopathogenetisch eine Störung dieses Selbsterkennungssystems zugrunde, da das Immunsystem der daran Erkrankten bestimmte intakte körpereigene Strukturen fälschlicherweise als körperfremd, bzw. als infiziert, ansieht und demzufolge zerstört. So werden bspw. die Insulinrezeptoren der an Diabetes mellitus Typ I erkrankten Menschen spezifisch von sogenannten Auto-Antikörpern destruiert. Um solche Fehlerkennungen zu vermeiden, muß das Immunsystem folglich über eine hohe Spezifität verfügen.

1.2 Aufbau des Immunsystems

Man teilt das Immunsystem der Vertebraten, zu denen auch der Mensch gehört, in das unspezifische (angeborene) und das spezifische (erworbene) Immunsystem ein und unterscheidet in diesen beiden Teilbereichen jeweils die humorale und die zelluläre Immunreaktion. Zum erworbenen Immunsystem, welches auch spezifisches oder adaptives Immunsystem genannt wird, zählen alle Bestandteile des Abwehrsystems, die erst durch Kontakt mit einem körperfremden Antigen geprägt werden müssen, um hernach als spezifische Abwehrmechanismen funktionieren zu können. Als Antigen wird jede Substanz bezeichnet, die in der Lage ist, eine Immunantwort zu induzieren.

Bevor ein Krankheitserreger angegriffen werden kann, muß er jedoch zunächst als körperfremde Struktur identifiziert werden. Hierzu haben sich im adaptiven Immunsystem die spezifisch gegen ein Antigen gerichteten T-Zellrezeptoren (s. 1.2.4) sowie die spezifischen Antikörper (s. 1.2.3) entwickelt, wobei die Spezifität der Antigenerkennung wesentlich von dem, im Kapitel 1.3 ausführlich erläuterten, MHC-Komplex

1 Einleitung

abhängt. Vergleichsweise jung dagegen ist die Erkenntnis, dass das angeborene Immunsystem einen artübergreifenden hochkonservierten Mechanismus zur Erkennung von körperfremden Strukturen bereithält: Die Toll-like-Rezeptoren (TLR), über welche im anschließenden Kapitel zusammenfassend berichtet wird.

Die im Folgenden erläuterten, modellhaft abgegrenzten, vier Teilbereiche des Abwehrsystems, die in Tab. 1.2 nochmals zusammenfassend schematisch dargestellt sind, stellen im Organismus natürlich keine streng voneinander getrennten Systeme dar, sondern sind, im Sinne einer konzertierten Abwehrreaktion, vielfach miteinander verknüpft. Die Effektormechanismen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems weisen eine ausgeprägte Ähnlichkeit auf, was auch zu der Annahme geführt hat, daß das adaptive Immunsystem eine Weiterentwicklung des angeborenen Immunsystems darstellt (MEDZHITOV 1997, MEDZHITOV 1998).

	<i>Spezifisch</i>	<i>Unspezifisch</i>
<i>Zellulär</i>	T-Lymphozyten (1.2.4) Zytotoxische T-Zellen Regulatorische T-Zellen T-Helferzellen	Phagozyten (1.2.1) Granulozyten Monozyten Nat. Killerzellen
<i>Humoral</i>	Antikörper (1.2.3) gebildet von: B-Lymphozyten Plasmazellen	Komplement (1.2.2) Lysozym (1.2.2) Zytokine (1.8) Akut-Phase-Proteine (1.8)

Tab. 1.1: Schematische Darstellung der vier Bereiche des Abwehrsystems der Vertebraten.
Die Zahlen in den Klammern verweisen jeweils auf die entsprechenden Absätze im Text.

1.2.1 Die unspezifische zellvermittelte Abwehrreaktion

Die zellvermittelte unspezifische Abwehr wird im Wesentlichen von Phagozyten vermittelt. Diese gewährleisten u.a. die Entsorgung des, bereits von Abwehrmechanismen angegriffenen, körperfremden Zelldetritus. Zu den Phagozyten gehören die Zellen des Mononukleären Systems, also auch Makrophagen, sowie die Leukozyten. Zu den phagozytierenden Leukozyten zählen in erster Linie Granulozyten, die dendritischen Zellen (DZ) sowie die natürlichen Killerzellen (NK). Natürliche Killerzellen sind große, granuläre Lymphozyten, die weder B- noch T-Zellantigene tragen und die Erreger ohne vorangegangene Sensibilisierung und ohne Beteiligung von Antikörpern oder des Komplementsystems töten können. Phagozyten werden chemotaktisch von Zytokinen, durch Faktoren des Komplementsystems oder Faktoren eines Erregers angelockt. Die zu phagozytierenden Partikel werden vom Komplementsystem opsonisiert, um den Kontakt mit den Phagozyten zu erleichtern. Opsonisierung bedeutet, dass die Antigen-tragenden Strukturen durch Anlagerung von Plasmabestandteilen den Phagozyten im übertragenen Sinne „schmackhaft“ gemacht werden. Der Phagozyt umfließt im Folgenden den opsonierten Partikel (Ingestion), überstülpt diesen mit seiner Zellmembran und bildet so ein Phagosom. Durch die Verschmelzung der Phagosomen mit den Lysosomen des Phagozyten entstehen Phagolysosomen, in denen die Granulainhalte der Lysosomen ihre Wirkung entfalten können. Die Granula enthalten u.a. eine Reihe von Enzymen und kationische Proteine, die zur Zerstörung des körperfremden Materials beitragen.

Die Phagozyten haben, neben der Phagozytose, noch eine zweite wichtige Aufgabe, nämlich die der Antigenpräsentation, man nennt sie daher auch Antigen-präsentierende Zellen (APZ). Der Begriff der APZ wird nicht ganz einheitlich verwendet; prinzipiell ist jede kernhaltige Zelle in der Lage, Antigen zu präsentieren, wie bspw. das Antigen eines Virus nach stattgehabter viraler Infektion der Zelle. Die APZ im

engeren Sinne verfügen hingegen über die Fähigkeit, lösliche Antigene aus der Umgebung aufzunehmen, zu prozessieren und anschließend den T-Lymphozyten zu präsentieren. Die APZ bilden eine morphologisch heterogene Gruppe. Zu ihr gehören Monozyten und Makrophagen (MINAMI 1980), B-Lymphozyten (LANZAVECCHIA 1988) und dendritische Zellen (STEINMAN 1983). Letztere gehören ebenfalls zu den Leukozyten. Ausgehend von einer CD34-positiven ($CD34^+$) pluripotenten Stammzelle führen verschiedene Differenzierungswege zur Entstehung von dendritischen Zellen (HART 1997). Zu unterscheiden ist hierbei grundsätzlich eine lymphoide und eine myeloiden Differenzierungslinie. Nur die Abkömmlinge der myeloiden Linie fungieren als professionelle Antigen-präsentierende Zellen, welche in der Lage sind, T-Zell-Proliferation und T-Zell-Aktivierung zu generieren (WILLIAMS 1994).

Bevor ein Erreger jedoch vernichtet werden kann, muß er zunächst einmal als Eindringling erkannt werden. Hierfür stehen dem angeborenen Abwehrsystem Erkennungsmechanismen zur Verfügung, die als so genannte „pattern recognition receptors“ (PRR), also Struktur-erkennende Rezeptoren, bezeichnet werden. Dabei handelt es sich um Rezeptoren, die sich im Laufe der Evolution gegen spezifische charakteristische molekulare Strukturen von Pathogenen, die „pathogen associated molecular patterns“ (PAMP), entwickelt haben (MEDZHITOV 2002). Zu den PRR gehören bspw. die Toll-Rezeptoren und CD14 (JANEWAY 1998). Bekannte Vertreter der PAMPs sind z.B. Mannane in der Hefezellwand oder Bakterienzellwandbestandteile wie Lipopeptide, Peptidoglycane, Teichonsäuren und Lipopolysaccharid (LPS). LPS wird im Zusammenhang mit der Pathophysiologie des Septischen Schocks in den Kapiteln 1.4 und 1.6 näher beschrieben. Die APZ analysieren mit Hilfe ihrer PRR die Pathogene, also die PAMP. Wird ein PAMP identifiziert, werden die APZ entsprechend aktiviert, phagozytieren und prozessieren das entsprechende PAMP-tragende Pathogen, um es anschließend den B- und T-Lymphozyten (s. Kapitel 1.2.3 und 1.2.4) zu präsentieren. Die Erkenntnis, dass die Toll-Rezeptoren in Insekten und ihre Äquivalente bei Säugetier und Mensch, die „Toll-like-Rezeptoren“ (TLR) als PRR bei der Identifikation der PAMP in der ersten Reihe stehen, hat das Interesse der Wissenschaft an den Mechanismen der angeborenen Abwehr erneut geweckt (WAGNER 2001). Die Toll-Rezeptoren der Insekten, bzw. die TLR von Mensch, Tieren und sogar Pflanzen, bestehen aus einer hochkonservierten zytoplasmatischen Domäne, TIR (toll/interleukin-1 receptor domain) genannt, sowie aus einer Leucin-reichen extrazellulären Domäne, welche den Kontakt mit dem PAMP herstellt. APZ, die diese TLR exprimieren, haben also eine Schlüsselrolle bei der Antigenerkennung und üben somit auch Kontrolle über die nachgeschaltete adaptive Immunantwort aus (WAGNER 2001). Bis dato sind bereits 11 verschiedene TLR beim Menschen und 13 TLR bei der Maus identifiziert worden. (DUNNE 2005) DNS, die CpG-Motive trägt, wird ebenfalls von den TLR erkannt - Näheres hierzu im Kapitel 1.7.

1.2.2 Die unspezifische humorale Abwehrreaktion

Das Komplementsystem gehört gemeinsam mit u.a. Lysozym, den Zytokinen und den Akut-Phase-Proteinen zum humoralen angeborenen Abwehrsystem, dass sich unspezifisch gegen alle PAMPs richtet und daher auch als unspezifisches Immunsystem bezeichnet wird.

Das Komplementsystem besteht aus einer Kaskade von über 20 Proteinen, die im Blutplasma gelöst und teilweise auch zellgebunden vorliegen. Diese Kaskade kann sowohl Antikörper-vermittelt (so genannte klassische Aktivierung) als auch Antikörper-unabhängig (alternative Aktivierung) aktiviert werden.

Lysozym ist ein Enzym, welches beim Menschen vor allem in der Tränenflüssigkeit, im Bronchialsekret und in der Lymphflüssigkeit vorkommt. Dieses Enzym wirkt bakterizid, da es durch Spaltung der glykosidischen

Bindung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure die Mureinschicht der Zellwände einiger grampositiver Bakterien zerstören kann.

Zytokine sind körpereigene, lösliche Faktoren (Peptide), die von unterschiedlichen Zellen wie bspw. Makrophagen und T-Zellen gebildet werden, und ihre Wirkung abhängig von der Art der Zielzelle durch Bindung an einen Zytokinrezeptor entfalten. Zu den Zytokinen gehören u.a. die Interleukine (IL), die Interferone, Wachstumsfaktoren und die chemotaktischen Peptide. Interferone sind niedermolekulare Proteine, die streng speziesspezifisch über spezifische Rezeptoren als Hemmstoffe der intrazellulären Virusreplikation wirken. Es gibt eine Vielzahl von Interleukinen, die ebenso vielfältige Funktionen haben. IL-2 wird von aktivierten T-Zellen (s. 1.2.4) gebildet und stimuliert u.a. das Wachstum der T-Zellen, sowie die Proliferation der B-Zellen und die Produktion anderer Zytokine. IL-1 und IL-6 induzieren u.a. die Synthese der Akut-Phase-Proteine, welche im Kapitel 1.8 gesondert besprochen werden.

1.2.3 Die durch B-Zellen und Antikörper vermittelte spezifische humorale Immunreaktion

Die spezifische humorale Immunreaktion wird über die B-Lymphozyten, beziehungsweise über die von ihnen gebildeten Antikörper, vermittelt. Die B-Lymphozyten entstehen, wie auch die T-Lymphozyten (s. 1.2.4), aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Die B- und T-Lymphozyten wurden nach ihren jeweiligen primären Differenzierungsorten benannt: Der primäre Differenzierungsort der B-Lymphozyten wurde erstmalig bei Vögeln beschrieben, nämlich die „bursa fabricii“, von der sich das „B“ der B-Lymphozyten also ableitet. Beim Menschen wird das Knochenmark daher in diesem Zusammenhang auch als „bursaäquivalentes Organ“ bezeichnet. T stellt eine Abkürzung für Thymus dar, in welchen die im Knochenmark ausgebildeten T-Lymphozyten zur primären Differenzierung einwandern.

Sowohl B- als auch T-Lymphozyten werden erst durch Kontakt mit einem spezifischen Antigen aktiviert und durchlaufen anschließend beide den Prozess der klonalen Selektion, was im anschließenden Unterabschnitt genauer erläutert wird. Im Unterschied zu den T-Lymphozyten tragen die B-Lymphozyten jedoch keine echten Rezeptoren, sondern membranständige Antikörper, die hochspezifisch frei zirkulierende Antigene erkennen. Nachdem diese, an der Zellmembran der B-Lymphozyten, haftenden Antikörper ihr spezifisches Antigen gebunden haben, differenziert sich der B-Lymphozyt zur Plasmazelle aus. Plasmazellen sezernieren Antikörper, die identisch mit jenen sind, die ihre Vorläuferzelle, also der B-Lymphozyt, vor seiner Ausdifferenzierung auf der Zellmembran präsentiert hatte. Diese Antikörper, die auch Immunglobuline genannt werden, zirkulieren frei in fast allen Körperflüssigkeiten. Antikörper sind Glykoproteine, die anhand struktureller Merkmale in unterschiedliche Klassen unterteilt werden, jedoch eine gemeinsame Eigenschaft besitzen, nämlich die spezifische Bindung von Antigenen. Immunglobuline sind aus zwei schweren (H)- und zwei leichten (L)-Ketten aufgebaut, die jeweils durch mehrere Disulfidbrücken zusammengehalten werden, wodurch sie ihre typische Y-förmige Grundstruktur, bestehend aus einem konstanten und einem variablen Teil, erhalten. Letzterer bestimmt die Spezifität der Antigenbindung. Diese Spezifität wird dadurch garantiert, dass jeder Antikörper ausschließlich zu Bindung eines einzigen Antigens in der Lage ist, nämlich jenem, welches ursprünglich zur Aktivierung des B-Lymphozyten geführt hat. Anhand ihres konstanten Teils werden die Antikörper in fünf verschiedene Klassen eingeteilt, nämlich in IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. In den einzelnen Klassen werden wiederum Subpopulationen unterschieden. Durch spezifische Bindung an Oberflächenmoleküle pathogener Erreger können sowohl die für die Pathogenität verantwortlichen Rezeptoren blockiert werden, als auch verschiedene sekundäre, antigenunspezifische Reaktionen ausgelöst

werden, die zur Inaktivierung und Elimination der Erreger führen. Reaktionen dieser Art sind die Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen, welche bspw. zur Präzipitation der Erreger führen können, und die Aktivierung des Komplementsystems, einer Proteinkaskade, welche zur Zerstörung von Zellmembranen und Opsonisierung der Erreger führt (s. Kapitel 1.2.2).

1.2.4 Die durch T-Lymphozyten vermittelte spezifische zelluläre Immunreaktion

Die T-Lymphozyten sind die Träger der spezifischen zellvermittelten Immunität. Sie erkennen spezifisch die Antigene, welche sich in gebundener Form auf der Oberfläche anderer, körpereigener Zellen, den bereits unter 1.2.2 erwähnten APZ, befinden. Die Erkennung des jeweiligen Antigens wird bei den T-Lymphozyten durch ein Oberflächenmolekül, den T-Zellrezeptor (TZR), vermittelt und ist hochspezifisch, da einzelne T-Lymphozyten stets nur eine einzige Sorte dieses antigenspezifischen Rezeptors exprimieren und somit auch nur ein einziges Antigen erkennen können. Es gibt jedoch auch Antigene, die dieses hochspezifische „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ unterlaufen können: Die Superantigene. Ihre Entdeckung widerlegte das bis dahin geltende Dogma, dass die Interaktion vom präsentierten Antigen und TZR ausschließlich nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip funktioniert und damit hochspezifisch sei, wie im Abschnitt 1.4 ausgeführt werden wird.

Wie oben erwähnt, erkennen T-Lymphozyten ihr Antigen nur gebunden auf der Oberfläche anderer Zellen. Diese Bindung findet an Molekülen statt, die von den Genen des sog. Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) kodiert werden. Struktur und Funktion des T-Zellrezeptors im Zusammenspiel mit den MHC-Molekülen wird gesondert im anschließenden Kapitel besprochen. Die Antigenpezifität wird bereits während der Entwicklung der T-Zellen im Thymus, auch primäres lymphatisches Organ genannt, festgelegt, also schon vor dem ersten Antigenkontakt. Die ruhenden T-Lymphozyten werden erst durch Erkennung ihres jeweiligen Antigens aktiviert, d.h. im Zusammenspiel mit anderen Faktoren zur Proliferation und Reifung angeregt, deren terminales Differenzierungsstadium als Effektorzelle bezeichnet wird. Man bezeichnet diese spezifische Aktivierung durch Antigenkontakt als klonale Selektion. Diese klonale Selektion findet vorwiegend in den sekundären lymphatischen Organen, in denen sich auch der Großteil APZ befindet, also in der Milz, den Lymphknoten und den Peyerschen Plaques, statt.

Es lassen sich drei wesentliche Hauptgruppen von T-Zellen unterscheiden, welche jeweils noch in Subpopulationen unterteilt werden können: Erstens so genannte zytotoxische T-Zellen, die bei spezifischer Erkennung des Antigens die antigenpräsentierende Zelle zerstören, zweitens die T-Helferzellen, welche durch Freisetzung von Proteinen, den Interleukinen, Wachstum und Funktionen anderer Zellen beeinflussen und auf diese Weise die Abwehrreaktion unterstützen können und drittens die T-Suppressorzellen, auch regulative T-Zellen genannt, welche dem Überschießen einer Immunreaktion, bspw. via Ausschüttung von Interleukin 10, entgegenwirken (MALOY 2001, WALDMANN 2001). Die verschiedenen Subpopulationen der Lymphozyten können auch immunphänotypisch unterschieden werden: Bspw. tragen T-Helferzellen das Merkmal CD4-positiv und zytotoxische T-Zellen sowie regulative T-Zellen jeweils das Merkmal CD8-positiv. CD ist hierbei die Abkürzung für „cluster of differentiation“ und bezeichnet eine internationale Nomenklatur für Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen, im engeren Sinne - also von Antigenen in Form membranständiger Glykoproteine, die sich nach biochemischen oder funktionellen Kriterien ordnen lassen. Die Einteilung CD4⁺ T-Helfer-Zellen bzw. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen gilt jedoch nicht streng, da auch CD4⁺ zytotoxische T- und CD8⁺ T-Helfer-Zellen identifiziert wurden (FISCH 1997). CD8⁺

TK-Zellen werden nach ihrem Zytokinprofil außerdem auch in TH1 (Interferon- γ -produzierende) und TH2 (Interleukin-4-produzierende) T-Zellen eingeteilt (VUKMANOVIC-STEJIC 2000).

Ein Teil der durch Antigene spezifisch aktivierten T- und B-Lymphozyten bleiben als so genannte Gedächtniszellen über Jahre hinaus wirkungsvoll. Gedächtnis T- und B-Zellen gewährleisten, dass bei einer Reinfektion mit einem dem Immunsystem bereits „bekannten“ Erreger, eine Immunantwort schneller und wirkungsvoller aktiviert werden kann (LANZAVECCHIA 2000). Diese Zellen vermögen auf erneuten Antigenkontakt zu reagieren und aus dem Status der Gedächtniszelle rasch in den der aktiven B- bzw. T-Effektorzelle überzugehen. Streng genommen, sollte man folglich alle unspezifischen Abwehrmechanismen, die in den Abschnitten 1.2.1 und 1.2.2 erläutert wurden, nicht als Teil des Immunsystems bezeichnen, sondern hierfür besser den Begriff Abwehrsystem verwenden, da Immunität, also das immunologische Gedächtnis, ausschließlich durch das adaptive, spezifische Immunsystem vermittelt werden kann. In der wissenschaftlichen Literatur ist jedoch der Begriff „unspezifisches Immunsystem“ ebenso gebräuchlich.

1.3 Struktur und Funktion des T-Zellrezeptors und der MHC-Moleküle

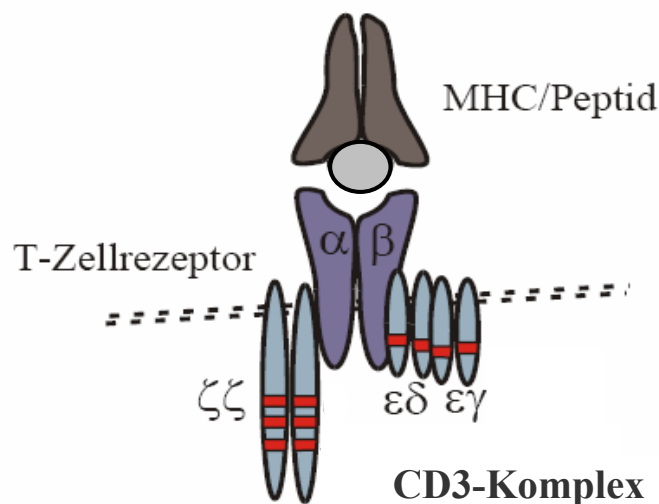


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptorkomplex

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, wird die Antigenerkennung der T-Lymphozyten durch den T-Zellrezeptor (TZR) gesteuert, der Antigene hochspezifisch über die MHC-Moleküle bzw. bestimmte Aminosäurereste eines Peptids in Verbindung mit einem definierten, körpereigenen MHC-Allel erkennt. Dieses Phänomen dieser bedingten, also von der Assoziation mit eigenen MHC-Molekülen abhängigen, Erkennungprozessierter Peptidantigene bezeichnet man als MHC-Restriktion (ZINKERNAGEL 1974a, ZINKERNAGEL 1974b). Der TZR setzt sich aus einem Glykoprotein-Heterodimer und einer, nicht kovalent gebundenen, Signaltransduktionseinheit zusammen, welche als CD3 bezeichnet wird (WHETSELL 1991). Das CD3 Molekül besteht aus 3 Dimeren, einem $\epsilon\delta$ -, einem $\gamma\epsilon$ - und einem $\zeta\zeta$ -Dimer (Abb. 1). Die beiden Glykoproteinketten, die auch zur Superfamilie der Immunoglobuline gehören, besitzen einen konstanten (mem-

branären) sowie einen variablen Teil und werden durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (BORST 1996). Das durch eine APZ präsentierte Antigen bindet an die Glykoproteindimere des TZR. Die Diversität dieser Glykoproteinketten des TZR beruht auf den gleichen Mechanismen, die auch für die Entstehung der Antikörper-Vielfalt verantwortlich sind (WOOD 1983), jedoch finden sich keine somatischen Hypermutationen in den variablen Regionen. Diese variablen Regionen setzen sich bei der α - und γ -Kette jeweils aus zwei verschiedenen Segmenten, nämlich dem V(variablen)- und dem J(joining)-Segment, zusammen. Bei der β - und δ -Kette - findet sich, neben V- und J-Segment, zusätzlich ein D(diversity)-Segment. Die enorme Vielfalt von bis zu 1015 Spezifitäten (DAVIS 1988) entsteht somit zum einen durch somatische Rekombination von V-, D-, und J-Segmenten aus der Keimbahn und zum anderen durch die Ungenauigkeit der Verknüpfung der einzelnen Regionen durch die terminalen Transferasen (WANG 1997, GILFILLAN 1995). T-Zellen, deren TZR α - und β -Ketten trägt, lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: Die eine Klasse besitzt neben dem TZR ein als CD4 bezeichnetes, membranständiges Glykoprotein und die Antigenerkennung erfolgt nur im Kontext mit MHC-Klasse-II-Molekülen. Die zweite Gruppe von T-Zellen trägt auf ihrer Oberfläche das sog. CD8-Glykoprotein und diese T-Zellen zeigen sämtlich eine MHC-Klasse-I-Restriktion (LITTMAN 1987). Sowohl CD4 als auch CD8 stabilisieren dabei den jeweiligen trimeren MHC-Peptid-TZR-Komplex. Wie bereits in Kapitel 1.2.1 erwähnt, tragen T-Helferzellen im Allgemeinen das CD4- und zytotoxische T-Lymphozyten das CD8-Antigen. Die Glykoproteine stellen also Korezeptoren des TZR dar, die festlegen, mit welcher MHC-Klasse der jeweilige T-Lymphozyt via TZR interagieren kann. Um eine klonale Expansion der T-Lymphozyten zu erreichen, sind nicht nur spezifische Liganden, sondern auch kostimulatorische Signale der APZ notwendig, d.h. neben dem über den TZR vermittelten Signal (Signal 1) ist eine zusätzliche Aktivierung des T-Lymphozyten durch ein zweites Signal erforderlich, welches bspw. über CD28 vermittelt werden kann (LENSCHOW 1996). Denn die alleinige Stimulation über den TZR-CD3-Komplex ohne Kostimulus führt zu einem Zustand der als Anergie bezeichnet wird (MEDEMA 1999). Wird nach der TZR-Stimulation IL-2 synthetisiert, führt dieses zur Zellzyklusprogression und zur Proliferation der T-Zelle. Andere, durch den TZR stimulierte, Signalwege führen zur Änderung des Zytoskeletts, sowie zur Produktion von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen (DUSTIN 2000).

MHC-Moleküle werden in zwei Klassen eingeteilt, nämlich in MHC I- und MHC II-Moleküle. Klasse I-Moleküle (MHC I) finden sich auf fast allen kernhaltigen Zellen des Körpers, und präsentieren zytosolische Proteine, die zuvor im Proteosom prozessiert wurden. Alle zytosolischen Proteine, somit auch Virusproteine oder mutierte Proteine, werden routinemäßig proteolytisch abgebaut (YORK 1999). Klasse II-Moleküle (MHC II) werden nur von antigenpräsentierenden Zellen, bspw. Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Wie unter 1.2.4 ausgeführt, werden die Antigene von den APZ durch Phagozytose aufgenommen. Anschließend werden die prozessierten Antigene gemeinsam mit den MHC II-Molekülen präsentiert. Alle Zellen eines Individuums bekommen also durch den MHC-Komplex ein gemeinsames Merkmal. Unter MHC wird der Locus eines Genoms verstanden, an welchem die charakteristischen gemeinsamen Oberflächeneigenschaften aller Zellen eines Individuums codiert sind. Beim Menschen wird der MHC im Unterschied zu anderen Arten als HLA (Humanes-Leukozyten-Antigen) bezeichnet. Dieser MHC bzw. HLA ist beim Menschen am Chromosom 6 lokalisiert und läßt sich, in Abhängigkeit von den AG-Klassen für die codiert wird, in verschiedene Loci unterteilen.

1.4 Superantigene

Wie im Kapitel 1.2.4 bereits angesprochen, widerlegte die Entdeckung der Superantigene das bis dahin geltende Dogma, dass die Interaktion vom präsentierten Antigen und TZR *ausschließlich* nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip funktioniere und damit stets hochspezifisch sei. Im Jahr 1973 berichtete Festenstein erstmalig über Antigene, die Lymphozyten in einem ungewöhnlichen Ausmaß stimulieren konnten. Er bezeichnete diese zunächst als „Minor Lymphocyte-stimulating“-Antigene. Der Begriff Superantigen wurde erst später eingeführt, um eine Gruppe mikrobieller Antigene zu beschreiben, die sich in verschiedenen Aspekten von konventionellen Antigenen unterscheiden (WHITE 1989). Wie im vorigen Kapitel ausgeführt, wird die Spezifität der Bindung der „herkömmlichen“ Antigene von den variablen Genen des TZR bestimmt und funktioniert nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Superantigene unterlaufen dieses Prinzip, indem sie den variablen Bindungsstellen für Antigene an den MHC-Molekülen und T-Zell-Rezeptoren „ausweichen“ und stattdessen spezifisch mit der V β -Kette des TZR sowie den MHC II, und zwar jeweils *außerhalb* der Antigen- bzw. Peptidbindungsdomäne, interagieren (DAVIS 1988, GASCOIGNE 1993). Superantigene werden auch nicht phagozytiert sondern binden unprozessiert als komplettes Protein außerhalb der peptidbindenden Grube am nichtpolymorphen Teil von MHC Klasse II Molekülen (DELLABONA 1990, FRASER 2000). Die Spezifität der Interaktion von Superantigen und TZR ist also von der V β -Kette abhängig. Da man beim Menschen aufgrund ihrer Sequenz nur etwa 25 V β -Konfigurationen unterscheiden kann, ist die Wahrscheinlichkeit der Bindung des Superantigens an den TZR bedeutend höher, als die Wahrscheinlichkeit der spezifischen Interaktion eines herkömmlichen Antigens mit seinem hochspezifischen TZR. In Abhängigkeit von Beschaffenheit und Konzentration des jeweiligen Superantigens führt dieses zur initialen Proliferation von bis zu 25% des individuellen T-Zellrepertoires, während die Reaktionshäufigkeit bei der konventionellen Antigenpräsentation zwischen 0,001% und 0,1% der Zellen liegt (IRWIN 1993). Superantigene stellen keine PAMPs dar und werden somit nicht von TLR (s. Kapitel 1.2.1) erkannt (DALPKE 2003).

Die überwiegende Zahl der bisher bekannten Superantigene wird von grampositiven Bakterien produziert. Am besten untersucht sind hiervon die Exotoxine von *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes*. Bei den Superantigenen von *S. aureus* handelt es sich um dessen pyrogene Exotoxine, nämlich Staphylokokken-Enterotoxine (SE), das Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1) welches die gleichnamige Erkrankung auslöst (MARRACK 1990), sowie das Exfoliative Toxin (MONDAY 1999). Die Staphylokokken-Enterotoxine umfassen eine Gruppe sehr hitzebeständiger, nicht glykosylierter, globulärer Proteine mit einer Größe von 228 bis 239 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 26,4 bis 28,4kD, die transepithelial als intakte Proteine aufgenommen werden können (WHITE 1989, KOTZIN 1993). Sie bestehen alle aus einer einfachen Polypeptidkette, die eine einzelne Disulfid-Schleife enthält und lassen sich serologisch differenzieren. Die ersten Hauptantigentypen des Staphylokokken-Enterotoxine wurden als SEA und SEB bezeichnet, inzwischen sind eine Reihe weiterer Hauptantigentypen identifiziert worden. Aktuell sind die Typen SEA - SEQ bekannt (SMYTH 2005). Die bakteriellen Superantigene weisen untereinander eine hohe Sequenzhomologie auf, wohingegen die Sequenzen vom *Mycoplasma arthridis* Mitogen (COLE 1991) sowie vom *Yersinia pseudotuberculosis* Mitogen (ITO 1995) jeweils keine bedeutende strukturelle Ähnlichkeit mit den bakteriellen Toxinen aufweisen. Virale Superantigene sind beim vom Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) entdeckt worden (ACHA-ORBEA 1995) und werden beim Cytomegalovirus (CMV) (DOBRESCU 1995) und Epstein-Barr Virus (EBV) (FRASER 2000) vermutet. Beim sogenannten „human immunodeficiency-virus“ (HIV)-assoziierten Protein Nef wurden Eigenschaften entdeckt, die charakteristisch für Superantigene sind (LAPATSCHEK 2001).

Die durch Superantigene vermittelte Stimulation der T-Lymphozyten führt zu polyklonaler Proliferation,

zur Induktion von Apoptose und/oder Anergie der Zellen (HERMAN 1991, HUANG 1993). Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei Superantigen-präsentierenden Zellen, also MHC-Klasse-II-positiven Makrophagen und deren Varianten, sowie bei B-Zellen, gemacht werden (AOUDIJT 1995). Auch diese Zellen können nach Superantigenkontakt aktiviert oder getötet werden. Im Mausmodell konnte nach parenteraler Verabreichung von bakteriellen Enterotoxinen bereits nach 30-60 Minuten post injectionem ein deutlicher Anstieg der Serumspiegel von TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) beobachtet werden, der vom Anstieg der Serumspiegel von IL-2 dicht gefolgt wurde. (MIETHKE 1992b). Ferner wurde, neben einer Reihe anderer pathophysiologischer Veränderungen, die Reduktion der Expression von L-Selektin *in vivo* beobachtet (MIETHKE 1993b). L-Selektin ist ein Leukozyten-Adhäsionsmolekül und steht am Anfang einer Kaskade, die zur Extravasation von Leukozyten, also bspw. ihrer Rekrutierung in akute Entzündungsherde, führt.

Staphylokokken-Enterotoxine sind an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen beteiligt, bspw. an bestimmten Arten der Lebensmittelvergiftungen (BALABAN 2000). Außerdem kann das bekannte Toxic-Shock-Syndrome sowohl von Staphylokokken-Enterotoxinen als auch von Streptokokken-Enterotoxinen hervorgerufen werden (MIETHKE 1993a, NORRBY-TEGLUND 2001). Superantigene sind an der Pathogenese des plötzlichen Kindstodes beteiligt (CSUKAS 2001, MOSCOVIS 2004). Ebenso werden sie mit der Pathogenese von Autoimmunerkrankheiten wie bspw. der rheumatoiden Arthritis (PALIARD 1991), der Encephalomyelitis disseminata (WUCHERPFENNIG 1992) und dem Sjögren Syndrom (SUMIDA 1992) in Zusammenhang gebracht. Auch bei HIV-Infektionen wird eine ätiopathogenetische Beteiligung der Superantigene diskutiert (MULLER 1997, LAPATSCHEK 2001).

Eine zentrale Rolle spielen die bakteriellen Superantigene in der Pathogenese des Septischen Schocks (WAGNER 1992, MIETHKE 1992b), einem lebensbedrohlichen Krankheitsbild, welches unter Kapitel 1.6 beschrieben wird. Experimente in Mausmodellen ergaben, dass die Induktion des Septischen Schocks durch das Superantigen SEB über die T-Zellen vermittelt wird, wohingegen die Induktion des Septischen Schocks durch das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) Makrophagen-vermittelt ist (MIETHKE 1992b). LPS befindet sich auf der Oberfläche gramnegativer Bakterien und wird im allgemeinen wissenschaftlichen Sprachgebrauch mit dem Begriff Endotoxin gleichgesetzt, eigentlich besteht LPS jedoch aus einem speziesspezifischen Oberflächenantigen, einem so genannten Core-Polysaccharid, welches über Ketodesoxyoctonat mit dem eigentlichen Endotoxin, dem Lipid A, verbunden ist. Endotoxine sind im Gegensatz zu Exotoxinen, die sezerniert werden, ein fester Bestandteil der Bakterienzelle selbst und werden somit erst bei Destruktion oder Autolyse der Bakterien liberiert.

1.5 Die TNF/TNF-Rezeptor-Superfamilie

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits erläutert, spielt das Zytokin TNF α eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Septischen Schocks. Zytokine müssen, im Gegensatz zu vielen Hormonen, nicht in die Zelle eindringen, um eine Wirkung zu erzielen. Sie docken stattdessen an spezifische membranständige Rezeptoren an. Durch die Bindung des Zytokinliganden an diese Rezeptoren wird eine intrazelluläre Reaktionskaskade ausgelöst. Dieser Vorgang wird auch als Signaltransduktion bezeichnet. Die Expression von Rezeptormolekülen ist also wesentlich für die Wirkung eines Zytokins. Für TNF α gibt es zwei Rezeptoren, nämlich den TNFRp55 und den TNFRp75. Diese beiden Rezeptoren sind die namensgebenden Vertreter einer Gruppe strukturell und funktionell verwandter Rezeptoren: Der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Zu dieser Superfamilie werden momentan etwa 40 Rezeptoren gezählt, zu ihnen gehören, neben den beiden Hauptvertretern

TNFRp55 und TNFRp75, bspw. der Lymphotoxin β -Rezeptor (LTR β), TRAIL, LIGHT und FAS (HEHLGANS 2005). Alle Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie sind transmembranäre Proteine vom Typ I die zudem, als weiteres gemeinsames Merkmal, Cystein-reiche Domänen besitzen. Hierbei handelt es sich um sogenannte "Pseudorepeats", welche aus, die Proteinstränge verbindenden, Disulfidbrücken bestehen. Diese Disulfidbrücken resultieren wiederum aus hochkonservierten Cysteinresiduen (SMITH 1994).

Das Lymphotoxin α (LT α) kann als Homotrimer an TNFRp55 und TNFRp75 binden. Die Lymphotoxine, ebenfalls Zytokine, wurden früher als TNF β bezeichnet und weisen mit TNF α eine hohe Sequenzhomologie auf. Zusammen mit dem membrangebundenen Lymphotoxin β (LT β) bindet LT α als Heterotrimer (LT $\alpha_1\beta_2$) an den Lymphotoxin- β -Rezeptor (LTR β), kann aber auch als Homotrimer daran binden. LIGHT, ein neueres Mitglied der TNFR-Superfamilie, ist ebenfalls ein Ligand des LTR β -Rezeptors (ZHAI 1998). Es wurde gezeigt, dass LT α im Zusammenspiel mit dem TNFRp55 eine entscheidende Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Erreger spielt (ALIMZHANOV 1997). LT α und LT β werden von aktivierten Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert (WARE 1992), TNF hingegen wird von einer Vielzahl an lymphoiden und nicht-lymphoiden Zellen, entweder membrangebunden oder als lösliches Trimer, exprimiert (ALIMZHANOV 1997). Die gezielte gentechnische Deletion ("knock out") von LTR β , TNFRp55, LT α , LT β führt im Mausmodell jeweils zu unterschiedlichen pathoanatomischen Veränderungen der Organe des Immunsystems, insbesondere zu Veränderungen der Lymphknotenarchitektur (ALIMZHANOV 1997, FÜTTERER 1998).

Funktionell kann man die TNF-Rezeptor-Superfamilie in 2 Gruppen unterteilen: Die erste Gruppe, zu der u.a. TNFRp55 und FAS gehören, führt nach Ligandenbindung zur Apoptose der Zelle. Zu dieser Untergruppe gehörige Rezeptoren tragen in ihrer zytoplasmatische Domäne eine sogenannte „death domain“, welche die Caspase-Enzymkaskade aktiviert, welche schlußendlich in der zelluären Apoptose mündet. Zur zweiten Gruppe zählen u.a. der LTR β und der TNFRp75. Die Mitglieder dieser Gruppe führen nach Ligandenbindung zur Aktivierung von Proteinen aus der TRAF-Familie, d.h. "TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren", wodurch verschiedene Signaltransduktionswege wie bspw. der ERK-pathway (ERK engl.: extrazelluäre signal-related kinase) aktiviert werden (HEHLGANS 2005).

FAS, auch CD 95 oder APO1 genannt, ist also ein weiteres wichtiges Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Die Bindung an seinen spezifischen Liganden, den FAS-Liganden (FAS-L), führt zur Apoptose. Der FAS-Ligand aktiviert die FADD (engl. "FAS associated death-domain"), die auch durch TNF α via TRADD ("TNF-Rezeptor-associated death domain") aktiviert werden kann (GAUR 2003). FAS wird ubiquitär exprimiert, wohingegen die Expression des FAS-Liganden vorwiegend auf aktivierte T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen (vgl. hierzu auch Kapitel 1.2.1 und 1.2.4) beschränkt ist. Der FAS-Rezeptor kann sowohl durch membrangebundenen, als auch durch solubilisierten FAS-L aktiviert werden (NAGATA 1997). Das murine Gen *lpr* kodiert für eine aberrante, dysfunktionale Form des FAS-Rezeptors und das murine *gld*-Gen für eine mutierte, dysfunktionale Form des FAS-Liganden. Die Expression von *lpr* sowie die Expression von *gld* verursachen jeweils ein lymphoproliferatives Syndrom im Sinne einer Autoimmunerkrankung (REAP 1995). Diese *lpr* - Mäuse zeigen interessanterweise eine jeweils erhöhte Suszeptibilität für einen Enterotoxin-vermittelten Schock, was auf eine potentielle protektive Wirkung des FAS-Rezeptors gegenüber einem Superantigen-vermittelten septischen Schock hinweist (MOUNTZ 1995).

1.6 Definition, Symptome und Pathophysiologie des Septischen Schocks

Der Begriff „Sepsis“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet „Fäulnis“. Die klassische infektiologische Definition der Sepsis geht auf Hugo Schottmüller im Jahre 1914 zurück: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“ (SCHOTTMÜLLER 1914). Nachfolgende Definitionen der Sepsis haben diese Erstdefinition zwar variiert, aber nicht wesentlich verändert (BODMANN 2001). 1991 fand in Northbrook (USA) die Konsensus-Konferenz der Vertreter des „American College of Chest Physicians“ und der „Society of Critical Care Medicine“ statt, auf der die Begriffe Infektion, Bakteriämie, SIRS (engl. systemic inflammatory response syndrome), Sepsis, schwere Sepsis, Septischer Schock und MODS (multiple organ dysfunction syndrome) jeweils im Sinne einer klinischen Definition festgelegt wurden (BONE 1991). Demzufolge liegt ein SIRS dann vor, wenn zwei oder mehr der folgenden Symptome auftreten: Körpertemperatur über 38°C oder unter 36°C, Tachykardie mit einer Herzfrequenz von über 90 Schlägen pro Minute, Hyperventilation mit einem Kohlendioxid-Partialdruck von weniger als 32 mm/Hg sowie entweder eine Leukozytose oder eine Leukopenie.

Bakteriämie ist die Anwesenheit von vitalen Bakterien in der Blutbahn. Sepsis ist die systemisch inflammatorische Reaktion auf eine Infektion, also eine Fortentwicklung des oben beschriebenen klinischen Bildes des SIRS, wobei die Sepsis ein dynamischer Krankheitsprozess ist und ihre getrennt voneinander definierten Stadien, nämlich Sepsis, schwere Sepsis, Multiorganversagen sowie Septischer Schock, jeweils einzelne Stadien eines kontinuierlich ineinander übergehenden Krankheitsgeschehens darstellen. Neben den klinischen Symptomen ist natürlich der Erregernachweis aus dem Blut von entscheidender Bedeutung für die Diagnosestellung. Das Modell von Bone geht weiterhin davon aus, dass das SIRS im betroffenen Organismus ein so genanntes CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome) auslöst. Stellt sich im Erkrankten zwischen diesen beiden gegensätzlich wirksamen Reaktionen kein Gleichgewicht ein, so schreitet die Erkrankung in den beschriebenen Stadien weiter fort und führt ggf. auch zum Tode (BONE 1996).

Etwa die Hälfte der an einer Sepsis erkrankten Patienten erleidet einen Septischen Schock, welcher mit einer Mortalitätsrate von über 50% einhergeht (PARRILLO 1993).

Wie in Kapitel 1.4 bereits angeführt, wird der Exotoxin-vermittelte Septische Schock über T-Zellen vermittelt, wohingegen die Induktion des Septischen Schocks durch das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) Makrophagen-vermittelt ist. Lipopolysaccharide gehören zu den potentesten biologischen Toxinen, welche die Immunabwehr im Organismus zu stimulieren vermögen. Applikationen im Pikogrammbereich reichen aus, um Zellen des Immun-, Entzündungs- und Gefäßsystems zu stimulieren. LPS ist, wie zuvor bereits erwähnt, ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien und kann, im Falle einer schweren systemischen Infektion, eine Kaskade von Ereignissen im infizierten Organismus auslösen, die letztendlich zum Septischen Schock führt: Das im LPS enthaltene Endotoxin Lipid A interagiert mit dem CD14-TLR4 Komplex und stimuliert so CD14-positive Makrophagen (WRIGHT 1990, GANGLOFF 2005), welche hernach u.a. proinflammatorische Zytokine, insbesondere IL1, IL6 und TNF α , ausschütten (MEGYERI 1990). Die massive Ausschüttung solcher Zytokine durch Makrophagen kann u.a. die Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen stimulieren und die Komplement- und Gerinnungskaskade aktivieren (PERLIK

2005). In der Folge können u.a. zunächst hohes Fieber, eine Verbrauchskoagulopathie und ein Blutdruckabfall auftreten, später kann ein Organversagen eintreten. Neben gramnegativen Bakterien, können auch die Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien, wie bspw. Lipoteichonsäure, einen Septischen Schock auslösen (KENGATHARAN 1998, MENG 2004). Endotoxine und Superantigene können bei der Induktion des Septischen Schocks synergistisch wirken (BLANK 1997).

1997 fanden Sparwasser et al. heraus, dass sogar bakterielle DNS in, zuvor mit D-Galactosamin sensibilisierten, Mäusen einen letalen Septischen Schock auslösen kann, wie im folgenden Kapitel näher erläutert werden wird (SPARWASSER 1997a). Mäuse, die mit D-Galaktosamin (DGal) oder anderen hepatotoxischen Substanzen vorbehandelt sind, reagieren etwa 105-fach sensibler auf LPS und stellen somit ein nützliches Modell zum Studium der initialen Veränderungen beim Endotoxinschock dar (GALANOS 1979, FREUDENBERG 1991). Wie sich später herausstellte, ist dieses D-Gal Modell ebenso nützlich zum Studium des Enterotoxinschocks, bzw. des eben erwähnten, durch bakterielle DNS vermittelten, Schocks (MIETHKE 1992b).

1.7 Bakterielle DNS und synthetische CpG-Oligodeoxynukleotide (ODN) als Aktivatoren von Immunzellen

Bereits 1963 wurde die immunstimulatorische Wirkung körperfremder DNS beschrieben (JENSEN 1963). Später wurde gezeigt, dass DNS-Fractionen aus *Mycobacterium bovis* eine antitumorale Wirkung aufweisen, die Interferon γ -Produktion induzieren können und außerdem die NK-Zellen zu aktivieren vermögen (TOKUNAGA 1984, YAMAMOTO 1988, MASHIBA 1990). Nachfolgend wurde beschrieben, dass diese Induktion der NK-Zellaktivität nicht direkt durch die DNS, sondern indirekt durch die DNS-induzierte Ausschüttung von IL-12 Interferonen und TNF α vermittelt wird, wobei zusätzlich die Anwesenheit akzessorischer Zellen notwendig ist (BALLAS 1996, TOKUNAGA 1992). Die genaue Untersuchung dieser immunologisch aktiven DNS-Sequenzen ergab, dass es sich hierbei um Oligonukleotide handelt, die aus einem zentralen Palindrom mit einem CpG-Motiv bestehen (YAMAMOTO 1992a, YAMAMOTO 1992b). Dieses zentrale, immunstimulatorisch wirkende, CpG-Palindrom wird am 5'-Ende von zwei Purinen und am 3'-Ende von zwei Pyrimidinen flankiert (KRIEG 1995). Eine Inversion des CpG-Motivs zu einem GpC-Motiv oder die Methylierung des Cytosins hebt die durch virale, bakterielle oder synthetische CpG-DNS hervorgerufene Aktivierung von Immunzellen auf, was darauf hinweist, dass der stimulatorische Effekt der CpG-DNS sequenzspezifisch ist (KRIEG 1995, HEMMI 2000, BAUER 2001, STACEY 2003). Da sich die CpG-Motive sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten finden, stellt sich die Frage, auf welche Weise Vertebraten die eigenen CpG-Palindrome von denen der prokaryontischen Eindringlinge zu unterscheiden vermögen. Man fand zunächst heraus, dass hierzu u.a. die sogenannte CpG-Suppression beiträgt; dieser Terminus beschreibt die Tatsache, dass CpG-Motive in eukaryontischer DNS im Vergleich zu prokaryontischer DNS fünfmal seltener vorkommen. Zudem sind eukaryontische CpG-Motive im Gegensatz zu ihren prokaryontischen Äquivalenten zu 60-90% methyliert (BIRD 1986). Diese Methylierung zerstört das immunstimulatorische Potential der CpG-Inseln (KRIEG 1995). Vertebraten, also auch der Mensch, erkennen ihre körpereigene DNS selbst in höheren Konzentrationen nicht als „fremd“ an. (STACEY 2003). CpG-DNS, bzw. die sie imitierenden synthetischen CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN), gehören zu den PAMPs (s. Kapitel 1.2.1), die vom TLR9, welcher insbesondere von dendritischen Zellen (DZ) exprimiert wird, spezifisch erkannt werden können. Interaktionen zwischen TLR9 und CpG-DNS führen via Toll/IL-1-Rezeptor Sinaltransduktionsweg (s. Kapitel 1.2.1) u.a. zur Ausschüttung von TNF α , IL-6, IL-12 und IL-18 und unterstützen somit die Ausbildung einer

TH1-Immunantwort (WAGNER 2002). TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 und TLR6 erkennen pathogene Strukturen bereits an der Zellmembran, wohingegen TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in den Immunzellen im endosomalen Kompartiment exprimiert werden und dort auch erst in Kontakt mit ihren spezifischen Liganden treten können (AHMAD-NEJAD 2002, HEIL 2003, LEE 2003, MATSUMOTO 2003, LATZ 2004). CpG-Motive können also erst intrazellulär, nämlich im Endosom, von TLR9 erkannt werden. Diese limitierte Zugänglichkeit von TLR9 könnte demnach wesentlich zur Unterscheidung der pathogenen von den körpereigenen CpG-Motiven beitragen, da körpereigene DNS zumeist bereits extrazellulär durch DNAsen abgebaut wird und damit die TLRs in den intrazellulären Endosomen erst gar nicht erreicht (YASUDA 2005). Um dieser Hypothese nachzugehen, schleusten Yasuda et al. Vertebraten-DNS mittels eines kationischen Lipids in die Endosomen dendritischer Zellen (DZ) ein. Tatsächlich konnten sie hernach eine Aktivierung der DZ durch die endosomal translozierte Vertebraten-DNS beobachten. Zudem demonstrierten sie, dass die natürliche, also nicht Lipid-vermittelte, endosomale Translokation von Vertebraten-DNS sehr schnell abgesättigt ist (YASUDA 2005). Zusammenfassend liefert diese rezente Arbeit von Yehuda et al. also Hinweise dafür, dass die Verborgenheit der spezifischen Liganden der CpG-Motive, und die daraus resultierende erschwerte Zugänglichkeit für die körpereigene DNS, tatsächlich wesentlich zur Unterscheidung zwischen körpereigenen und fremden CpG-Inseln beiträgt.

CpG-ODN wirken sowohl auf reife als auch auf unreife DZ und verstärken auf beiden Zellpopulationen die MHC II-Expression sowie die Expression kostimulatorischer Moleküle (CD40, CD86) (SPARWASSER 1998). Neben ihrer Wirkung auf DZ und auf NK-Zellen, wirkt CpG-DNS auch auf andere APZ: CpG-ODN induzieren in Makrophagen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor κ B (NF κ B), die Transkription von Zytokin-mRNA (STACEY 1996) und die Sekretion von Zytokinen wie TNF α , IL-1, IL-6 und IL-12 (SPARWASSER 1997b, LIPFORD 1997b). Die Stimulation von gereinigten B-Lymphozyten mit unmethylierten CpG-ODN führt zur Proliferation und Sekretion von Immunglobulinen. CpG-ODN können sowohl indirekt, also im Sinne einer Kostimulation, als auch direkt auf B-Zellen, Makrophagen, und DZ wirken (KRIEG 1995, SPARWASSER 2000, PENG 2005). Zur direkten Aktivierung von T-Zellen sind CpG-ODN hingegen nicht in der Lage - wie sich nach einigen, zunächst kontroversen Beobachtungen über die Wirkungen von CpG-DNS auf T-Lymphozyten, schließlich herausstellte. Später konnten andere DNS-Motive, sogenannte Poly-G-Motive, als Kostimulatoren von T-Zellen identifiziert werden (LIPFORD 1997a, LIPFORD 2000).

Passend zu diesen *in vitro* Untersuchungen, konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass per injectionem applizierte CpG-ODN die Ausbildung einer TH1-Immunantwort unterstützen und eine starke peptidspezifische zytotoxische T-Lymphozytenaktivität induzieren (LIPFORD 1997a, ROMAN 1997, WEINER 1997). Diese Eigenschaft prädestiniert CpG-DNS zur Verwendung als Vakzin-Adjuvans; aktuell laufen diesbezügliche pharmakologische Studien (PAYETTE 2006). Wie bereits im vorangegangenen Kapitel zitiert, fanden Sparwasser et al. 1997 heraus, dass bakterielle DNS einen Septischen Schock in D-Galaktosamin präsensibilisierten Mäusen auslösen kann. In Mäuse injizierte synthetischen CpG-ODN aktivieren die Makrophagen, die wiederum TNF α liberieren, welches schließlich zum Septischen Schock führt (SPARWASSER 1997b). Später wurde beschrieben, dass LPS und CpG-ODN die TNF α -Produktion synergistisch induzieren können (GAO 2001).

Für die Wirkung von CpG-ODN auf das humane Immunsystem liegen, im Vergleich zum Immunsystem der Maus, nur relativ wenige Befunde vor. Es ist bekannt, dass CpG-ODN in Lymphozyten aus dem peripheren menschlichen Blut die Produktion von IFN α induzieren (YAMAMOTO 1994, ROMAN 1997). Außerdem wurde gezeigt, dass CpG-ODN nicht nur murine, sondern auch humane NK-Zellen indirekt, nämlich über von

Makrophagen produziertes IL-12, stimulieren können (BALLAS 1996). Humane periphere mononukleäre Zellen (Peripherblut monozytäre Zellen = PBMZ) werden durch CpG-ODN sequenzspezifisch aktiviert. Diese Aktivierung führt zu einer erhöhten Expression von CD86, CD40, MHC I- und MHC II-Molekülen sowie zu einer Produktion der Zytokine IL-12, IL-6 und $\text{TNF}\alpha$. Wie im murinen System, induzieren CpG-ODN auch die Proliferation humaner B-Zellen (BAUER 1999). Später wurde beschrieben, dass verschiedene Typen von CpG-ODN Primaten und Nagetiere unterschiedlich stark stimulieren. CpG-ODN-Typen, die in Nagetieren starke immunstimulatorische Aktivität aufwiesen, zeigten bei Primaten, zu denen auch der Mensch gehört, nur wenig Wirkung. Sogenannte D-type CpG-ODN stimulieren DZ zur $\text{IFN}\alpha$ -Produktion und NK-Zellen zur $\text{IFN}\gamma$ -Produktion. K-type CpG-ODN hingegen stimulieren B-Zellen und Monozyten zur Proliferation und Sekretion von IL-10 und/oder IL-6. CpG-ODN werden als Adjuvans von Impfstoffen (DONNELLY 1997, SPIES 2003) und als Therapeutika, bspw. bei malignen Tumorerkrankungen, diskutiert bzw. dahingehend untersucht (MENG 2005, WANG 2005a).

1.8 Die Akute-Phase-Proteine

1.8.1 Die Akute-Phase-Reaktion

„Calor, Rubor, Dolor, und Tumor“ sind die, seit dem klassischen Altertum bekannten, Kardinalsymptome der lokalen Entzündungsreaktion. Rudolph Virchow erweiterte diese Symptomreihe im Jahre 1858 noch um das Symptom „Functio laesa“. Der Säugtierorganismus reagiert auf Beeinträchtigungen der körperlichen Unversehrtheit wie Malignome, Traumata und insbesondere auf Infektionen mit einer Abwehrreaktion, deren früheste Stufe die sogenannte Akute-Phase-Reaktion (APR) ist. Die APR ist somit Bestandteil des SIRS, welches im Kapitel 1.6 bereits erläutert wurde, und stellt eine Kaskade zellulärer Reaktionen dar, die ausgehend vom Ort der Beeinträchtigung auf den gesamten Organismus übergreifen kann (BAUMANN 1994). Ist letzteres der Fall, kann man bei Mensch und Säugetier u.a. Fieber, Leukozytose und Veränderungen des Fettstoffwechsels bis hin zur deutlichen Abnahme des Körpergewichts beobachten.

Wie bereits in Kapitel 1.2.2 erwähnt wurde, ist die APR Teil der unspezifischen humoralen Immunabwehr und ihre Mechanismen sind in der Evolution hoch konserviert (RAYNES 1994). Der Begriff der Akute-Phase-Reaktion wurde bereits 1941 von Abernathy und Avery geprägt (ABERNATHY 1941). Eine APR kann entweder systemisch oder lokal ausgelöst werden (RAMADORI 1999). Der lokal ausgelösten APR geht die Zelldestruktion, und damit das Freisetzen bestimmter Mediatoren, bspw. freier Radikale, voraus (KOJ 1996), welche wiederum die umgebenden Gewebsmakrophagen, ferner auch Endothelzellen, Fibroblasten und T-Zellen, zur Sekretion von Zytokinen (s. a. Kapitel 1.2.2) anregen (BAUMANN 1994). Neben Histamin und Serotonin, welche beide von Mastzellen freigesetzt werden und die Kapillarpermeabilität erhöhen, werden hierbei vor allem IL-1, IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ sezerniert. Diese drei Zytokine, welche auch schon im Zusammenhang mit der Pathophysiologie des Septischen Schocks besprochen wurden (Kapitel 1.6), induzieren, neben ihren vielfältigen anderen Aufgaben, die Synthese von Akute-Phase-Proteinen (APP) in den Hepatozyten (BAUMANN 1994). Im Schrifttum werden die Zytokine auf unterschiedliche Weise unterteilt: Es wird zunächst zwischen Zytokinen vom IL-1-Typ und IL-6-Typ unterschieden: Zu den Zytokinen vom IL-1 -Typ zählen $\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TNF}\beta$. Zu den Zytokinen vom IL-6-Typ zählen u.a. IL-6, IL-11, ciliary neurotrophic factor und Oncostatin M. (BAUMANN 1994, TREY 1995, KOJ 1996, RAMADORI 1999). Ferner kann man die Zytokine bezüglich ihrer Effektorfunktionen in drei Gruppen, nämlich proinflammatorische

Zytokine, antiinflammatorische Zytokine und Zytokine mit Eigenschaften von Wachstumsfaktoren, unterteilen (VAN MIERT 1995). Die Gruppe von APP, deren Synthese vorwiegend durch IL-1 reguliert wird, wird auch Klasse 1 APP genannt, während die vorwiegend durch IL-6 regulierten als Klasse 2 APP bezeichnet werden (KHOVIDHUNKIT 2004). Klasse 2 APP reagieren nicht auf Zytokine vom IL-1 Typ oder werden allenfalls durch diese gehemmt, während IL-6 hingegen die Synthese der Klasse 1 APP synergistisch mit IL-1 regulieren kann (CASTELL 1990, RAMADORI 1999).

Als APP werden Serumproteine bezeichnet, deren Konzentration nach einer akuten Infektion um 25% oder mehr ansteigt (positive, klassische APP) bzw. abfällt (negative APP) (KUSHNER 1982, KUSHNER 1993b). Zu den negativen APP zählen u.a. Transferrin und Albumin (DAMTEW 1993, GERVOIS 2004). Die Gruppe der positiven APP umfasst eine Vielzahl von Proteinen, u.a. einige Komplementfaktoren (C3, C4, C9), einige Faktoren des Gerinnungssystems (Fibrinogen, Plasminogen, Urokinase, Protein C), die Transportproteine Coeruloplasmin und Haptoglobin, andere Faktoren wie Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP), C-reaktives Protein (CRP), Serum-Amyloid A (SAA), Serum-Amyloid P (SAP), α 1-Glycoprotein, α 1-Antitrypsin (α 1-AT), Ferritin sowie eine Reihe weiterer Proteine (BAUMANN 1994, GABAY 1999). Von besonderem Interesse für die medizinische Labordiagnostik ist eine Untergruppe der positiven APP, die sogenannten Haupt-APP, auch Major-APP genannt. Sie weisen einen physiologisch niedrigen Blutspiegel auf und reagieren im Falle einer Entzündung sehr schnell und mit einem Anstieg um mehr als das 100fache (KENT 1992) bzw. 10- bis 1000fache (STUART 1988). Haupt-APP besitzen zudem eine kurze Halbwertszeit im Serum (STUART 1988). Aus diesen Gründen können die ersten Anzeichen einer beginnenden systemischen Entzündungsreaktion bzw. der Verlauf einer Infektion rasch über die laborchemische Bestimmung der Major-APP ermittelt werden. Die Haupt-APP variieren je nach Spezies: Als Haupt-APP des Menschen sind seit langem CRP und SAA etabliert (PEPYS 1983). Bei Hund, Schwein und Kaninchen konnte CRP ebenfalls als Haupt-APP identifiziert werden (KENT 1992). CRP findet sich also in verschiedenen Spezies und wurde in der Evolution hoch konserviert, hat jedoch nicht bei allen Spezies die Funktion eines Major-APP: Beispielsweise spielt CRP in der Akute-Phase-Antwort der Maus nur eine untergeordnete Rolle. Das murine Haupt-APP ist das SAP, welches wie CRP, ebenfalls zu den Pentraxinen (s. Kapitel 1.8.3) gehört (SIRIPONT 1988, ZAHEDI 1993, SZALAI 1999). SAP zählt beim Menschen wiederum zu den Minor-APP (LE 1982, SZALAI 1998). SAA ist sowohl bei Menschen als auch bei vielen anderen Vertebraten, u.a. der Maus, ein weiteres Major-APP (UHLAR 1999).

Die Haupt-APP CRP und SAA, aber auch Albumin zählen zu den, weiter oben erläuterten, Klasse 1 APP, da ihre Synthese vorwiegend von IL-1 reguliert wird. α 1-Antitrypsin, Fibrinogen, Haptoglobin und Coeruloplasmin werden hingegen den Klasse 2 APP zugeordnet, da ihre Synthese vorwiegend von IL-6 reguliert wird (RAMADORI 2001). Die Regulation der Genexpression der Akute-Phase-Proteine erfolgt hauptsächlich auf Transkriptionsebene, aber es wurden auch post-transkriptionelle Mechanismen beschrieben (JIANG 1995, ROGERS 1990). Neben den Zytokinen spielen auch Glucocorticoide eine wichtige Rolle in der APR, da sie hier eine doppelte Funktion haben: Zum einen ist die Stimulation der Hepatozyten durch IL-6 Glucocorticoid-abhängig (HEINRICH 1990), zum anderen drosseln Glucocorticoide die Zytokinproduktion von Monozyten und Makrophagen (BAYBUTT 1990) und tragen somit auch zur Beendigung der APR bei.

Es wird angenommen, dass die APR durch antagonistische Mechanismen begrenzt wird, die vor allem auf einem IL-1 und TNF α Antagonismus beruhen (DANDONA 1994). Beispielsweise können IL-1 α und IL-1 β durch den, von Monozyten und Makrophagen exprimierten, IL-1 Rezeptorantagonisten antagonisiert werden. Dieser bindet an IL-1 Rezeptoren vom Typ I und II, zeigt hieran jedoch keine intrinsische Aktivität, sondern verhindert das Andocken von IL-1 (RAMADORI 1999). IL-6 kann die Bildung dieses

IL-1 Rezeptorantagonisten, und somit die Feedback-Hemmung der APR, fördern (TILG 1997, RAMADORI 1999). Außerdem sind die beiden IL-1 Rezeptoren in der Lage, sich von der Zellmembran zu lösen und, als lösliche Rezeptoren, IL-1 zu antagonisieren. Ein vergleichbarer Mechanismus existiert auch für die TNF α Rezeptoren (RAMADORI 1999). Die Zytokine Interleukin-4 und Interleukin-10 wirken ebenfalls antinflammatorisch (KOJ 1996). Zudem wirkt sich die kurze Plasmahalbwertszeit vieler APPs limitierend auf die Akute-Phase-Antwort aus.

Zusammenfassend kann die Akute-Phase-Reaktion einer Infektion, oder ähnlichen Beeinträchtigungen der physischen Integrität des Organismus, entgegenwirken. Während der Akute-Phase-Antwort werden neue Sollwerte für die Homöostase des Organismus gesetzt, sodaß dieser die bedrohliche Beeinträchtigung besser bewältigen kann (KUSHNER 1993a, TREY 1995). Dabei kommt es u.a. zu Änderungen der Hämatopoese, die zu Anämie, Granulozytose und Thrombozytose führen. Zudem treten eine Reihe metabolische Veränderungen, insbesondere Änderungen des Fettstoffwechsels, ein (KUSHNER 1993a). Die APR kann jedoch auch nachteilige Auswirkungen auf den Organismus haben. Dies wird u.a. an der pathologisch prolongierten APR deutlich, wie sie bspw. bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis auftritt (BAUMANN 1994, RAYNES 1994). Hierbei, aber auch nach häufig wiederholten akuten Infektionen, können die während der Akute-Phase-Reaktion verstärkt produzierten Proteine SAA und SAP (s.Kapitel 1.7.2), zur Ablagerung abnormal gefalteter Amyloidfibrillen in verschiedenen Organen führen, woraus sich das Krankheitsbild der Sekundären Amyloidose entwickeln kann (WANG 2005b). Wie bereits im Kapitel 1.6 ausgeführt, kann eine ausufernde APR, u.a. durch Entgleisung der proinflammatorische Stimuli, im Septischen Schock münden, welcher mit einer hohen Letalität assoziiert ist (KOJ 1998). Andererseits existieren interessanterweise eine Reihe von Arbeiten, aus denen hervorgeht, daß mit APP vorbehandelte Nagetiere vor den letalen Auswirkungen eines letalen Septischen Schocks geschützt sind: 1994 wurde berichtet, dass Mäuse durch Verabreichung eines anderen Akute-Phase-Proteins, nämlich α 1-Glykoprotein, vor dem Tod durch per se letale Konzentrationen an TNF bzw. einer DGal/TNF-Kombinationsbehandlung, geschützt werden konnten (LIBERT 1991). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte 2 Jahre später, dass Mäuse, einen, per se letalen, TNF/DGal-Schock überleben können, wenn Ihnen 2 Stunden vor der Verabreichung dieser letalen Substanzkombination, α 1-AT parenteral verabreicht worden war (LIBERT 1996).

1.8.2 Serum Amyloid A (SAA)

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits erwähnt, ist SAA ein Haupt-APP der Vertebraten. Es gibt jedoch nicht nur ein SAA-Protein, sondern eine ganze Familie von SAA-Proteinen, welche aus einer Reihe verschiedener Apolipoproteine besteht. Neben den Akute-Phase-SAA-Proteinen (auch A-SAA genannt), wurde bei Mensch und Maus noch ein konstitutiv exprimiertes SAA-Protein gefunden (cSAA). Letzteres wird während der APR nicht bzw. nur sehr diskret induziert. In dieser Arbeit ist mit der Bezeichnung „SAA“ stets das A-SAA, also das Akute-Phase-SAA, gemeint. Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits angeführt, kann die häufige oder chronische Induktion von SAA zur Ablagerung von sekundären Amyloidplaques führen. SAA ist Vorläufer und Hauptbestandteil der sogenannten A-Komponente der Amyloidplaques (UHLAR 1999). SAA assoziiert sich während der Akute-Phase-Antwort hauptsächlich mit der dritten Fraktion der High-density-Lipoproteine (HDL3) (ERIKSEN 1980) und verdrängt somit Apolipoprotein 1, das prädominante Apolipoprotein von HDL3 (COETZEE 1986).

Es wurden einige SAA-Gene und SAA-Proteine bei verschiedenen Säugetierarten beschrieben, u.a. beim Menschen, bei der Maus, beim Kaninchen und beim Schaf. Die Aminosäuresequenz des SAA ist bei den

Säugetieren (UHLAR 1994), aber auch bei anderen Vertebraten wie bspw. den Fischen (JENSEN 1997), hochkonserviert. Beim Menschen wurden vier, bei der Maus fünf SAA-Gene gefunden (UHLAR 1999). Es finden sich viele Hinweise dafür, dass das murine SAA1 und das humane SAA1 evolutive Homologe sind. Ebenso verhält es sich mit der murinen und der humanen Form des SAA2. SAA1 und SAA2 weisen eine hohe Sequenzhomologie auf (LOWELL 1986, SELLAR 1994). SAA wird bei Vertebraten überwiegend hepatisch exprimiert. Es wurden jedoch auch extrahepatisch exprimierte SAA-Formen gefunden, wie z.B. in Fibroblasten, Synovialzellen oder Adipozyten exprimierte SAA-Formen (ZHANG 2005) oder das in Makrophagen exprimierte SAA3 der Maus (MEEK 1992). Beim Menschen ist das präsumptive Homolog des murinen SAA3 ein Pseudogen, weshalb keine entsprechende mRNA und damit auch kein entsprechendes Protein existiert. Die konstitutiv exprimierten SAA-Formen, welche bislang nur bei Mensch und Maus gefunden worden sind, werden, nach der neuen Nomenklatur der SAA Proteine von 1999 (SIPE 1999), jeweils mit SAA4 bezeichnet. Die alte Bezeichnung „murines SAA5“ ist in der neuen SAA-Nomenklatur nicht mehr gebräuchlich (WHITEHEAD 1992, DE BEER 1994). Vor 1999 wurde mit SAA4 bei der Maus ein weiteres Pseudogen bezeichnet, welches heute jedoch SAA-ps genannt wird (SIPE 1999).

Über die Struktur des, nur 12kD großen, SAA-Proteins ist bislang nur sehr wenig bekannt. Sekundärstruktur- und Spektralanalysen weisen auf das Vorhandensein von α -Helix-Konformationen hin. Primärstrukturanalysen ergaben Hinweise auf eine mögliche Strukturhomologie zur N-terminalen Domäne des Hämocyanins und lassen vermuten, dass das SAA-Protein zu etwa 80 Prozent aus einem helicalen Bündel besteht, in welches der C-Terminus nicht integriert ist (STEVENS 2004).

Da SAA zu den Major-APP gehört, kann die SAA-Serumkonzentration während der Akut-Phase-Reaktion auf bis über das 1000-fache ihres Ausgangswerts ansteigen. An dieser Hochregulation sind hauptsächlich transkriptionelle, ferner auch posttranskriptionelle Mechanismen beteiligt (UHLAR 1999). Zu den Transkriptionsfaktoren, die an den SAA-Promoter binden, zählen u.a. Mitglieder der C/EBP- und NF κ B-Familie. Diese regulieren vor allem die durch IL-1, IL SAA-Expression: Beispielsweise inhibieren Yin-Yang1 (YY1) und AP-2 die Expression von SAA. YY1 kontrolliert die Promoterloci vieler APP und wird während der APR durch aktivierende nukleäre Faktoren ersetzt (LIAO 1995). SP-1 und der sogenannte „SAA-activating-sequence (SAS) -binding factor“ (SAF), d.h. Bindungsfaktor der SAA-aktivierende-Sequenz (SAS), sind vorwiegend in die Regulation der extrahepatischen SAA-Expression involviert. SP-1 interagiert hierbei mit SAF, indem es mit diesem einen Heteromer formt, welches eine höhere Affinität zum SAS-Element aufweist, als SAF oder Sp1 alleine (RAY 1997). Die in der APR induzierte Menge an SAA-mRNA kann in der APR bis zu 10% der gesamten hepatisch produzierten Menge an mRNA ausmachen (JENSEN 1997). Im Vergleich zu anderen APP weist das murine SAA mit etwa 60-80 Minuten eine kurze Halbwertszeit im Serum auf (HOFFMAN 1983, TAPE 1990).

Es ist seit längerem etabliert, dass die jeweilige parenterale Verabreichung der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α und die SAA-Serumkonzentration (sowohl die Konzentration von SAA1 als auch von SAA2) im Mausmodell drastisch erhöhen können (BRUUN 1998, UHLAR 1999, ZHANG 2005). Neben diesen Hauptinduktoren sind bspw. auch IL-2, Interferone und der sogenannte „ciliary neurotrophic factor“ entweder direkt oder indirekt an der Induktion der SAA-Synthese beteiligt. LPS ist ebenfalls ein bekannter Induktor der Akute-Phase-Antwort und somit auch der SAA-Synthese. (NUMEROF 1992, FANTUZZI 1995, BRUUN 1998).

Die biologische Bedeutung bzw. die Funktionen des SAA-Proteins sind bislang nur unvollständig aufgeklärt (GUTFELD 2006). Es wurde eine Reihe von SAA-Funktionen beschrieben, die bei der Infektabwehr

eine grosse Rolle spielen: In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass SAA chemotaktisch Monozyten, polymorphkernige Leukozyten, Mastzellen und T-Lymphozyten anlocken kann (BADOLATO 1994, XU 1995, PRECIADO-PATT 1996, OLSSON 1999). Zudem fördert SAA die Induktion von Enzymen, die die extrazelluläre Matrix (EZM) abbauen. Hierzu zählen bspw. die Kollagenase, das Stromelysin, und die Matrix-Metalloproteinasen 2 und 3, welche an den Reparaturprozessen nach Gewebsschäden beteiligt sind (MITCHELL 1991, STRISSEL 1997, MIGITA 1998). Somit ist denkbar, dass die prolongierte Expression von SAA, und damit die ebenfalls prolongierte Produktion dieser EZM-abbauenden Enzyme, an der Pathogenese von degenerativen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis beteiligt sein könnte. Wie bereits erwähnt, verdrängt SAA Apo 1 von HDL. Hierdurch wird u.a. die Affinität des HDL -Moleküls zu Makrophagen erhöht wird. (KISILEVSKY 1992). Expression von SAA in Bakterien führt zur Bakteriolyse. SAA kann in Zellmembranen Kanäle formen, womit diese bakterizide Eigenschaft von SAA zumindest partiell erklärt werden könnte (HIRAKURA 2002).

SAA ist also ein Multifunktionsprotein, dessen Hauptrolle die Modulation von Entzündungsprozessen ist (URIELI-SHOVAL 2000).

Abgesehen davon wird SAA in Dys- und Neoplasien des Colons überexprimiert (GUTFELD 2006) und als Tumormarker für das Pankreaskarzinom diskutiert (YOKOI 2005). SAA und CRP stellen derzeit die sensitivsten Parameter zur Erfassung und Überwachung einer Entzündungsaktivität im klinischen Alltag dar (YAMADA 1999).

1.8.3 Serum Amyloid P (SAP)

SAP ist ebenfalls, wie auch SAA, ein Haupt APP vieler Vertebraten. Es gehört, wie auch CRP, zu den sogenannten Pentraxinen. Als Pentraxine wird eine Familie hochkonservierter Proteine bezeichnet, die durch eine homopentamere Ringstruktur sowie durch die Calcium-abhängige Ligandenbindung charakterisiert ist. SAP bindet Calcium-abhängig DNS bzw. Chromatin (PEPYS 1997). Kürzlich wurden weitere Mitglieder dieser Familie, die langen Pentraxine (PTX3), entdeckt (ROVERE 2000). SAP ist ein hochkonserviertes Plasmaprotein (ZANDMAN-GODDARD 2005) und ist eine physiologische Komponente von Basalmembranen, inklusive der glomerulären Basalmembran (ZAHEDI 1997). SAP wird in der Leber synthetisiert und katabolisiert (HUTCHINSON 1994). SAP liegt, nicht induziert, im menschlichen Blut, in einer Konzentration von $40\mu\text{g}/\mu\text{l}$ im Durchschnitt vor (PEPYS 1978). Das Gen, welches SAP kodiert, liegt auf Chromosom 1q23 (WALSH 1996). SAP ist der Vorläufer der P-Komponente des Amyloids. Es bindet über eine "pattern recognition binding site", also eine Bindungsstelle, die eine spezifische Struktur erkennen kann, an eine breite Gruppe unterschiedlicher Moleküle. Ähnlich wie beim SAA, ist die Bedeutung des SAP bislang nur unvollständig aufgeklärt. Da SAP, wie andere Pentraxine auch, an apoptierte Zellen binden kann, dient es diesen wahrscheinlich als opsonisierendes Protein (s. Kapitel 1.2.1), um auf diesem Wege den Abbau des Zelldetritus zu erleichtern (GERSHOV 2000, MOLD 2001). Es wird vermutet, dass Chromatin and Phosphatidylethanolamin, die während der Apoptose auf die Oberfläche der apoptierenden Zellen gelangen, hierbei die Hauptbindungsstellen der Pentraxine darstellen. SAP kann das lange Chromatin solubilisieren, welches ansonsten in der EZM kaum löslich ist (BUTLER 1990, FAMILIAN 2001). Pentraxine können außerdem Komplement über den klassischen Aktivierungsweg aktivieren (PEPYS 1997). Der Komplementfaktor C5a wird während der APR als Folge der C3-Aktivierung generiert und fördert im Mausmodell, zusammen mit IL-1 β und IL-6, die Hochregulation des SAP-Gens (SZALAI 2000). SAP kann im Mausmodell durch parenterale

Verabreichung von IL-1, IL-6, TNF und LPS induziert werden (MORTENSEN 1983, MORTENSEN 1988, ITOH 1992).

Bei SAP^{-/-}-Mäusen, also Mäusen, denen beide Allele des SAP-Gens fehlen, ist der Abbau des extrazellulären Chromatins erwartungsgemäß verzögert. Diese Mäuse bilden Antinukleäre Antikörper und entwickeln eine Autoimmun-Glomerulonephritis - ein Krankheitsbild, das dem Systemischen Lupus erythematoses ähnelt (BICKERSTAFF 1999). 1997 zeigten Botto et al. zunächst, dass bei diesen SAP^{-/-}-Mäusen die Induktion der reaktiven Amyloidose verzögert ist (BOTTO 1997). Sie demonstrierten an diesem Mausmodell, dass SAP, wie SAA auch, wesentlich an der Pathogenese der Amyloidose beteiligt ist und somit die Inhibierung der Bindung von SAP an die Amyloidfibrillen ein attraktives therapeutisches Ziel darstellt (PEPYS 2002). SAP neutralisiert LPS und ist damit potentiell nützlich bei der Bekämpfung der gramnegativen Sepsis (DE HAAS 1999).

2 Fragestellung und Zielsetzung

Wie in den Kapiteln 1.6 und 1.8.1 ausgeführt, kann eine ausufernde Akute-Phase-Reaktion zum einen, u.a. durch Entgleisung der proinflammatorischen Stimuli, im Septischen Schock münden (KOJ 1998), zum anderen existieren, wie dort zitiert, eine Reihe von Arbeiten, die beschreiben, daß Akute-Phase-Proteine Nagetiere vor den letalen Auswirkungen eines Endotoxinschocks bewahren können. In den Abschnitten 1.8.2 und 1.8.3 wurde beschrieben, daß SAA und SAP die Haupt-APP der Maus darstellen. SAA ist zugleich ein Haupt-APP des Menschen. Im Rahmen dieser Dissertation soll die Regulation dieser beiden Haupt-APP beim Krankheitsbild des Septischen Schocks anhand eines Mausmodells untersucht werden. Letzteres muß zu Beginn dieser Arbeit zunächst anhand der Modifizierung des von Galanos 1979 etablierten DGal-Mausmodells des Septischen Schocks (GALANOS 1979) etabliert werden. Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben und zitiert, ist seit längerem bekannt, daß die jeweilige parenterale Verabreichung der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α sowohl die Serumkonzentration von SAA, als auch die von SAP, im Mausmodell drastisch erhöhen kann. Zur Etablierung des hier verwendeten Mausmodells sollen diese Ergebnisse zunächst verifiziert werden. Zusätzlich sollen hierbei erstmals die Kinetiken der SAA- und SAP-Konzentrationen im murinen Serum sowie in der murinen Leber post inductionem systematisch untersucht werden.

Es gibt bereits Arbeiten, die zeigen, daß die Injektion von LPS im Mausmodell zum Anstieg der Serumkonzentrationen von SAP und SAA führt (MORTENSEN 1983, BRUUN 1998). Da, wie unter 1.4 ausgeführt, neben dem Endotoxin LPS auch Enterotoxine eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Septischen Schocks spielen können, soll in dieser Arbeit geprüft werden, welchen Einfluß Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) auf die Expression von SAA und SAP im Mausmodell hat.

Es ist, wie in Kapitel 1.4 zitiert, bekannt, daß TNFRp55 $^{-/-}$ -Mäuse, im Gegensatz zu ihrem entsprechenden Wildtyp den C57B/6-Mäusen, resistent gegenüber den tödlichen Folgen eines Endotoxinschocks sind. Hier soll nun, im Hinblick auf die eben erwähnten Arbeiten, die eine protektive Rolle der APP im Septischen Schocks bei Nagetieren beschreiben, geprüft werden, ob diese Fähigkeit der TNFRp55 $^{-/-}$ -Mäuse, einen Endotoxinschock zu überleben, mit einer veränderten, ggf. gar verstärkten, Expression der Major-APP SAA und SAP korreliert. Bisher finden sich in der Literatur nur vereinzelte Befunde über die Akute-Phase-Antwort der TNFRp55 $^{-/-}$ -Mäuse.

Neben dem TNFRp55 sollen noch zwei weitere Mitglieder der TNFR/TNF-Superfamilie, nämlich FAS und LTR β (s. Kapitel 1.4), hinsichtlich ihrem, bislang noch unbekanntem, Einfluß auf die Synthese der Akute-Phase-Proteine, insbesondere auf die SAA- bzw. SAP-Synthese, untersucht werden. Ein weiterer Grund, weshalb die Untersuchung von FAS in diesem Zusammenhang interessant ist, ist, daß die Regulation der SAA- bzw. SAP-Regulation hierbei in einem anderen, nämlich DGal *unabhängigen*, Schockmodell untersucht werden kann.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Wie in Abschnitt 1.6 bereits erwähnt, fanden Sparwasser et al. 1997 heraus, daß bakterielle DNS einen Septischen Schock in D-Galaktosamin präsensibilisierten Mäusen auslösen kann. Die, in die Mäuse injizierten, synthetischen CpG-ODN aktivieren die Makrophagen, die wiederum $TNF\alpha$ liberieren, welches schließlich zum Septischen Schock führt (SPARWASSER 1997b). Die zentrale Fragestellung dieser Dissertation ist, ob parenteral verabreichte bakterielle DNS bzw. CpG-ODN in der Lage ist, im Mausmodell die Expression von Akute-Phase-Proteinen auszulösen. Hierzu wird Mäusen unterschiedlicher Stämme bakterielle DNS bzw. CpG-ODN intraperitoneal (i.p.) injiziert werden, anschließend sollen im Serum bzw. im Leberhomogenisat die SAA bzw. SAP-Konzentrationen bestimmt werden.

3 Material & Methoden

3.1 Bezugsnachweis

3.1.1 Chemikalien

Tab. 3.1: Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Acrylamid, Bisacrylamid (30%/0,8%)	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, USA
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
N-Acetyl-D-Galaktosamin (DGal)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
2-Methylbutan	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (pH-Einstellung)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (pH-Einstellung)	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
1,2-Bis(dimethylamino)ethane (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane- Hydrochloride (Tris.HCL)	Riedel de Haen, Seelze

3 Material & Methoden

3.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Tab. 3.2: Reagenzien & Verbrauchsmaterial

Reagenz/Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
ECL solution (Entwicklerlsg. für Blot)	Amersham, Buckinghamshire UK
Einbettmedium O.C.T.	Sigma, Deisenhofen
Einmalkanülen (12mm Länge, 3mm Durchmesser)	B.Braun, Melsungen
SAA-ELISA -Kit (Maus)	Biosource International, California, USA
Entwicklerlösung (Röntgenfilme)	Kodak, Stuttgart
Feindosierungsspritzen (1ml Gesamtvolumen)	B.Braun, Melsungen
Filterpapier Whatman 3MM	Schultheiss, München
Fixierlösung (Röntgenfilme)	Kodak, Stuttgart
Glycerin-Gelantine	Merck, Darmstadt
Hämalaun-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Milchpulver, fettfrei	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Nitrocellulosemembran (0,45µm)	Schleicher und Schüll, Dassel
Parafilm M	American National CanTM, Chicago, USA
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden Falcon, New Jersey, USA Corning, New York, USA
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Rainbow-Marker (full range: 10-250kD)	Amersham , Buckinghamshire UK
Röntgenfilme X-OMAT LS	Kodak, Stuttgart
Triton X-100 (Detergenz)	Bio-Rad, München

3.1.3 Geräte

Tab. 3.3: Geräte

Gerät	Hersteller
Abstandshalter (sog. Spacer, für die Gel-Elektrophorese)	Bio-Rad, München
Analysewaage	Sartorius, Leichlingen
Apparatur zum Gießen von Polyacrylamidgelen inklusive Glasplatten	Bio-Rad, München
Deckgläser	Leica Instruments, Nussloch
ELISA Lesegerät (reader)	Emax precision microplate reader, Molecular Devices, Ismaning
ELISA Waschgerät	Modell: SkanWasher 400, Skatron Instruments, UK
Kämme mit 10 Taschen (für Gel-Elektrophorese)	Bio-Rad, München
Kühlzentrifuge	Omnifuge 2,0 RS, Heraeus, Hanau
Kryostat™ (gekühltes Mikrotom)	Leica Instruments, Nussloch

Tab. 3.3: Fortsetzung Geräte

Gerät	Hersteller
Mikroskope	Modell: ID 03, Zeiss, Oberkochen Modell: LSM 510, Zeiss, Oberkochen
Mikroskopierschere, gebogen (für Organentnahme)	Bochem Instrumente GmbH, Weilburg
Objektträger Super-Frost™ Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pinzette, gerieft (160mm Länge)	B.Braun, Melsungen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Präparierschere	B.Braun, Melsungen
Semidry-blotting cell (horizontales, halbtrockenes Kammersystem für den spannungsabhängigen Proteintransfer)	Bio-Rad, München
Skalpell (für Organentnahme)	Bochem Instrumente GmbH, Weilburg
Spannungsquellen	Power Pack P25, Biometra, Göttingen PS 500 XT, HSI, San Francisco PS 9009 TC, Gibco BRL, Eggenstein
Tischzentrifugen	Zentrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg Biofuge 15, Haereus, Hanau Biofuge 15 R, Haereus, Hanau
Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Vertikales Gelsystem für die Polyacrylamid- Gelelektrophorese	Modell: Mini Protean II, Bio-Rad, München

3.2 Pufferlösungen

Tab. 3.4: Pufferlösungen

Pufferlösung	Zusammensetzung	
Elektrophoresepuffer (Lämmli-puffer)	248mM	Tris-HCl pH 7,5
	1,9M	Glycin
	1%(w/v)	SDS
Homogenisierungspuffer (Ultraschallbad)	98% (w/v)	steriles Wasser
	2%	Triton X-100
Ladepuffer, reduzierend (3x)	2,5%	Tris-HCl; pH 6,8
	6% (w/v)	SDS
	10%	Glycerin
	0,1% (w/v)	Bromphenolblau
	5%	β -Mercaptoethanol
Milchpulver-Blockierungslösung	5% (w/v)	Milchpulver, fettfrei
	95%	PBS 1x
NET-Puffer (10x) (Waschpuffer)	1,5M	NaCl
	0,05M	EDTA

3 Material & Methoden

Tab. 3.4: Fortsetzung Pufferlösungen

Pufferlösung	Zusammensetzung	
PBS (1x)	0,5M	Tris-HCl
	0,5%	Triton X-100
	13,7mM	NaCl
	2,7mM	KCl
	80,9mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5mM	KH ₂ PO ₄
Sammelgelpuffer		pH 7,4
Transferpuffer (Westernblot)	0,47M	Tris-HCl pH6,7
	25mM	Tris-HCl
	192mM	Glycin
Trenngelpuffer	20%	Methanol
	3M	Tris-HCl pH8,9

3.3 Zytokine und Toxine

Tab. 3.5: Zytokine & Toxine

Zytokin	Bezugsquelle
Rekombinantes TNF α	Genzyme, Cambridge USA
Rekombinantes IL-1 β	PeproTech EC, USA
Rekombinantes IL-6	PeproTech EC, USA
LPS	Sigma, Deisenhofen
SEB	Toxin Technologies, Sarasota USA

3.4 Antikörper

Die drei hier aufgelisteten Antikörper wurden ausschliesslich für Western-Blots eingesetzt.

Tab. 3.6: Antikörper

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle	Verwendungszweck
Anti-Maus SAP	Kaninchen / Ig Fraktion	Biotrend, Köln	Westernblot
Anti-Maus α 1-AT	Kaninchen / Ig Fraktion	Sigma-Aldrich, USA	Westernblot
Peroxidase-Anti-Kaninchen	Ziege / Ig Fraktion	Bio-Rad, München	Westernblot
Anti-Maus FAS-Ligand /Klon Jo2	Monoklonaler AK	Pharmingen, Hamburg	i.p. Injektion in Mäuse
Anti-Maus-FAS-AK /Klon RMF2	Monoklonaler AK	Beckman-Coulter, Krefeld	i.p. Injektion in Mäuse

3.5 Oligodesoxynukleotide (ODN)

Die Oligodesoxynukleotide (ODN) wurden von MWG Biotech AG, Ebersberg bezogen und zur intraperitonealen Injektion in Mäuse verwendet.

Tab. 3.7: Oligodesoxynukleotide - ODN

Name ODN	Sequenz (5' → 3')
1668	5' - TCCATGAC GC GTTCCTGATGCT - 3'
1720	5' - TCCATGAG CG CTCCTGATGCT - 3'

3.6 Versuchstiere

Es wurden verschiedene Mäusestämme verwendet, die im Folgenden, inklusive ihrer Bezugsquellen und ihres Alters bei Durchführung der jeweiligen Experimente, tabellarisch aufgelistet sind. Alle Tiere wurden im spezifisch pathogenfreien (SPF) Tierstall des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität München gehalten. Die dankeswerterweise von Prof. Dr. K. Pfeffer überlassenen Tiere wurden zudem dort auch gezüchtet.

Tab. 3.8: Versuchstiere

Stamm	Alter	Bezugsquelle
Balb/c	6-8 Wochen	Charles River, Hannover
C57B/6	6-8 Wochen	Charles River, Hannover
C3H/Hej	6-8 Wochen	Charles River, Hannover
CD1	6-8 Wochen	Charles River, Hannover
TNFRp55 ^{-/-}	7-8 Wochen	Prof.Dr. K.Pfeffer/TU München
LTR β ^{-/-}	7-8 Wochen	Prof.Dr. K.Pfeffer/TU München

3.7 Tierversuche

3.7.1 Injektionsmodell

Alle Injektionen wurden als intraperitoneale Injektionen (i.p.) durchgeführt. Die zu injizierenden Substanzen wurden hierbei zuvor stets in autoklavierten PBS verdünnt und stets in einem Volumen von 300 μ l mit einer Feindosierungsspritze verabreicht:

Eine Maus wurde hierzu rasch in die linke Hand der Experimentatorin genommen. Hierbei wurde das Rückenfell mit einem Griff nach hinten gezogen, um so das Tier sowohl kurzfristig zu immobilisieren als auch um dessen Bauchseite vorübergehend zu straffen. Mit der rechten Hand wurde die sterile Spritzenkanüle umgehend bis zum murinen Peritoneum vorgeschoben und die Injektion vorgenommen. Anschließend wurden die Mäuse sofort wieder in den Käfig gesetzt.

3.7.2 Organ- und Blutentnahme

Nach unterschiedlichen Zeitpunkten post injectionem, welche in den jeweiligen Abbildungen aufgeführt werden, wurden die Mäuse mittels Genickbruch (cervikale Dislokation) getötet.

Hernach wurde das tote Tier für die anstehende Organpräparation mit Stecknadeln an seinen vier Extremitäten auf einem Styroporbrett fixiert. Dann wurde zunächst das murine Herz mittels Pinzette und Präparierschere frei präpariert. Nun konnte das Blut mittels intrakardialer Punktion (Feindosierungsspritze) entnommen werden, welches sofort in ein Eppendorfreaktionsgefäß (ERG) überführt und vorerst auf Eis gekühlt wurde. Im Durchschnitt konnte man auf diese Weise zwischen 650 μ l und 750 μ l murines Blut gewinnen.

Unmittelbar im Anschluss wurde die murine Leber frei präpariert, von der Gallenblase getrennt, in toto entnommen und ebenfalls in ein, auf Eis stehendes, ERG verbracht oder, wie unter 3.7.4 beschrieben, rasch für die histologische Untersuchung weiterverarbeitet.

3.7.3 Aufbereitung der entnommenen Organ- und Blutproben für die Analyse im Westerblot bzw. ELISA

Aufbereitung des Serums

Unmittelbar nach Entnahme der Leber, wurde das Serum, welches sich in der Zwischenzeit in der gekühlten Blutprobe abgesetzt hatte, in einer Tisch-Kühlzentrifuge abgetrennt (Zwei Minuten bei 4°C und 15.000 Umdrehungen) und anschließend in ein steriles ERG überführt. Das murine Serum wurde zunächst bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Der übrig gebliebene Blutkuchen wurde verworfen.

Aufbereitung der Leber

Die murine Leber wurde unmittelbar nach ihrer Entnahme weiterverarbeitet: Auf einer Analysewaage wurde eine Portion von 80mg Leber abgewogen. Die restliche Leberportion wurde verworfen.

Die Portion von 80mg wurde zunächst mit der Präparierschere zerkleinert und danach mit 100 μ l Homogenisierungspuffer vermischt. Das im Homogenisierungspuffer enthaltene Detergenz Triton X-100 hilft dabei, die Proteine in der Leberprobe aufzuschließen. Anschließend wurde diese Mischung im Ultraschallbad 60 Sekunden lang homogenisiert. Das so entstandene Homogenisat wurde abschließend bei 70.000g 15 Minuten lang zentrifugiert und die hernach abgenommenen Überstände zunächst bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die abzentrifugierten Organrückstände wurden verworfen.

3.7.4 Aufbereitung der Leberproben für die histologische Untersuchung

Die in toto entnommenen Leberpräparate wurden in spezielle Einbettplastikschälchen gelegt und mit O.C.T.- Einbettmedium luftblasenfrei überschichtet. Anschließend wurden die so eingebetteten Leberpräparate unverzüglich in 2-Methylbutan, das in flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurde, schockgefroren. Die Präparate konnten dann entweder gleich weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert werden. Mit Hilfe eines Kryostats wurde der so hergestellte Gefrierblock in 8 μ m dünne Scheibchen geschnitten, diese Leberschnitte

wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden diese histologischen Präparate umgehend fixiert und gefärbt (s. Kapitel 3.8.2).

3.8 Histologische Untersuchung mittels konventioneller Färbung mit Hämatoxylin/Eosin

Zur Darstellung der Lebermorphologie nach parenteraler Applikation von Anti-FAS-AK wurden Schnitte von Leberpräparaten so behandelter Mäuse mit Hämalaun/Eosin gefärbt. Durch den basischen Farbstoff Hämatoxylin werden die Zellkerne blau, durch den sauren Farbstoff Eosin das Zytoplasma in einem roten Farbton angefärbt (z.B. Hämalaun, Eisenhämatoxylin nach Weigert oder nach Heidenhain).

Hämatoxylin ist ein (bei niedrigem pH) positiv geladener Farbstoff. Er färbt daher negativ geladene, also basophile Strukturen blau. Zu den basophilen Strukturen gehören z.B. die DNS des Kernchromatins, also die Zellkerne, und die RNS des rauhen endoplasmatischen Retikulums. Hämatoxylin in der Zubereitung als Eisenlack ist Eisenhämatoxylin (nach Weigert oder nach Heidenhain), in der Zubereitung als Aluminiumlack ist es Hämalaun. Eosin ist ein negativ geladener Farbstoff, der zur Gegenfärbung dient. Er färbt die azidophilen Strukturen, also vor allem das Zytoplasma, in verschiedenen Rot-Tönen an.

3.8.1 Färbelösungen

Die Hämalaun-Lösung wurde kommerziell erworben (Sigma, Deisenhofen).

Die Eosinlösung wurde folgendermassen angesetzt: 10g Eosinlösung wurden in 1000ml Aqua bidest gelöst und anschließend filtriert. Zum Färben wurde diese Lösung 10fach verdünnt angesetzt und unmittelbar vor der Verwendung wurden 2-3 Tropfen Eisessig hinzugegeben.

3.8.2 Fixierung und Färbung der Schnitte

Die Fixierung der kurz zuvor auf die Objektträger aufbrachten Leberschnitte erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe: Die auf die Objektträger aufbrachten Präparate werden zunächst in 70%igem Ethanol, dann in 96%igem Ethanol und anschließend in Ethanol absolut jeweils 4x eingetaucht. Abschließend werden die so behandelten Präparate dann für 5 Minuten in Ethanol absolut bei Raumtemperatur inkubiert.

Die so fixierten Schnitte wurden folgendermaßen gefärbt:

- 30 Minuten Färbung in der Hämalaunlösung (Inkubation bei RT)
- Waschen.: 3x 5 Minuten in 1x PBS bei RT inkubieren
- 10 Min. Färbung in der Eosinlösung (Inkubation bei RT)
- Waschen; Eine Minute in 1x PBS bei RT inkubieren
- Schnitte lufttrocknen lassen
- Die getrockneten Schnitte wurden mit Glycerin-Gelatine luftblasenfrei überschichtet und darauf vorsichtig ein Deckblatt platziert.

- Die Aushärtung erfolgte bei RT

Nun folgte die Analyse im Lichtmikroskop.

3.9 Proteinbiochemische Methoden

3.9.1 Gelelektrophoretische Auftrennung des Leberhomogenisats und des Serums (SDS-PAGE)

Präparation der Proben

Die Seren und die Leberhomogenisate und wurden, wie unter Kapitel 3.7 beschrieben, präpariert. Die Seren wurden 1:20 in Aqua bidest verdünnt, davon jeweils 10 μ l (Einzelprobe) genommen und mit 5 μ l 3x Probenpuffer vermischt. Jeweils 10 μ l der (Einzelprobe) unverdünnten Leberhomogenisate wurden ebenfalls mit 5 μ l 3x Probenpuffer vermischt. Die so vorbereiteten Proben wurden anschließend, ebenso wie der Rainbow-Marker, bei 95°C im Schüttler erwärmt, um anschließend eine schärfere Auftrennung der Banden zu erzielen.

Herstellung der Gele und Elektrophorese

Mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren oder Proteine aufgetrennt werden. Dabei wandern die zu untersuchenden Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix, gebildet von einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid. Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale in einer Kettenreaktion lange Polymere, Bisacrylamid dient dazu, diese Polymere zu vernetzen. Als Katalysator wird TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin), als Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat (APS) eingesetzt. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein Detergenz, das sich an Proteine anlagert und diese denaturiert. Die resultierenden Komplexe erhalten durch die Sulfatgruppen eine gleichmäßig verteilte negative Ladung. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist nun nur noch von der relativen Molekülmasse abhängig.

Tab. 3.9: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele

Sammelgel(5ml) 3%	Reagenzien	Trenngel (20ml) 14%	Reagenzien
Acrylamidlg. (30% / 0,8%)	0,5ml	Acrylamidlg. (30%/ 0,8%)	9,3ml
0,5M Tris/HCl pH 6,8	1,2ml	1,5M Tris/HCl pH 8,8	5 ml
10% SDS	50 μ l	10% SDS	230 μ l
H ₂ O	3,2ml	H ₂ O	5,4ml
10% APS	50 μ l	10% APS	60 μ l
TEMED	2,5 μ l	TEMED	11,4 μ l

Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wird über das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Die Matrix im Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel. In der, im Sammelgel herrschenden, hohen Feldstärke wandern die Proteine schnell, und ohne erfolgende Auftrennung, als scharfe Bande. Mit Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel wird ihre Geschwindigkeit drastisch, und

nun abhängig von der Größe, verringert.

Zunächst wurden der Trenngelpuffer angesetzt. APS und TEMED wurden stets am Schluss hinzugefügt. Diese Lösung wurde in die zuvor aufgebaute Gelapparatur, also zwischen zwei fixierte, abgedichtete und durch zwei Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten, gegossen. Das noch flüssige Trenngel wurde in der Apparatur mit Isopropanol überschichtet. Während das Trenngel aushärtet, wurde der Sammelgelpuffer angesetzt- auch hier wurden APS und TEMED zuletzt hinzupipettiert. Sobald das Trenngel ausgehärtet war, wurde das Isopropanol abgegossen und dessen Reste mit Whatman-Filterpapier vorsichtig aufgenommen. Nun wurde das, noch flüssige, Sammelgel auf das Trenngel gegossen und rasch ein Plastikkamm eingesteckt, damit sich im aushärtenden Gel Taschen bilden konnten.

Die ausgehärteten Gele wurden nun samt Glasplatten in die Elektrophoresekammer überführt und diese anschließend mit 1x Laufpuffer befüllt. Danach wurden die Kämmen vorsichtig aus dem Gel gezogen. In die so entstandenen Taschen wurde nun die Proben einpipettiert, die zuvor, wie unter 3.9.1 beschrieben, vorbereitet worden waren. Die Elektrophorese wurde bei 80mV so lange durchgeführt, bis die sichtbare untere Lämmli-pufferfront die Unterkante des Gels erreicht hatte.

3.9.2 Westernblot (Semidry-Blotting)

Um die über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennten Proteine mit einem Antikörper nachzuweisen, müssen die Proteine zunächst aus dem Gel auf eine geeignete Matrix überführt werden. Als Träger eignen sich vor allem Nylon- und Nitrozellulosemembranen. Hier wurde eine Nitrozellulosemembran verwendet. Der Transfer erfolgt auf elektrophoretischem Weg in die proteinbindende Membran. Dabei wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran laufen und dort gebunden werden. Beim Semi-dry Blot werden Gel und Membran, sandwichartig eingerahmt von Filterpapieren, die bei der Elektrophorese als Ionen-Reservoir dienen, zwischen die Elektroden gelegt. Methanol im Puffer dient dazu, das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen.

Die Nitrozellulosemembran und 6 Whatman-Filterpapiere wurden genau auf die Größe des Gels zugeschnitten. Sowohl die Membran als auch die Filterpapiere wurden dann in Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde vorsichtig aus der Elektrophoresekammer genommen und luftblasenfrei auf die Membran gelegt, die wiederum auf 3 Filterpapieren gestapelt wurde. Auf das Gel werden nun abschließend 3 weitere Filterpapiere geschichtet. Der gesamte Stapel wurde in die Semidry-Blotting-Apparatur überführt, erneut mit etwa 5ml Transferpuffer überdeckt und die Apparatur anschließend verschlossen. Es wurde bei 250mA für 2 Stunden geblottet.

3.9.3 Detektion von SAP und α 1-AT

Nach Abschluss des Blotvorgangs wurde die Membran aus der Apparatur genommen und zunächst für eine Stunde in Milchpulver-Blockierungslsg. bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper, also Anti-SAP-AK bzw. Anti- α 1-AT-AK inkubiert. Die AK wurden zum Teil auch parallel inkubiert und waren jeweils 1:5000 in Milchpulver-Blockierungslsg. verdünnt. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x für je 10 Minuten auf dem Kippschüttler mit 1x NET-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der zweite AK, nämlich der Peroxidase-gekoppelte Anti-Ziegen-AK, 1:10.000 in Milchpulver-Blockierungslsg. verdünnt und die

Membran darin für eine Stunde inkubiert. Abschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 1x NET-Waschpuffer, 3 mal für jeweils 10 Minuten. Nun wurde die ECL-Lösung (Amersham, Buckinghamshire, UK) gemäß der Instruktionen des Herstellers vorbereitet. Danach wurde die Membran in einen Transparentbeutel eingeschweißt, überschüssiger Waschpuffer mit einer 10ml Glaspipette herausgerollt, und die ECL-Lösung dazugegeben. Nach etwa einer Minute wurde die ECL-Lösung herausgerollt, der Beutel vollständig verschweißt und in eine Röntgenkassette gelegt. In der Dunkelkammer legten wir den Röntgenfilm für 1 Minute auf. Die ECL-Lösung interagiert mit der Peroxidase, die an den Sekundärantikörper gekoppelt ist (Chemilumineszenz). Das Ausmaß der Lichtreaktion ist direkt proportional zur Menge des an die Membran gebundenen Primärantikörpers. Diese Lichtreaktion führt zur Schwärzung des Röntgenfilms.

3.9.4 Detektion und Konzentrationsbestimmung von SAA mittels ELISA

Zur Bestimmung des SAA-Gehaltes wurde der kommerziell erwerbliche Cytoscreen-Maus-SAA-Kit der Firma Biosource, International, California, USA verwendet. Dieser Kit ist ein Phasen-Sandwich-Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA). Die Vertiefungen (engl. wells) der Mikrotiterplatte (Firma BioSource) sind mit einem monoklonalen Anti-Maus-SAA-Antikörper (spezifischer IgG2b Antikörper gegen SAA) beschichtet. Nach Waschen und Entfernen des Waschpuffers (phosphatgepufferte Salzlösung; verdünnt 1:20) wurde in alle Vertiefungen 50µl Anti-SAA-Konjugat (alkalische Phosphatase konjugiert mit dem monoklonalen Anti-SAA-Antikörper in phosphatgepuffertem Salzlösung mit bovinen Serumalbumin) einpipettiert. Im Anschluß daran wurden in die erste senkrechte Vertiefungsreihe der Mikrotiterplatte 50µl des Standards (bekannte SAA-Konzentration; lyophilisierter Maus-SAA-Standard) und in die restlichen Vertiefungen je 50µl der jeweiligen Serumproben (verdünnt 1:100 in Aqua bidest) einpipettiert, wobei je Probe eine Vertiefung verwendet wurde. Die so bestückte Mikrotiterplatte wurde in eine feuchte Kammer gelegt. Diese Kammer wurde in einen Brutschrank gegeben, in dem eine einstündige Inkubation bei 37°C erfolgte. Das SAA wurde von dem in den Vertiefungen immobilisierten Antikörper gebunden und durch den konjugierten zweiten Antikörper markiert. Nach erneutem Waschen und Entfernen des Waschpuffers wurde in jede Vertiefung je 100µl Substratlösung (p-Nitrophenyl-Phosphat) hinzugegeben. Das Enzym (alkalische Phosphatase) setzte das Substrat zu 4-Aminophenylphosphat um (gelb gefärbtes Produkt). Nach einer erneuten einstündigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde in jede Vertiefung je 50µl 3 molare NaOH-Lösung einpipettiert, um die Reaktion abzubrechen (Blockierungsschritt). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Extinktion (optische Dichte) durch photometrische Messung im ELISA reader bei 405 nm. Die ermittelten Extinktionswerte verhielten sich proportional zur SAA-Konzentration. Die Berechnung der SAA-Konzentration der Serumproben erfolgte mit Hilfe der folgenden Regressionsgleichung, die anhand einer auf den Standardproben basierenden Eichkurve ermittelt:

$$Y = - 0,384 + 2,62 \cdot X$$

Y: SAA-Konzentration (µg/ml)

X: jeweilige Extinktion (optische Dichte) der Probe

4 Ergebnisse

4.1 Experimentübergreifende, allgemeine Erläuterungen zum Versuchsaufbau und zur graphischen Darstellung der ELISA- und Westernblotanalysen

In diesem Kapitel werden u.a. die Ergebnisse einer Vielzahl an ELISA- und Westernblot-Analysen graphisch dargestellt. Der Aufbau aller derartiger Experimente bzw. Abbildungen ist ähnlich und wird daher hier zunächst übergreifend erläutert:

SAP und α 1-AT wurden mittels Westernblot, wie unter 3.9.2 ausgeführt, detektiert. Die Röntgenfilme der jeweiligen Blots wurden eingescannt, um sie hernach graphisch darstellen zu können. SAP und α 1-AT werden entweder jeweils alleine oder zusammen, also in einer gemeinsamen Abbildung, dargestellt. Im letzteren Fall wurden die Antikörper auch zusammen inkubiert und mit demselben Sekundärantikörper auf einem Blot detektiert. In der Literatur finden sich nur äußerst wenige Angaben über die Regulation von α 1-AT in der Maus. Insbesondere ist unbekannt, welchen Einfluß bakterielle Toxine auf die Synthese des murinen α 1-AT haben. Nachdem in einem, hier nicht präsentierten initialen Satz von Experimenten, herausgefunden werden konnte, daß sich die Serumspiegel von α 1-Glykoprotein noch von α 1-AT durch i.p.-Injektion von LPS bzw. SEB beeinflussen ließen (Daten nicht gezeigt), wurde das in der Maus offenbar konstitutiv exprimierte, α 1-AT zur Kontrolle der Gesamtproteinmenge der im Westernblot analysierten Serum- und Leberproben verwendet („Beladungskontrolle“). Gleichzeitig konnten, sozusagen nebenbefundlich, Daten über die Regulation von α 1-AT während der Akute-Phase-Antwort der Maus erhoben werden. Anhand dieser Beladungskontrolle kann demonstriert werden, daß die detektierten unterschiedlichen SAP-Mengen nicht aus unterschiedlichen Gesamtproteinmengen der Proben resultieren. Wie bereits im Abschnitt 3.9.1 beschrieben wurde, wurden vor der Elektrophorese pro Geltasche jeweils genau $10\mu\text{l}$ des 1:20 vorverdünnten murinen Serums bzw. $10\mu\text{l}$ des, zuvor aus genau 80mg Organprobe und einer definierten Menge an Homogenisierungspuffer gewonnenen, Leberhomogenisats aufgetragen. Aus dieser exakten Mengenbestimmung bei der Probenvorbereitung resultierten in der Regel ohnehin vergleichbare Gesamtproteinmengen der analysierten Proben. Die Gesamtproteinmenge des Serums variiert interindividuell nur in einem äußerst geringen Ausmass, sodaß das Mitführen der Beladungskontrolle hier nicht zwingend notwendig gewesen wäre. Vereinzelt wiesen die untersuchten Proben trotzdem eine starke Varianz der α 1-AT-Mengen auf, sodass die Blots verworfen werden und ein neues Tierexperiment durchgeführt werden musste.

Jede Bande in einem abgebildeten Westernblot repräsentiert die SAP- bzw. α 1-AT- Konzentration *einer* Maus, die zu einem, unter den jeweiligen Banden bezifferten, genau definierten Zeitpunkt post injectionem für die Probengewinnung geopfert wurde. Art und Menge der jeweiligen injizierten Substanzen werden in

den jeweiligen Abbildungen gesondert beschrieben. Es wurden also interindividuelle Analysen der SAP- und α 1-AT-Kinetiken durchgeführt. Mit dieser Methode war eine Bestimmung der relativen Mengen an SAP und α 1-AT, jedoch keine genaue Bestimmung der absoluten Konzentrationen dieser Proteine möglich.

Letzteres ermöglichte jedoch der ELISA, mit dem die Serumkonzentrationen von SAA genau bestimmt werden konnten. Für die Analyse von SAA mittels ELISA wurden jeweils Aliquots der Serumproben verwendet, aus denen bereits Aliquots für die Westernblotanalyse hergestellt worden waren. In wenigen Fällen, bei denen der Abgleich der interindividuellen Gesamtproteinmengen im Westernblot eine zu hohe Varianz der α 1-AT-Mengen gezeigt hatte, wurden die Ergebnisse des SAA-ELISA verworfen und es mussten neue Proben in einem neuen Tierexperiment gewonnen werden.

Bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse des SAA-ELISA werden die jeweiligen Zeitpunkte post injectionem auf der Abzisse abgebildet; auf der Ordinate finden sich die jeweiligen SAA-Konzentrationen. In den Abbildungen, in denen sich keine Standardabweichungen finden, stellen die Balken jeweils Einzelwerte, also die SAA-Serumkonzentration einer Maus zu einem definierten Zeitpunkt, dar. Wie bei der Westernblotanalyse wurden also auch mit dem SAA-ELISA interindividuelle Konzentrationsbestimmungen durchgeführt.

In allen Graphiken steht „C“ für eine Negativkontrolle, d.h., eine Maus, die nur mit PBS, dem Lösungsmittel aller hier zu analysierenden Substanzen, oder mit DGal, behandelt wurde.

4.2 Etablierung eines Mausmodells zur Untersuchung der murinen APP im Septischen Schock

Wie bereits angeführt, stellen SAA und SAP die Haupt-APP der Maus dar. SAA ist zugleich ein Haupt-APP des Menschen (PEPYS 1983). Wie in den Kapiteln 1.8.2 und 1.8.3 bereits beschrieben wurde, ist seit längerem bekannt, daß die jeweilige parenterale Verabreichung der Zytokine TNF, IL-1 β und IL-6 sowie des bakteriellen Endotoxins LPS im Mausmodell einen Anstieg der jeweiligen Serumkonzentrationen von SAA und SAP bewirkt. Außerdem kontrollieren die eben genannten Induktoren, neben weiteren wie bspw. den Glucocorticoiden, die hepatische und extrahepatische Expression der Gene von SAA (CHO 2004). In der Literatur finden sich jedoch bislang keine systematischen Untersuchungen über den Verlauf der SAA- und SAP- Konzentrationen nach ihrer jeweiligen Induktion.

Anhand der Bestimmung dieser Kinetiken von SAA und SAP wurde hier zunächst ein Mausmodell zur Untersuchung der murinen Akute-Phase-Reaktion im Septischen Schock etabliert, wobei hierfür im wesentlichen das, bereits für die Untersuchung des Septischen Schocks etablierte, „DGal-Mausmodell“ modifiziert wurde, welches im nun folgenden Unterkapitel erklärt werden wird.

4.2.1 Die Kinetiken von SAA und SAP nach Injektion von LPS

Als erstes wurde Balb/c-Mäusen 100 μ g LPS i.p. injiziert. Nach 6, 16, 24 und 48 Stunden post injectionem wurden diese Mäuse getötet. Die Tiere zeigten etwa 24 Stunden nach Verabreichung des Endotoxins allenfalls marginale Erkrankungszeichen wie bspw. eine leichte Verminderung ihrer lokomotorischen Aktivität. Nach 48 Stunden waren alle evidenten Krankheitssymptome remittiert. Wie in Kapitel 1.4 bereits angeführt, reagieren mit DGal vorbehandelte Mäuse etwa 10⁵-fach sensibler auf LPS und stellen somit ein nützliches

Modell zum Studium der initialen Veränderungen beim Endo-, aber auch beim Enterotoxinschock dar. Für eine effiziente Sensibilisierung der Tiere gegenüber bakteriellen Toxinen, sollte zwischen der Verabreichung von DGal und dem jeweiligen Toxin nicht mehr als zwei Stunden Abstand liegen (GALANOS 1979, FREUDENBERG 1991, MIETHKE 1992b). Es gibt eine Publikation, die beschreibt, daß DGal die IL-1-induzierte SAA-Synthese blockiert (VOGELS 1993). Dieses entspricht, in Anbetracht der seit langem bekannten Eigenschaft von DGal, durch Depletion von Uridil eine unspezifische Inhibition der hepatischen Proteinsynthese zu verursachen (KMIEC 1994), auch den Erwartungen. Es sollte nun ermittelt werden, ob und in welchem Ausmaß die durch Induktoren des murinen Septischen Schocks (bspw. LPS, oder $\text{TNF}\alpha$), stimulierte SAA- bzw. SAP-Produktion nach D-Gal-Blockade der Leber durch eine extrahepatische Synthese beider Proteine kompensiert werden kann. Einigen Balb/c Mäusen wurde daher, eine Stunde vor der Verabreichung von $100\mu\text{g}$ LPS, 20mg DGal i.p. injiziert. Diese Mäuse entwickelten nach etwa 3, spätestens aber nach 4 Stunden evidente Krankheitssymptome wie bspw. Immobilität, Zittern, eine rauhes, aufgestelltes Fell, und eine Diarrhoe. Nach 6 Stunden mussten die, offensichtlich stark leidenden, Mäuse, getötet werden. Ein Tier verendete bereits 5,5 Stunden post injectionem, wobei von diesem keine Organproben entnommen wurden. In den Abbildungen 4.1a - 4.1c sind die Ergebnisse der Bestimmung der SAA-Serumkonzentrationen sowie die der relativen SAP-Mengen in Serum und Leberhomogenisat der so behandelten Balb/c-Mäuse dargestellt: In den Proben der Negativkontrollen, also sowohl das ausschliesslich mit PBS (Abb. 4.1a und 4.1b) als auch das ausschliesslich mit DGal behandelte Tier (Abb. 4.1c), konnte kein SAP bzw. nur eine marginale SAA-Konzentration nachgewiesen werden. Nach 6 Stunden findet sich ein deutlicher Anstieg der SAA- und SAP-Serumkonzentrationen, der Anstieg in der Leber fällt zu diesem Zeitpunkt vergleichsweise gering aus. Nach 16 Stunden zeigt sich ein weiterer deutlicher Anstieg der Konzentration beider APP, sowohl im Serum als auch in der Leber. Nach 24 Stunden finden sich die höchsten Konzentrationen an SAA und SAP im Serum, nach 48 Stunden sind diese jeweils wieder deutlich abgefallen. In der Leber bleibt die SAP-Menge ab 16 Stunden post injectionem hingegen konstant, d.h. man erkennt hier weder einen deutlichen Anstieg nach 24 Stunden, noch ist eine deutlicher SAP-Konzentrationsabfall nach 48 Stunden zu beobachten. Das mit einer Kombination aus LPS und DGal behandelte Tier weist, im Gegensatz zu der ausschliesslich mit LPS behandelten Maus, 6 Stunden nach der LPS-Injektion keinen Anstieg der Serum- bzw. Leberkonzentrationen von SAA und SAP auf. Das gesamte Tierexperiment wurde dreimal durchgeführt; da die Ergebnisse nahezu identisch waren, werden nur die Ergebnisse jeweils eines Westernblots in Abbildung 4.1b und 4.1c dargestellt. Nach Abschluss dieser ersten Experimente wurde bei den folgenden Versuchsreihen auf die Bestimmung des 16-Stunden-Wertes verzichtet, da die Bestimmung desselben einer eher geringen Erkenntnisgewinn in Aussicht stellte.

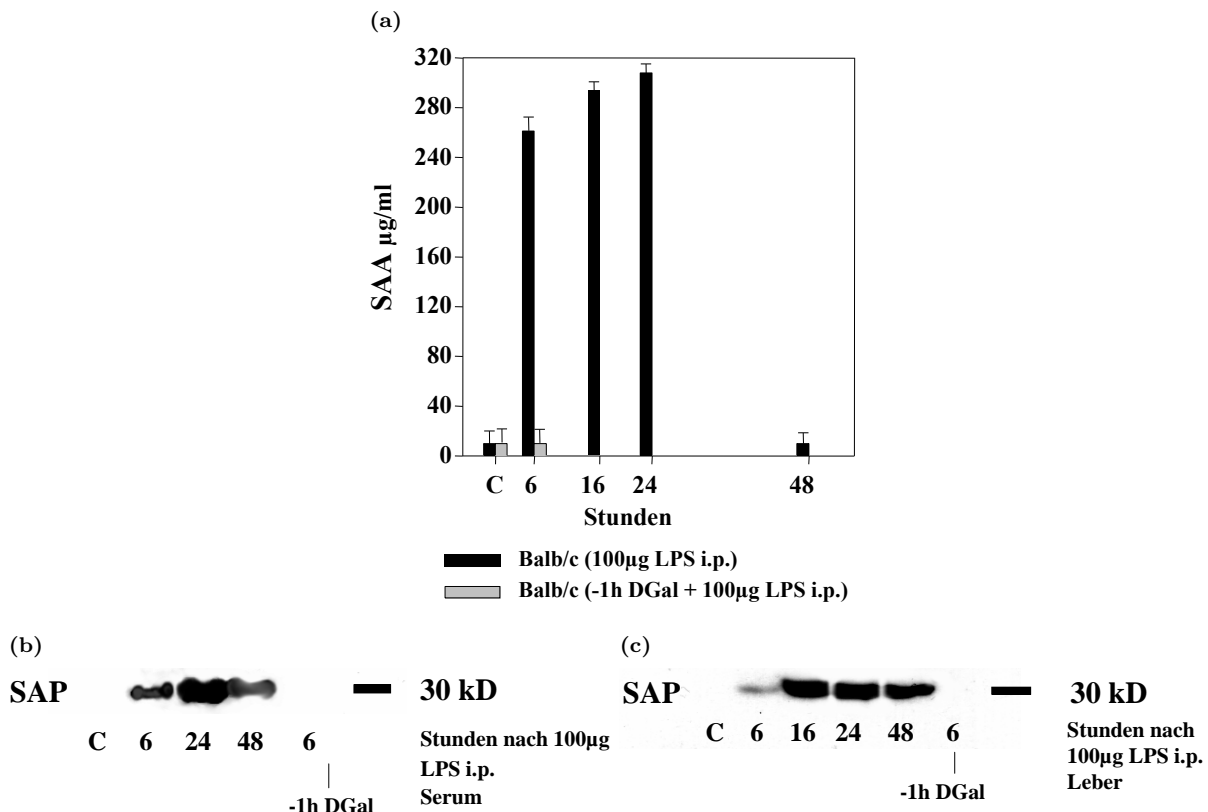


Abb. 4.1: Kinetiken der SAA-Serumkonzentration und SAP-Serum- und Leberkonzentrationen nach 100µg LPS i.p.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Balb/c Mäusen wurde jeweils 100µg LPS i.p. verabreicht. Außerdem wurde anderen Balb/c Mäusen jeweils 20mg DGal i.p. injiziert, einige dieser mit DGal behandelten Mäusen erhielten nach einer Stunde zusätzlich 100µg LPS i.p. (bezeichnet als: -1h DGal +100 µg LPS i.p.). Die Proben der ausschließlich mit DGal behandelten Mäuse werden ebenfalls, wie die übrigen Negativkontrollen auch, in Abb. 4.1c mit „C“ bezeichnet. Die PBS-Negativkontrollen wurden nach 24 Stunden geopfert, wie in Kapitel 4.1 ausgeführt. Die DGal Negativkontrollen wurden hingegen nach 6 Stunden geopfert. Es wurde drei unabhängige Versuche durchgeführt. Bei nahezu identischen Ergebnissen wird nur ein repräsentativer Serum- bzw. Leberhomogenisat-Westernblot abgebildet. Die abgebildeten Standardabweichungen (Standardabweichungen des Mittelwerts (\pm SE)) der Ergebnisse der SAA-ELISA-Analyse sind signifikant.

4.2.2 Die Kinetiken von SAA und SAP nach Injektion von $\text{TNF}\alpha$

Dem Zytokin TNF wird bekanntermaßen bei der Induktion des Septischen Schocks eine Schlüsselrolle zugeschrieben (MIETHKE 1992b, HEHLGANS 2005). Es gibt eine Arbeit, in der gezeigt wird, daß nach Injektion von TNF in Mäuse eine Hochregulation der hepatischen mRNA von SAA beobachtet werden konnte (RAMADORI 1988), es findet sich jedoch in der Literatur keine Publikation, in der beschrieben wird, wie sich die Proteinkonzentrationen von SAP und SAA nach parenteraler TNF-Applikation in der Leber bzw. im Serum verhalten. Um dieses zu klären, wurde 1µg $\text{TNF}\alpha$ in Balb/c-Mäuse i.p. injiziert und nach dem oben beschriebenen Model 6, 24 und 48 Stunden post injectionem die Konzentrationen von SAA und SAP in Serum bzw. Leber bestimmt. Auch in dieser Tierversuchsreihe wurde einigen Mäusen einer Stunde vor der TNF-Applikation 20mg DGal verabreicht, wobei wiederum eine Blockade der Induktion der Expression von SAA und SAP 6 Stunden nach der TNF-Gabe beobachtet werden konnte (Abb. 4.2a-4.2c). Die mit einer Kombination aus $\text{TNF}\alpha$ und DGal behandelten Tiere entwickelten ebenfalls nach 3-4 Stunden die, bereits oben beschriebenen, schweren Krankheitssymptome. Sie verendeten nach 7-9 Stunden,

sodaß auch in dieser Versuchsreihe deren SAA- und SAP-Konzentrationen nach 24- bzw. 48-Stunden nicht bestimmt werden konnten. Die maximale SAA-Serumkonzentration lag 24 Stunden nach Gabe von $1\mu\text{g}$ $\text{TNF}\alpha$ i.p. mit $220\mu\text{g/ml}$ deutlich niedriger (s. Abb. 4.2a) als zum vergleichbaren Zeitpunkt nach der Administration von $100\mu\text{g}$ LPS ($310\mu\text{g/ml}$) (s. Abb. 4.2a). Zusammenfassend fanden sich in der LPS-Versuchsreihe und in der $\text{TNF}\alpha$ -Versuchsreihe (Abb. 4.2a - 37c) vergleichbare Kinetiken der SAA- und SAP-Konzentrationen. Ein Unterschied besteht lediglich in der Kinetik der SAP-Mengen der Leber, welche sich nach TNF -Applikation proportional zu den Serumkonzentration verändern und nach LPS-Administration, wie erwähnt, bereits nach 16 Stunden angestiegen und nach 48 Stunden noch nicht abgefallen waren.

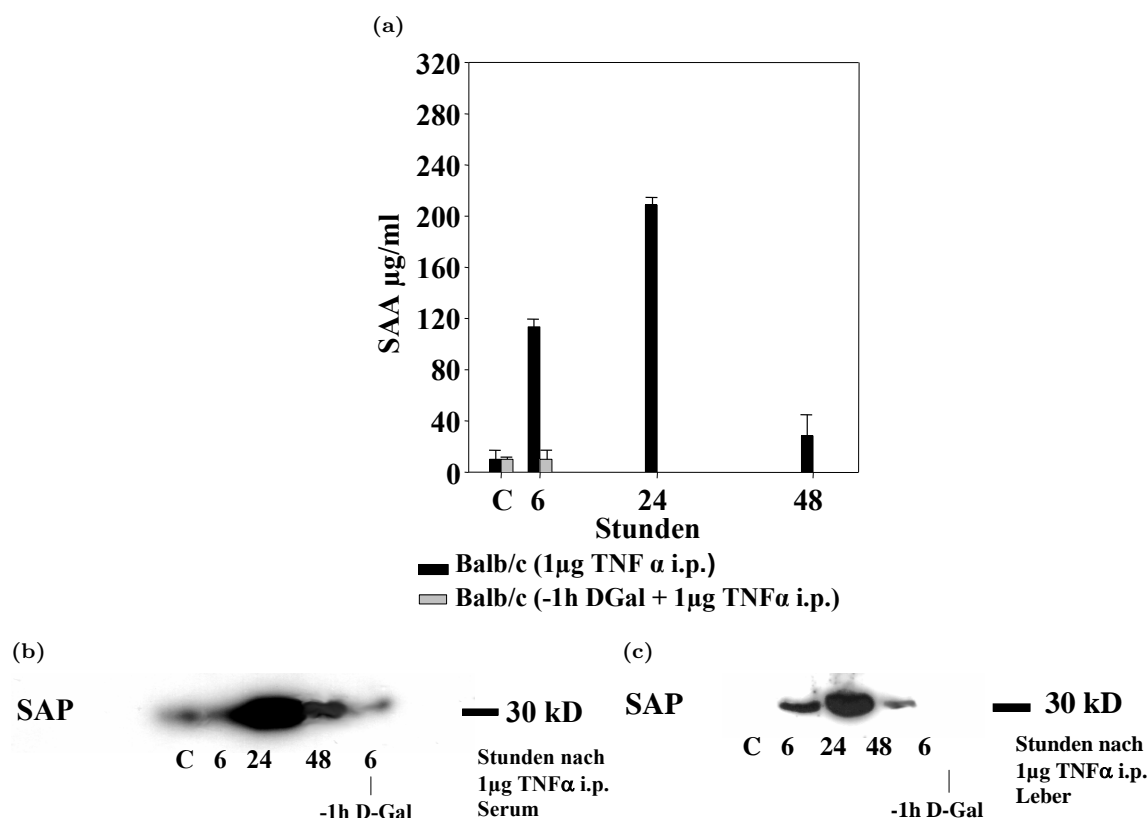


Abb. 4.2: Kinetiken der SAA-Serumkonzentration und SAP-Serum- und Leberkonzentrationen nach $1\mu\text{g}$ $\text{TNF}\alpha$ i.p.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Einigen Balb/c Mäusen wurde jeweils $1\mu\text{g}$ $\text{TNF}\alpha$ i.p. verabreicht. Außerdem wurde anderen Balb/c-Mäusen eine Stunde vor der TNF -Applikation 20mg DGal i.p. injiziert. Negativkontrollen werden mit „C“ bezeichnet. Die PBS-Negativkontrollen wurden nach 24 Stunden geopfert, wie in Kapitel 4.1 ausgeführt. Es wurde drei unabhängige Versuche durchgeführt. Bei nahezu identischen Ergebnissen wird nur ein repräsentativer Serum- bzw. Leberhomogenisat-Westernblot abgebildet. Die abgebildeten Standardabweichungen (Standardabweichungen des Mittelwerts ($\pm\text{SE}$)) der Ergebnisse der SAA-ELISA-Analyse sind signifikant.

4.2.3 Die DGal-medierte Blockade der $\text{IL-1}\beta$ -induzierten hepatischen SAP-Synthese kann durch die extrahepatische SAP-Synthese kompensiert werden.

Nicht nur $\text{TNF}\alpha$, sondern auch $\text{IL-1}\beta$ wird im Organismus durch Endotoxin induziert (DINARELLO 1983, LE 1989, MONSHOUWER 1996a, MONSHOUWER 1996b, SCHINDLER 1990, WERLING 1996). Es wurde bereits gezeigt, daß $\text{IL-1}\beta$ *in vivo* sowohl SAP als auch SAA zu induzieren vermag (MORTENSEN 1988, BRUUN 1998),

4 Ergebnisse

jedoch wurden hierbei keine Angaben zur Kinetik der SAP- und SAA-Konzentrationen gemacht. Diese publizierten Ergebnisse konnten wir mit dem nun bereits etablierten Versuchsaufbau nach Injektion von IL-1 β bestätigen und außerdem eine, mit den Ergebnissen der vorangegangenen Versuchsreihen vergleichbare, Kinetik der SAA- und SAP-Mengen im Serum bzw. in der Leber beobachten (Abb.4.3a - 4.3c). Auffällig ist jedoch, daß die SAA-Konzentration 6 Stunden nach der Injektion von IL-1 β im Mittel deutlich höher liegt, als die SAA-Konzentration nach 24 Stunden. Hier liegt also eine geringe Abweichung gegenüber den SAA-Kinetiken nach Gabe von LPS und TNF vor.

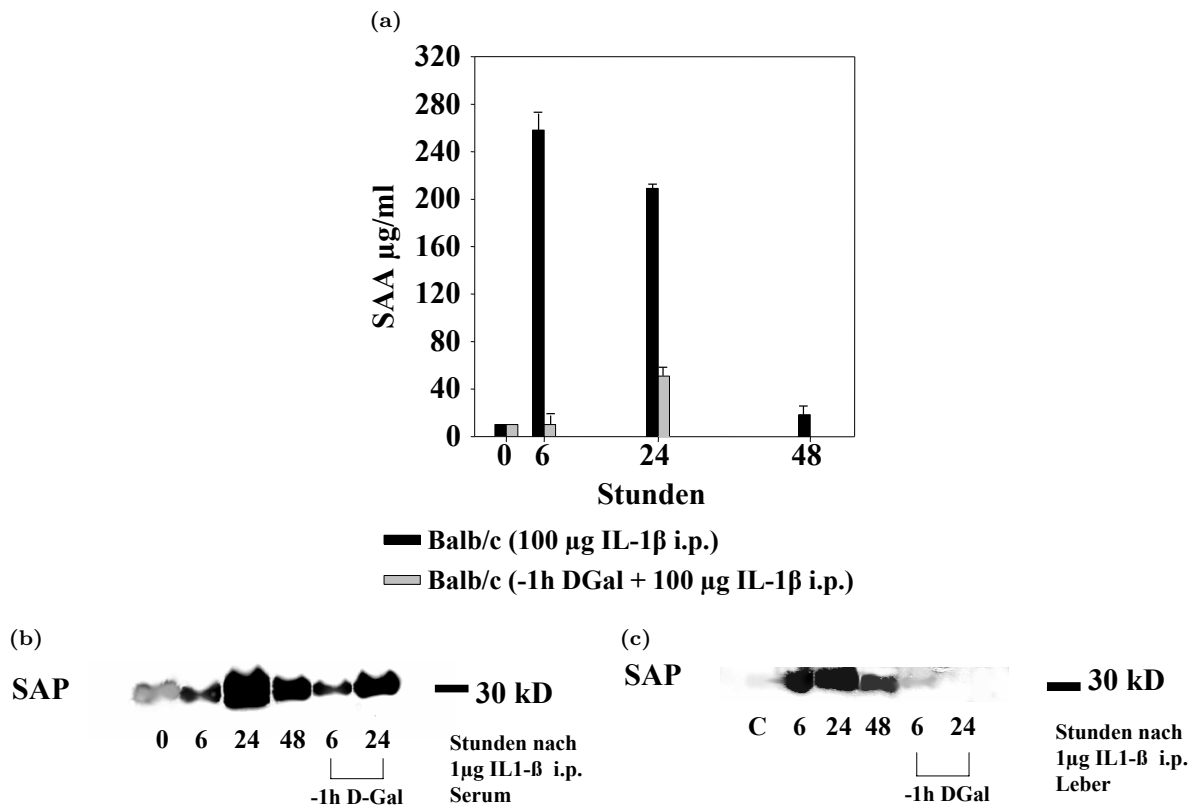


Abb. 4.3: Kinetiken der SAA-Serumkonzentration und SAP-Serum- und Leberkonzentrationen nach 1 μ g IL-1 β . i.p.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Einigen Balb/c-Mäusen wurde jeweils 1 μ g IL-1 β . i.p. verabreicht. Anderen Balb/c-Mäusen wurde jeweils 20mg DGal i.p. injiziert, einige dieser mit DGal behandelten Mäuse erhielten nach einer Stunde zusätzlich 1 μ g IL-1 β . i.p. Die Proben der *ausschließlich* mit DGal behandelten Maus werden ebenfalls, wie die übrigen Negativkontrollen auch, mit „C“ bezeichnet. Die PBS und die DGal-Negativkontrollen wurden nach 24 Stunden geopfert, wie in Kapitel 4.1 ausgeführt. Es wurde zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Bei nahezu identischen Ergebnissen wird nur ein repräsentativer Serum- bzw. Leberhomogenisat-Westernblot abgebildet. Die abgebildeten Standardabweichungen (Standardabweichungen des Mittelwerts (\pm SE)) der Ergebnisse der SAA-ELISA-Analyse sind signifikant.

Vogels et al. beschrieben bereits 1993, daß der IL-1-vermittelte Anstieg der murinen Serum-SAA-Spiegel durch die Administration von DGal vollständig blockiert werden kann (VOGELS 1993). Wie Abb. 4.3a zeigt, konnten wir diese Ergebnisse bestätigen und können hinzufügen, daß die SAA-Serumspiegel 24 Stunden nach der kombinierten IL-1 β /DGal Behandlung wieder leicht ansteigen. Zusätzlich konnten wir demonstrieren, daß sich im Gegensatz dazu, die SAP-Serumspiegel interessanterweise sowohl 6 Stunden als auch 24 Stunden nach der kombinierten DGal/IL-1 β -Injektion allenfalls diskret erniedrigt zeigten, wobei die SAP-Leberkonzentrationen hingegen zu beiden Zeitpunkten kaum bzw. gar nicht mehr nachweisbar waren (Abb. 4.3b und 4.3c), was darauf hinweist, daß das im Serum nachgewiesene SAP extrahepatisch synthetisiert

worden sein muß (Abb. 4.3c). Aufgrund des überraschenden Ergebnisses dieses Versuchs, wurde er vier Mal repliziert, wobei sich jeweils nahezu identische Ergebnisse zeigten.

4.2.4 Die IL-6-vermittelte Induktion der Expression von SAA und SAP

Ergänzend wurde in einer kleinen Versuchsreihe Balb/c Mäusen noch 500ng IL-6 i.p. verabreicht. Neta et al. publizierten bereits 1988, das *in vivo* verabreichtes IL-6 den Anstieg der SAA- und SAP-Serumkonzentrationen verursacht (NETA 1988). Diese Beobachtungen konnten hier bestätigt werden (Abb. 4.4a und 4.4b). Zusätzlich konnte hier ein Anstieg der SAP-Konzentration in der Leber beobachtet werden (Abb. 4.4c). IL-6 und IL-1 β induzierten 6 Stunden post injectionem SAA-Konzentrationen vergleichbarer Höhe, nämlich im ersteren Fall 210 μ g/ml und im zweiten Fall 220 μ g/ml (vgl. Abb. 4.3a und 4.4a).

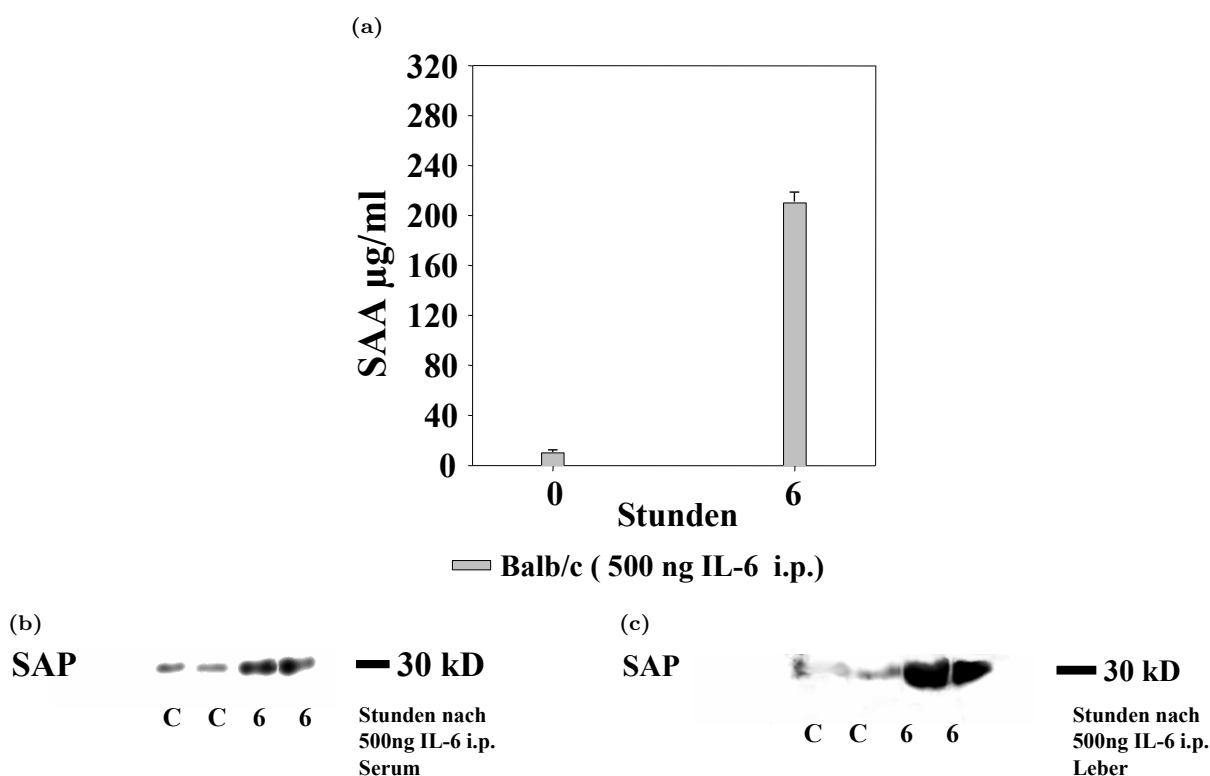


Abb. 4.4: SAA- und SAP-Serumkonzentrationen und SAP- Leberkonzentrationen 6h nach Verabreichung von 500ng IL-6 i.p.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Balb/c Mäusen wurde jeweils 500ng IL-6 i.p. verabreicht. Die Doppelwerte entsprechen 2 voneinander unabhängigen Tierversuchen. Die Negativkontrollen werden mit „C“ bezeichnet.

Zusammenfassend zeigten sich also nach der Applikation von LPS, IL-1 β und TNF α vergleichbare Kinetiken der SAA- und SAP-Konzentrationen, nämlich einen deutlichen Anstieg ihrer Konzentrationen bereits 6 Stunden post injectionem und einen Abfall derselben auf das Niveau der Ausgangswerte 48 Stunden post injectionem. 24 Stunden nach der Verabreichung dieser Substanzen konnten wir in unserem Versuchsaufbau die maximalen Konzentrationen beider Akute-Phase-Proteine messen, eine Ausnahme stellte hierbei die 6 Stunden post 1 μ g IL-1 β gemessene SAA-Konzentration dar, die wiederholt deutlich höher ausfiel als der 24-Stunden-Wert dieser Versuchsentität.

Somit war das Mausmodell zur Untersuchung der Akute-Phase-Proteine SAA und SAP im murinen Septischen Schock nun erfolgreich etabliert.

4.3 Die $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IL-1}\beta$ -vermittelte Induktion der Expression von SAA und SAP ist dosisabhängig.

Anschließend stellte sich die Frage, ob das Ausmaß der Zytokin-vermittelten Induktion von SAA und SAP abhängig von der Dosierung des jeweiligen verabreichten Zytokins ist. Daher wurden Balb/c Mäusen, im Sinne einer Titrationsreihe, aufsteigende Mengen an $\text{TNF}\alpha$ bzw. $\text{IL-1}\beta$ verabreicht und die so behandelten Mäuse jeweils nach 24 Stunden post injectionem zur Serumgewinnung geopfert. Eine Maus erhielt also eine definierte Menge eines Zytokins.

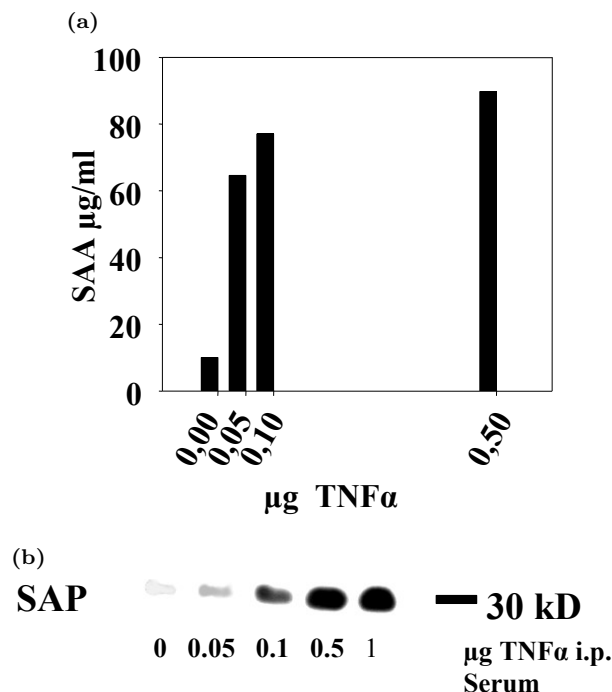


Abb. 4.5: Die $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Induktion der Expression von SAA- und SAP ist dosisabhängig.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Balb/c-Mäusen wurde die jeweils in der Abbildung angegebenen Mengen an $\text{TNF}\alpha$ i.p. verabreicht. Also erhielt eine Maus jeweils eine definierte Konzentration des Zytokins. Die Serumproben wurden jeweils exakt 24 Stunden nach der Gabe der jeweiligen Menge an $\text{TNF}\alpha$ entnommen. Die Negativkontrollen werden mit „C“ bezeichnet und sind ebenfalls nach 24 Stunden geopfert worden. Dieses Experiment wurde nicht repliziert.

Wie aus den Abbildungen 4.5 und 4.6 hervorgeht, ist so die $\text{TNF}\alpha$ - als auch die $\text{IL-1}\beta$ -vermittelte Induktion der Expression von SAA und SAP eindeutig abhängig von der Menge des jeweils injizierten Zytokins.

In der vorangehenden Versuchsreihe hatte sich bereits gezeigt, daß $1\mu\text{g IL-1}\beta$ und $1\mu\text{g TNF}\alpha$ nahezu identische SAA-Serumkonzentrationen 24 Stunden post injectionem hervorrufen (Abb. 4.2a und 4.3a). Wie daher zu erwarten, waren auch die durch die niedrigeren, äquivalenten, Konzentrationen beider Zytokine hervorgerufenen SAA-Konzentrationen jeweils von vergleichbarer Höhe (Abb. 4.5a und 4.6a). Also ist das Ausmaß der $\text{IL-1}\beta$ - und $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten SAA-Induktion etwa identisch.

In den Abbildungen 4.5b und 4.6b sieht man einen Titrationseffekt der Mengen an SAP, jedoch ist dieser nicht so eindrücklich, wie bei dem eben beschriebenen Titrationseffekt der SAA-Serumkonzentrationen. Bereits im einleitenden Kapitel 4.1 wurde erwähnt, daß eine genaue Quantifizierung der SAP-Konzentrationen bei der so durchgeführten Westernblotanalyse nicht möglich ist.

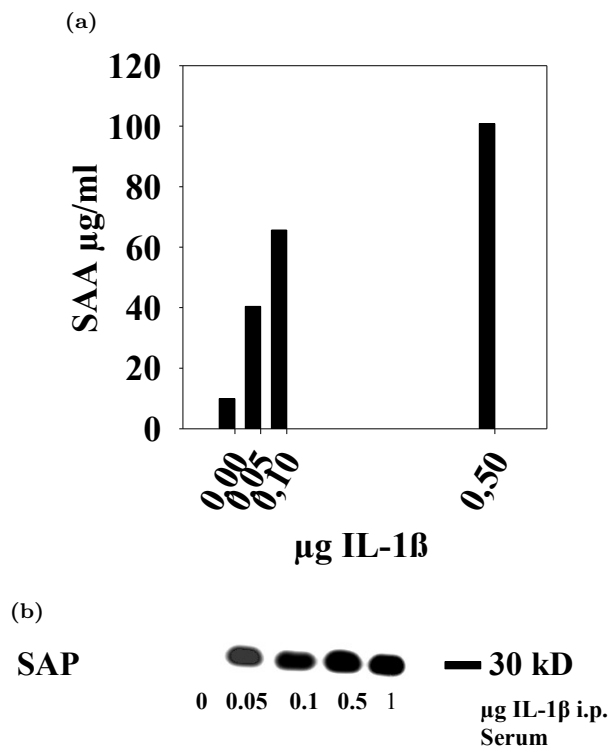


Abb. 4.6: Die $\text{IL-1}\beta$ -vermittelte Induktion der Expression von SAA- und SAP ist dosisabhängig. Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Balb/c-Mäusen wurde die jeweils in der Abbildung angegebenen Mengen an $\text{IL-1}\beta$ i.p. verabreicht. Also erhielt eine Maus jeweils eine definierte Konzentration des Zytokins. Die Serumproben wurden jeweils exakt 24 Stunden nach der Gabe der jeweiligen Menge an $\text{TNF}\alpha$ entnommen. Die Negativkontrollen werden mit „C“ bezeichnet. Dieses Experiment wurde nicht repliziert.

4.4 SEB induziert die Synthese von SAA und SAP *in vivo*.

Wie gezeigt, induziert das Endotoxin LPS die Akute-Phase-Proteine SAA und SAP. Da, wie unter 1.4 ausgeführt, neben LPS auch Enterotoxine eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Septischen Schocks spielen können, soll in dieser Arbeit erstmalig geprüft werden, welchen Einfluß Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) auf die Expression von SAA und SAP im Mausmodell hat.

Hierzu wurde Balb/c-Mäusen nach dem etablierten Experimentalschema $10\mu\text{g}$ SEB verabreicht. Wie aus Abb. 4.7a - 4.7c ersichtlich, wird in dieser Arbeit erstmalig gezeigt, daß SEB ebenfalls in der Lage ist, die hepatische Synthese von SAA und SAP zu induzieren und die Serumkonzentrationen beider Proteine deutlich anzuheben (Abb. 4.7a - 4.7c). Die Kinetiken der durch SEB induzierten SAA- und SAP-Konzentrationen in Leber und Serum sind hierbei mit denen der bisher beschriebenen Induktoren nahezu identisch. Die Mäuse starben spätestens 8 Stunden nach der kombinierten Verabreichung von DGal und $10\mu\text{g}$ SEB, wobei sie nach 3 Stunden bereits die, bereits in Kapitel 4.2 angeführten, Krankheitszeichen wie eine Verminderung ihrer lokomotorischen Aktivität sowie ein rauhes, aufgestelltes Fell, entwickelten. Von der Symptomatologie

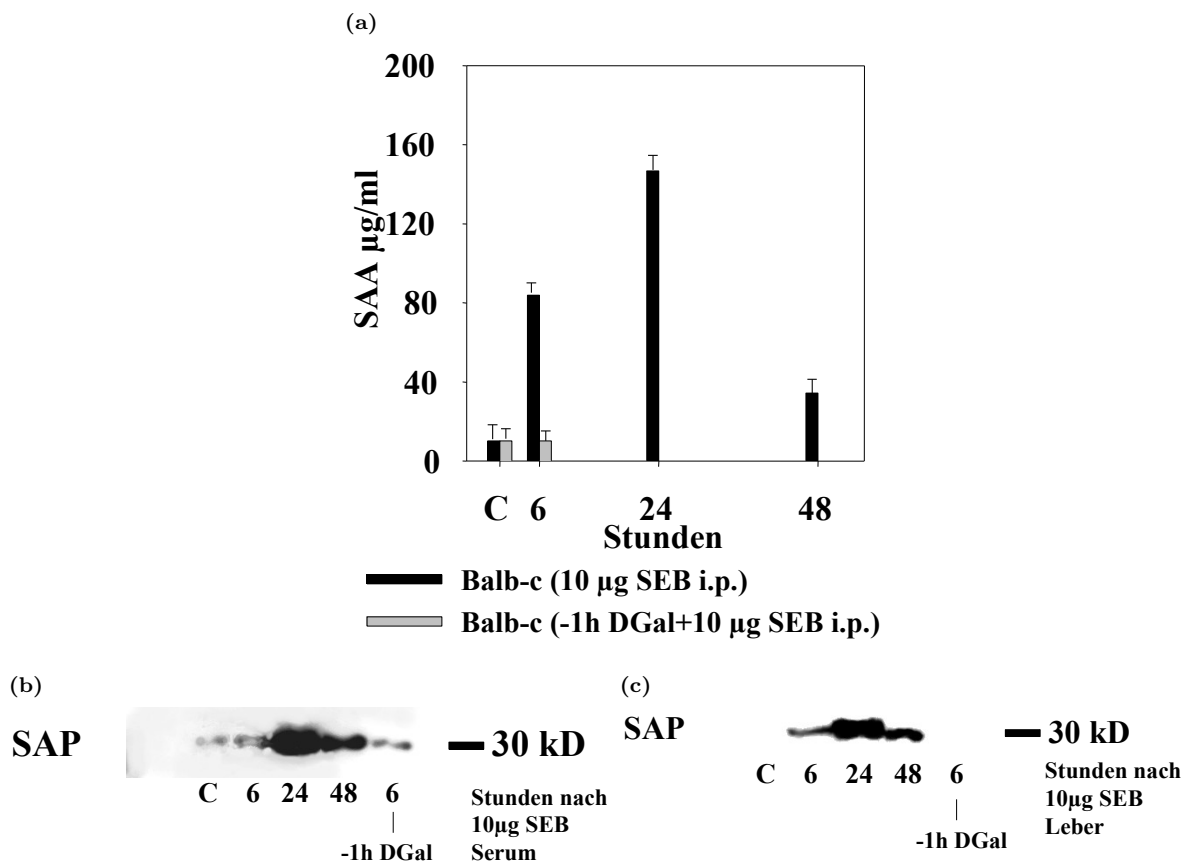


Abb. 4.7: SEB induziert die Expression von SAA und SAP *in vivo*

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Balb/c-Mäusen wurde jeweils 10µg SEB i.p. verabreicht. Außerdem wurde weiteren Mäusen jeweils 20mg DGal i.p. injiziert, einige von diesen DGal behandelten Mäusen erhielten nach einer Stunde zusätzlich 10µg SEB i.p. (bezeichnet als: -1h DGal + 10µg SEB i.p.). Die Proben der ausschliesslich mit DGal behandelten Mäuse werden ebenfalls, wie die übrigen Negativkontrollen auch, mit „C“ bezeichnet. Die PBS-Negativkontrollen wurden, wie in Kapitel 4.1 ausgeführt, nach 24 Stunden, die DGal-Negativkontrollen hingegen nach 6 Stunden geopfert. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Bei nahezu identischen Ergebnissen wird nur ein repräsentativer Serum- bzw. Leberhomogenisat- Westernblot abgebildet. Die abgebildeten Standardabweichungen (Standardabweichungen des Mittelwerts (\pm SE)) der Ergebnisse der SAA-ELISA-Analyse sind signifikant.

her betrachtet, laufen der SEB und der LPS-vermittelte Schock (vgl.Kapitel 4.2) also ähnlich ab. Die mit DGal vorbehandelten Tiere zeigten 6 Stunden nach der Injektion von 10µg SEB keine Hochregulation ihrer SAP- bzw. SAA-Synthese.

4.5 Die Bedeutung der TNF/TNFR-Familienmitglieder

TNFRp55, LTR β und FAS für die Induktion von SAA bzw. SAP.

Wie in Kapitel 1.8 bereits ausgeführt wurde, spielt das Zytokin TNF, neben IL-6 und IL-1, bei der Induktion der Akute-Phase-Antwort eine Hauptrolle. Kapitel 1.5 ist zu entnehmen, daß TNF an den TNFRp55 und TNFRp75 bindet, wobei die meisten Effektorfunktionen von TNF über den TNFRp55 vermittelt werden. Aufgrund dieser wichtigen Rolle in der TNF-Signaltransduktionskaskade ist die Untersuchung der Bedeutung des TNFRp55 für die Induktion der beiden Haupt-APP SAA und SAP interessant. In Kapitel

1.5 sind noch viele weitere Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie aufgeführt, die man funktionell in Apoptose-auslösende und nicht-Apoptose-induzierende Mitglieder einteilen kann. Aus der erste Untergruppe wählten wir den Apoptose-Induktor FAS und aus der zweiten Untergruppe den Lymphotoxin-Rezeptor β (LTR β) zur Untersuchung ihrer Bedeutung für die Induktion der SAA- bzw. SAP-Synthese aus.

4.5.1 Die SEB- sowie die LPS-vermittelte Induktion von SAA und SAP sind jeweils unabhängig vom TNF-Rezeptor p55 (TNFRp55) und werden zudem durch die Verabreichung von DGal/LPS nicht beeinflusst.

Wie in Kapitel 1.4 ausgeführt, zeigten Miethke et al. bereits im Jahre 1992, daß TNF sowohl bei der Induktion des Endo-, als auch bei der Induktion der Enterotoxin-vermittelten Schocks eine zentrale Rolle spielt. Im Mausmodell steigt die TNF-Serumkonzentration bereits 30 Minuten nach Injektion von SEB deutlich an (MIETHKE 1992a). Mäuse mit einer Deletion („knock out“) des Lokus des TNF-Rezeptors p55 (TNFRp55 $^{-/-}$ -Mäuse) sind sowohl gegenüber einem Endotoxin- als auch gegenüber einem Enterotoxin-Schock resistent (PFEFFER 1993). Um die Bedeutung des TNFRp55 für die Akute-Phase-Antwort im Septischen Schock herauszufinden, wurde solchen TNFRp55 $^{-/-}$ -Mäusen 100 μ g LPS bzw. 10 μ g SEB nach dem in Kapitel 4.1 beschriebenen Versuchsprotokoll injiziert (Abb. 4.9 und 4.10).

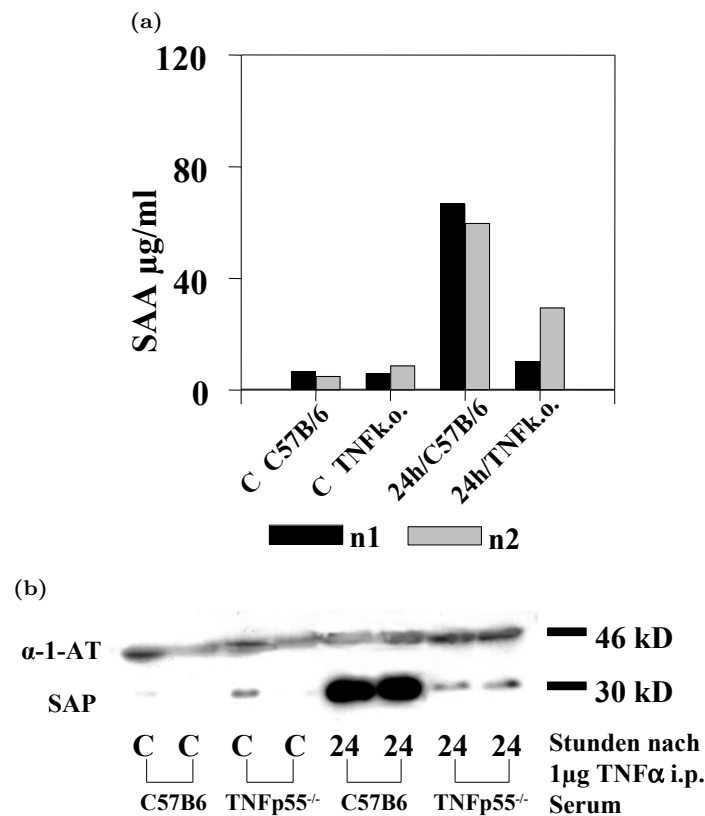


Abb. 4.8: TNF α ruft in TNFRp55 $^{-/-}$ -Mäusen keine Induktion von SAA oder SAP hervor - Kontrolle des Phänotyps der TNFRp55 $^{-/-}$ -Mäuse.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. TNFRp55 $^{-/-}$ -Mäusen und ihrem entsprechendem Wildtyp, den C57B/6-Mäusen, wurde jeweils 1 μ g TNF α i.p. verabreicht und die so behandelten Tiere sowie die Negativkontrollen nach 24 Stunden zur Serumgewinnung geopfert. Die Negativkontrollen werden mit „C“ bezeichnet. Dieses Kontrolllexperiment wurde nicht repliziert.

4 Ergebnisse

Zuvor wurde jedoch in einem Vorexperiment der Phänotyp der TNFRp55^{-/-}-Mäuse überprüft, in dem deren SAA- bzw. SAP-Serumspiegel nach der Applikation von TNF α bestimmt wurden (Abb. 4.8). Erwartungsgemäß zeigten sich 24 Stunden nach TNF α -Injektion in den TNFRp55^{-/-}-Mäusen, im Gegensatz zum Wildtyp (C57B/6) *keine* wesentlichen Veränderungen der SAA- bzw. SAP-Serumkonzentrationen. In derselben Abbildung erkennt man außerdem den zusätzlichen Nachweis von α 1-AT, welches in TNFRp55^{-/-}-Mäusen offenbar ebenfalls konstitutiv exprimiert wird, und somit als „Beladungskontrolle“ bei der Gelelektrophorese dienen konnte.

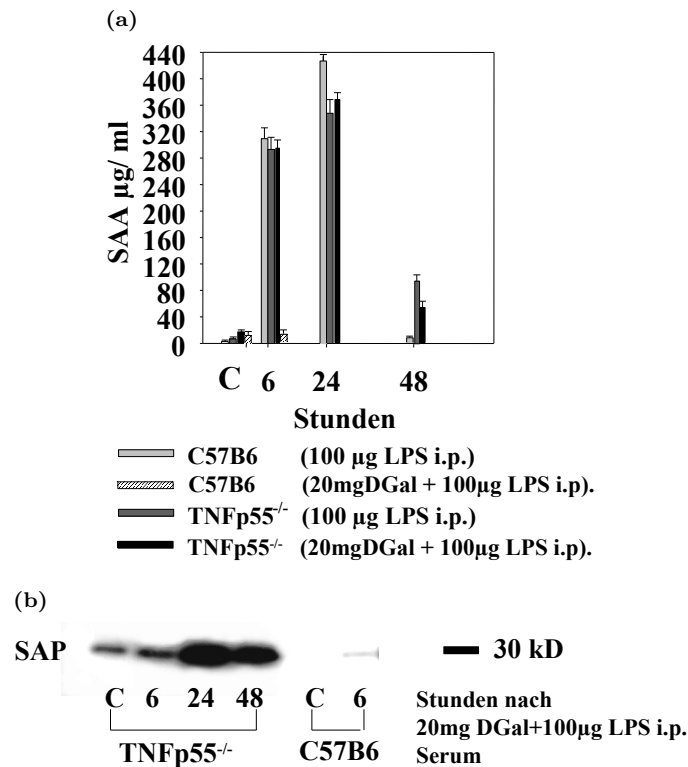


Abb. 4.9: Die LPS-vermittelte Induktion von SAA und SAP ist unabhängig vom TNF-Rezeptor p55 und wird durch die kombinierte Verabreichung von DGal/LPS nicht beeinflusst.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. TNFRp55^{-/-}-Mäusen und ihrem entsprechendem Wildtyp, den C57B/6-Mäusen, wurde jeweils 100µg LPS i.p. injiziert, einigen dieser Mäuse wurde zudem ein Stunde vor der LPS-Administration 20mg DGal intraperitoneal instilliert. Die Negativkontrollen wurden nach 24 Stunden geopfert und werden mit „C“ bezeichnet. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Bei nahezu identischen Ergebnissen wird nur ein repräsentativer Serum- bzw. Leberhomogenisat-Westernblot abgebildet, auf dem sich der Vergleich der SAP-Mengen von mit DGal und LPS behandelten Mäusen findet. Der Westernblot bildet also weniger Serumproben ab, als die korrespondierende ELISA-Darstellung in Abb. 4.9b, in der zusätzlich die SAA-Konzentrationen der *nicht* mit DGal-behandelten Tiere dargestellt werden. Die C57B/6-Mäuse überlebten nur einige Stunden, weswegen hier die Bestimmung der 24- bzw. 48-Stundenwerte nicht möglich gewesen ist. Die abgebildeten Standardabweichungen (Standardabweichungen des Mittelwerts (\pm SE)) der Ergebnisse der SAA-ELISA-Analyse sind signifikant.

Aus Abbildung 4.9 und 4.10 geht hervor, daß TNFRp55^{-/-}-Mäuse sowohl nach parenteraler Applikation von 100µg LPS, als auch nach Applikation von 10 µg SEB sowohl SAA als auch SAP produzieren. Die Kinetiken beider Proteine unterscheiden sich in den TNFRp55^{-/-}-Mäusen hierbei nicht von den der C57B/6-Mäusen. Folglich ist der TNFRp55 entbehrlich für die SAA- bzw. SAP-Synthese. Diese Befunde waren bis zur Veröffentlichung dieser Arbeit noch nicht bekannt. In Abb. 4.10b ist keine Kinetik, sondern nur der Vergleich von Negativkontrollen (C) mit den 24 Stunden nach der SEB-Instillation bestimmten SAP-Werten. Es liegen jedoch repräsentative Blots über diese Kinetik vor, die hier nicht zur Darstellung kommen.

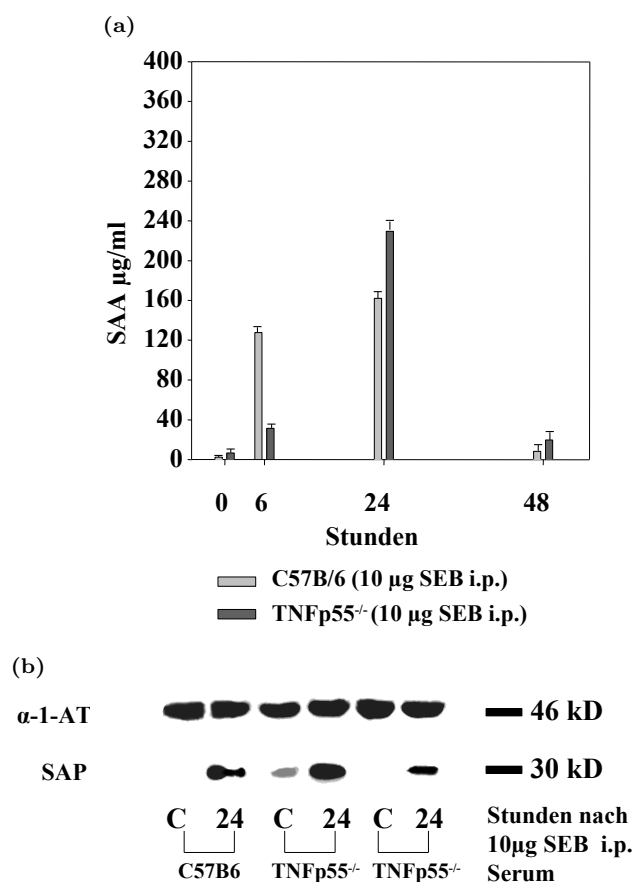


Abb. 4.10: Die SEB-vermittelte Induktion von SAA und SAP ist unabhängig vom TNF-Rezeptor p55.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. TNFRp55^{-/-}-Mäusen und ihrem entsprechenden Wildtyp, den C57B/6-Mäusen, wurde jeweils 10µg SEB i.p. verabreicht. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Negativkontrollen wurden nach 24 Stunden geopfert, wie in Kapitel 4.1 ausgeführt und werden mit „C“ bezeichnet. Bei nahezu identischen Ergebnissen wird nur ein repräsentativer Serum- bzw. Leberhomogenisat- Westernblot abgebildet. In diesem sind nur die Negativkontrollen sowie die 24-Stunden-Werte abgebildet. Die abgebildeten Standardabweichungen (Standardabweichungen des Mittelwerts (±SE)) der Ergebnisse der SAA-ELISA-Analyse sind signifikant.

Wie bereits in Kapitel 4.2.3 bzw. in Abbildung 4.3 dargestellt, kompensieren Balb/c-Mäuse die, durch die kombinierte Verabreichung von DGal und 1µg IL-1β herbeigeführte, Blockade der SAP-Synthese offenbar durch eine extrahepatische Synthese dieses Proteins und können so ihre SAP-Serumspiegel auf einem hohen Niveau halten. Da die so behandelten Tiere die Verabreichung von DGal/IL-1β überlebten, stellt sich die Frage, ob ihr Überleben u.a. auf diese hohen SAP-Serumspiegel, und ggf. den erhöhten Serumspiegel anderer, hier nicht nachgewiesener APP, beruht. Gerade im Hinblick auf diese Fragestellung war es interessant zu explorieren, ob auch das Überleben der TNFRp55^{-/-}-Mäuse nach kombinierter DGal/LPS-Verabreichung (PFEFFER 1993) mit einem, in Wildtypmäusen nach dieser Behandlung, nicht nachweisbaren, Anstieg von SAP oder von SAA korreliert. Tatsächlich ist, wie den Abbildungen 4.9a und 4.9b zu entnehmen, die Synthese von SAA und von SAP in TNFRp55-defizienten Mäuse nach systemischer DGal/LPS-Verabreichung unbeeinträchtigt. In Abbildung 4.9b wird nur der Vergleich der mit DGal und LPS kombiniert behandelten Tiere abgebildet; die jeweils ausschließlich mit LPS behandelten TNFRp55^{-/-}- bzw. C57B/6-Mäuse zeigen beide einen vergleichbaren Anstieg der SAP-Mengen im Serum (Westernblots hier nicht gezeigt). Die Synthese von SAP in der Leber ist bei den TNFRp55-defizienten Tieren unbeeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich schließen, daß, TNF die Induktion der hepatozellulären Apopto-

se über den TNFRp55 vermittelt und daß durch das Ausbleiben der Leberschädigung die Synthese der Akute-Phase-Proteine ungestört ablaufen kann. Es bleibt hierbei jedoch unklar, in welchem Ausmaß diese ungestörte Synthese der Akute-Phase-Proteine SAA und SAP zum Überleben der TNFRp55^{-/-}-Mäuse nach kombinierter DGal/LPS-Instillation beiträgt.

4.5.2 Die SEB- sowie die LPS-vermittelte Induktion von SAA und SAP sind jeweils unabhängig vom Lymphotoxin-Rezeptor β (LTR β)

Der TNFRp55 ist das Namensgebende Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie und gehört zur Untergruppe der Apoptose-induzierenden Mitglieder. Wie im Kapitel 1.5 bereits ausgeführt, ist der Lymphotoxin-Rezeptor- β (LTR β) ebenfalls ein Mitglied der TNFR-Superfamilie, zählt hingegen aber zur Untergruppe der Rezeptoren, die nicht in die Apoptose-Kaskade involviert sind. Es fanden sich im Schrifttum bislang lediglich indirekte Hinweise dafür, daß der LTR β in der Akute-Phase-Antwort eine Rolle spielen könnte: Bspw. wurde gezeigt, daß LTR β NF κ B aktiviert (NAKANO 1996, CHANG 2002). NF κ B wiederum stimuliert eine Reihe von Zytokinen, die in der Akute-Phase-Reaktion eine große Rolle spielen wie bspw. IL-1, IL-6, TNF α und IFN γ (GHOSH 1998).

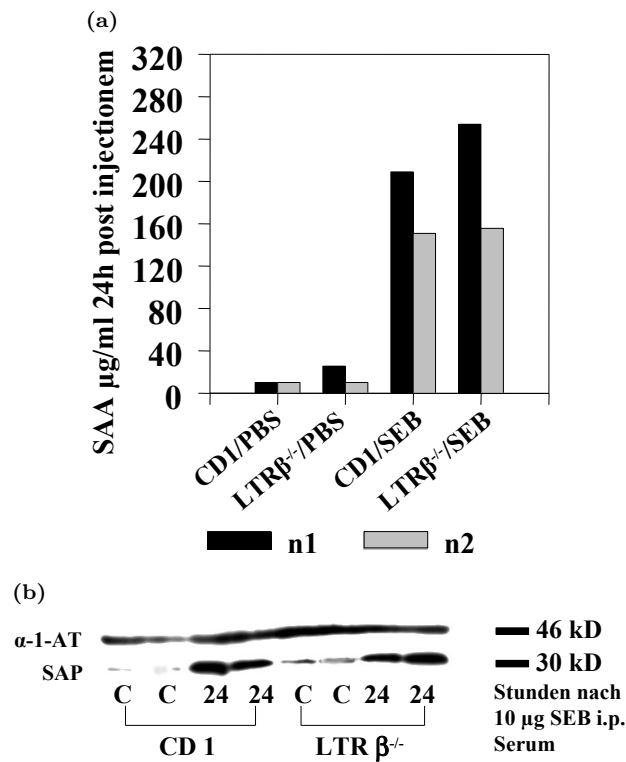


Abb. 4.11: Die SEB-vermittelte Induktion von SAA und SAP ist unabhängig vom Lymphotoxin-Rezeptor β (LTR β).

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. LTR β ^{-/-}-Mäusen und ihrem entsprechendem Wildtyp, den CD1-Mäusen, wurde jeweils 10 μ g SEB i.p. verabreicht und die SAA und SAP-Konzentrationen ausschließlich 24 Stunden post injectionem bestimmt. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Bei nahezu identischen Ergebnissen wird nur ein repräsentativer Serum- bzw. Leberhomogenisat-Westernblot abgebildet. Die SAA- und SAP-Serumkonzentrationen werden in Abb. 4.11a und 4.11b nebeneinander aufgeführt: In Abb. 4.11a entspricht „n1“ dabei der ersten und „n2“ der zweiten Tierversuchsreihe. Die Negativkontrollen werden hier mit „PBS“ bezeichnet.

In dieser Arbeit wird erstmalig gezeigt, daß die Produktion von SAA und SAP nach Injektion von 10 μ g

SEB unabhängig vom LTR β ist (Abb. 4.11a und 4.11b), da das Ausmaß der Induktion von SAA und SAP bei den LTR $\beta^{-/-}$ -Mäusen (FÜTTERER 1998), im Vergleich mit ihrem entsprechenden Wildtyp, den CD1-Mäusen, vergleichbar hoch ist. Ebenso ist der Endotoxin-vermittelte Schock (100 μ g LPS) unabhängig von LTR β (Daten nicht gezeigt). Die Kinetiken beider Proteine post inductionem entsprechen hierbei den bisher gezeigten (Daten nicht gezeigt). Durch den zusätzlichen Nachweis von α 1-AT in Abb. 4.11b wird deutlich, daß die erhöhten Mengen an SAP nicht durch erhöhte Gesamtproteinmengen der Proben zustande kommen.

4.5.3 Die intraperitoneale Applikation von Anti-FAS-AK hat keinen Einfluss auf die Synthese von SAA und SAP *in vivo*.

Im Kapitel 4.4 wird gezeigt, daß die Entero- bzw. Endotoxin-vermittelte Induktion der SAA- und SAP-Synthese unabhängig von TNFRp55 und LTR β ist. Wie diese beiden Rezeptoren gehört der FAS-Rezeptor, oder nur kurz FAS genannt, ebenfalls zur TNFR-Superfamilie (s.Kapitel 1.5).

1993 zeigte die Arbeitsgruppe von Nagata erstmalig, daß die intraperitoneale Injektion von Anti-FAS(JO2)-Antikörper zu einer letalen Hepatitis führt. Anti-FAS-AK imitiert hierbei den FAS-Liganden, indem er an den FAS-Rezeptor bindet und die zelluläre Apoptose initiiert (OGASAWARA 1993). Es ist nicht bekannt, ob bzw. auf welche Weise die intraperitoneale Injektion von Anti-FAS-AK die Expression von Akute-Phase-Proteinen beeinflusst.

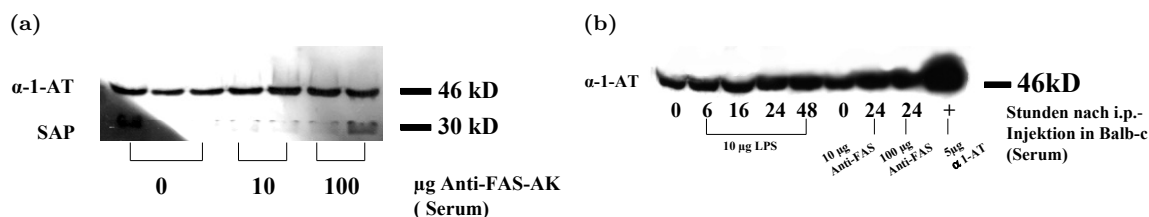


Abb. 4.12: Die i.p. Injektionen von 10 μ g bzw. 100 μ g Anti-FAS-AK i.p. führen nicht zur Veränderung der SAP- bzw. α 1-AT Serumspiegel in Balb/c-Mäusen.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Balb/c-Mäusen wurde entweder nur das Lösungsmittel PBS (mit „0“ bezeichnet) oder 10 μ g bzw. 100 μ g Anti-FAS-AK (Jo2/Pharmingen) oder (Abb. 4.12b) 10 μ g LPS intraperitoneal injiziert. Nach 6 Stunden, bzw. nach den in Abb. 4.12b angeführten Zeitpunkten post LPS-Injektion, wurden alle Tiere geopfert. Der in Abb. 4.12a dargestellte Westernblot repräsentiert drei unabhängige Experimente, die alle nahezu identische Ergebnisse erbrachten. In Abb. 4.12b ist ein singuläres, nicht repliziertes Experiment dargestellt.

Daher injizierten wir, nach dem in Kapitel 4.1 beschriebenen Versuchsprotokoll, in einem Vorexperiment zunächst 10 μ g und 100 μ g Anti-FAS-Antikörper (Jo2/Pharmingen) in jeweils 6 Balb/c-Mäuse. Die mit 100 μ g Anti-FAS behandelten Balb/c-Mäuse starben nach spätestens 8 Stunden, die mit 10 μ g Anti-FAS-AK behandelten Mäuse verendeten spätestens nach 12 Stunden. Nach 7 Stunden verendete das erste mit 100 μ g Anti-FAS-AK behandelte, nach 9 Stunden das erste mit 10 μ g Anti-FAS-AK behandelte Tier. Daher wurde zur Bestimmung der SAA- und SAP-Konzentrationen der Zeitpunkt 6 Stunden post injectionem gewählt. In Abb. 4.12 sieht man, daß die Serumspiegel von SAP nach der Injektion von 10 μ g sowie von 100 μ g Anti-FAS-AK nicht ansteigen, bzw. gar nicht nachweisbar sind. SAP in der Leber wurde ebenfalls bestimmt, auch hier zeigte sich keine Veränderungen des SAP-Gehalts der Leberhomogenisate nach Injektion von Anti-FAS-AK (Daten nicht gezeigt). Die SAA-Serumkonzentrationen zeigten 6 Stunden nach der Verabreichung von 10 μ g bzw. 100 μ g Anti-FAS-AK ebenfalls keine Veränderungen. (Daten nicht

gezeigt). Auch die Serumkonzentration von α 1-AT ließ sich durch Gabe der genannten Dosierungen von Anti-FAS-AK nicht beeinflussen (s.Abb. 4.12a und 4.12b).

Der durch den Anti-FAS-AK vermittelte Schock entspricht *nicht* dem bisher in dieser Arbeit verwendeten Modell des Septischen Schocks. Zum einen war hierbei die Gabe von DGal zur Induktion eines letalen Schocks nicht notwendig, und zum anderen wurde der Schock nicht durch ein bakterielles Toxin vermittelt. Die mit $10\mu\text{g}$ und $100\mu\text{g}$ Anti-FAS-AK behandelten Mäuse sterben an einer fulminanten Hepatitis, wie bereits von Ogasawara et al. publiziert worden war (OGASAWARA 1993). Unter der Vorstellung, daß der dadurch bedingte rasche Zerfall der Leber die Synthese der Akute-Phase-Proteinen verhindern könnte, wählten wir nun für die Injektion deutlich geringere, subletale Konzentrationen an Anti-FAS-AK. Wir titrierten die Konzentration von Anti-FAS-AK und verabreichten $0,01\mu\text{g}$, $0,1\mu\text{g}$ und $1\mu\text{g}$ Anti-FAS-AK per intraperitonealer Injektion. Die Mäuse zeigten nach der Verabreichung dieser subletalen Konzentrationen von Anti-FAS-AK keine evidenten Krankheitssymptome. Wie Abb. 4.13 zu entnehmen ist, löste auch die intraperitoneale Injektion dieser subletalen Anti-FAS-AK-Konzentrationen keine Erhöhung der SAA-Serumspiegel aus. Die in Abb. 4.13 dargestellten SAA-Werte wurden 24 Stunden post injectionem bestimmt. Die SAP-Serumwerte und α 1-AT-Werte zeigten sich nach Verabreichung dieser subletalen Anti-FAS-AK-Konzentrationen ebenfalls unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Wir bestimmten die SAA-Serumkonzentrationen nach $0,1\mu\text{g}$ und $1\mu\text{g}$ Anti-FAS-AK auch zu einem anderen Zeitpunkt post injectionem, nämlich nach 6 Stunden. Hier zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den mit Anti-FAS-AK behandelten und den unbehandelten Balb/c-Mäusen (Daten nicht gezeigt).

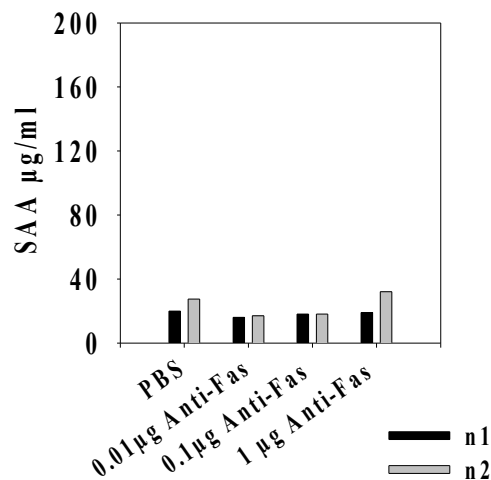


Abb. 4.13: Die i.p. Injektion subletaler Konzentrationen von Anti-FAS-AK (Jo 2, Pharmingen) i.p. führt nicht zu Veränderungen der SAA-Serumspiegel in Balb/c-Mäusen.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Balb/c-Mäusen wurde entweder nur das Lösungsmittel PBS (mit „0“ bezeichnet) oder die in der Abbildung beschriebenen, subletalen Anti-FAS-AK (Jo2/Pharmingen)-Konzentrationen intraperitoneal injiziert. Nach 24 Stunden wurden alle Tiere geopfert. Es wurde zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Tiere der ersten Versuchsreihe werden in der Abbildung mit „n1“, die der zweiten mit „n2“ bezeichnet.

Da zusammenfassend also weder nach Injektionen von letalen noch nach subletalen Konzentrationen von Anti-FAS-Antikörper eine Produktion von SAA und SAP nachgewiesen werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob der FAS-Antikörper auch in unserem Tiermodell funktionell aktiv ist, d.h. ob der Anti-FAS-AK in der Lage ist, den FAS-Liganden (FAS-L) zu imitieren, und apoptotische Veränderungen in der Leber auszulösen.

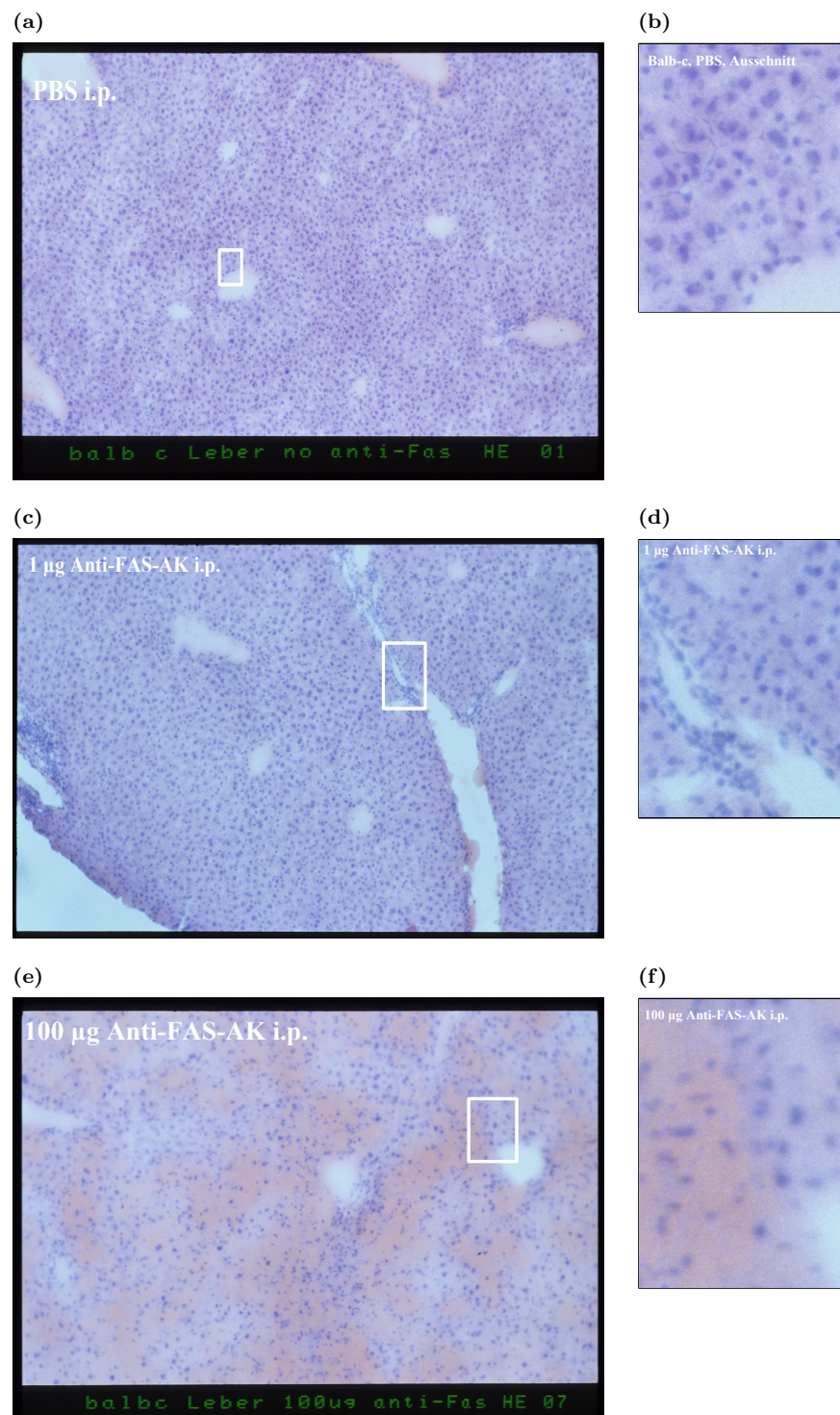


Abb. 4.14: Die i.p.-Injektion von 100 µg Anti-FAS-AK führt zu einer ausgedehnten hepatischen Gewebsdestruktion, während die i.p.-Injektion von 1 µg Anti-FAS-AK keine histologisch nachweisbaren Veränderungen der Leber hervorruft.

Balbc-Mäusen wurde entweder nur das Lösungsmittel PBS, oder die in der Abb. beschriebenen Anti-FAS-AK-Konzentrationen intraperitoneal injiziert. 6 Stunden post injectionem wurden alle so behandelten Tiere getötet und, wie in den Kapiteln 3.7.4 und 3.8 ausgeführt, unverzüglich histologische Präparate der Leber angefertigt, die anschließend fixiert und mit HE gefärbt wurden. In den abgebildeten Abbildungspaaren ist im jeweils links stehenden Bild der Ausschnitt markiert, der im rechts davon befindlichen Bild vergrößert dargestellt wird.

4 Ergebnisse

Um diese Frage zu prüfen, fertigten wir histologische Präparate der Leber von Balb/c-Mäusen an, die entweder 6 Stunden vor ihrem Tod 100 μ g Anti-FAS-AK, 1 μ g Anti-FAS-AK oder nur PBS (Negativkontrolle) erhalten hatten. Bei der Organentnahme fiel bereits auf, daß die Lebern der mit 100 μ g Anti-FAS-AK behandelten Mäuse eine vergleichsweise weiche Konsistenz hatten. In den Abbildungen 4.14a und 4.14b erkennt man, daß die Injektion von PBS keine mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Leberarchitektur hervorruft. Die Verabreichung einer subletalen Konzentration von Anti-FAS-AK (1 μ g pro Maus) ruft ebenfalls keine Veränderungen der Leberhistologie hervor. 6 Stunden nach der intraperitonealen Injektion von 100 μ g Anti-FAS-AK hingegen sieht man eine Destruktion des Leberparenchyms (Abb. 4.14c, 4.14d). In weiten Bereichen erkennt man keine Zellgrenzen mehr. Es finden sich also lysierte Hepatozyten, ihr ausgetretener Zellinhalt färbt sich rot (eosinophil) (vgl. Abb. 4.14f). Man erkennt in den Abbildungen 4.14e und v.a. 4.14f eine Schrumpfung der Zellkerne. Die Kontur dieser geschrumpften Zellkerne wirkt zudem unregelmäßig. Derartige Veränderungen des Zellkerns bezeichnet man als Karyopyknose.

Damit konnte gezeigt werden, daß der hier verwendete Anti-FAS-AK funktionell aktiv ist. Zudem konnten die Resultate der Arbeitsgruppe um Nagata bestätigt werden (OGASAWARA 1993), die erstmalig eben genannte histologische Veränderungen der Leber nach Gabe von Anti-FAS-AK beobachtet hatten.

Trotz der nun bewiesenen Funktionalität des bisher benutzten AK, wurde geprüft, ob die SAA- bzw. SAP-Synthese durch einen anderen, ebenfalls funktionell aktiven Anti-Fas-AK (RMF, Beckman-Coulter) induziert werden kann. Wie zu erwarten, starben Balb/c-Mäuse 6-8 Stunden nach der Injektion von 100 μ g des Anti-FAS/RMF-Antikörpers. Wie aus Abb. 4.15 hervorgeht, vermochte auch dieser „zweite“ Anti-FAS-AK die SAA-Synthese in Balb/c Mäusen nicht zu stimulieren. Die SAP-Synthese konnte durch Anti-FAS-/RMF-Antikörper ebenfalls nicht stimuliert werden (Daten nicht gezeigt).

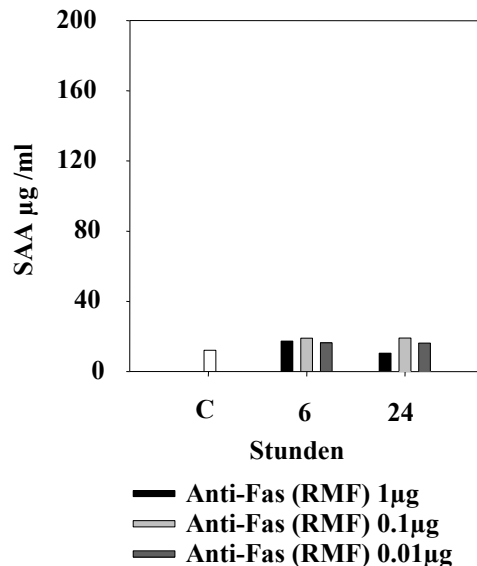


Abb. 4.15: Die i.p. Injektion subletaler Konzentrationen eines weiteren Anti-FAS-AK (RMF, Beckman-Coulter) i.p. führt ebenfalls nicht zu Veränderungen der SAA-Serumspiegel in Balb/c-Mäusen.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Balb/c-Mäusen wurden die in der Abbildung beschriebenen, subletalen Anti-FAS-AK (RMF/Frankreich) -Konzentrationen intraperitoneal injiziert. Nach 6 und 24 Stunden wurden alle Tiere geopfert. Der Maus, die als Negativkontrolle diente, wurde PBS injiziert und diese nach 24 Stunden geopfert (Bezeichnung „C“). Der Versuch wurde nicht repliziert.

Zusammenfassend wird hier erstmals demonstriert, daß die Major-APP der Maus, also SAA und SAP, durch die i.p. Verabreichung subletaler oder letaler Konzentrationen von Anti-FAS-AK nicht beeinflusst werden kann.

4.6 DNS aus *E. coli* induziert die Expression von SAA und SAP *in vivo*

Nun richtete sich das Augenmerk erneut auf die Untersuchung des Mausmodells des Septischen Schocks. Nachdem LPS als Induktor der Akute-Phase-Reaktion verifiziert und SEB als Induktor der SAA- und SAP-Synthese identifiziert werden konnten, sollte nun ein weiterer, potentieller Induktor dieser Akute-Phase-Proteine untersucht werden, nämlich bakterielle DNS. Wie in den Kapitel 1.6 und 1.7 bereits ausgeführt, fanden Sparwasser et al. 1997 heraus, daß bakterielle DNS in, zuvor durch D-Galaktosamin sensibilisierten, Mäusen einen letalen Septischen Schock auslösen kann (SPARWASSER 1997a). Da LPS und SEB als Induktoren eines Septischen Schocks, wie in den Kapitel 4.2 und 4.4 gezeigt, die Synthese von SAA und SAP induzieren, stellte sich nun die Frage, ob bakterielle DNS dazu ebenfalls in der Lage ist. In der wissenschaftlichen Literatur fanden sich hierzu bis zur Veröffentlichung dieser Arbeit keine Angaben.

4.6.1 *E. coli*-DNS induziert die Expression von SAA und SAP

Um dieser Frage nachzugehen, wurde C3H/HeJ Mäusen 100 μ g hochgereinigte DNS aus *E. coli* bzw. PBS (Negativkontrollen) i.p. injiziert und die SAA und SAP-Konzentration 24 Stunden post injectionem bestimmt. C3H/HeJ-Mäuse wurden wegen ihrer Resistenz gegenüber LPS (POLTORAK 1998) als Versuchstiere gewählt, um auszuschließen, daß etwaige Verunreinigungen von Endotoxin die Versuchsergebnisse verfälschen. Wie in Abbildung 4.16 zu erkennen, findet sich 24 Stunden nach Verabreichung der DNS aus *E. coli* ein deutlicher Anstieg der SAA- und SAP-Serumkonzentrationen. Hier wurde erstmalig beschrieben, daß systemisch verabreichte bakterielle DNS eine Akute-Phase-Reaktion *in vivo* auslösen kann.

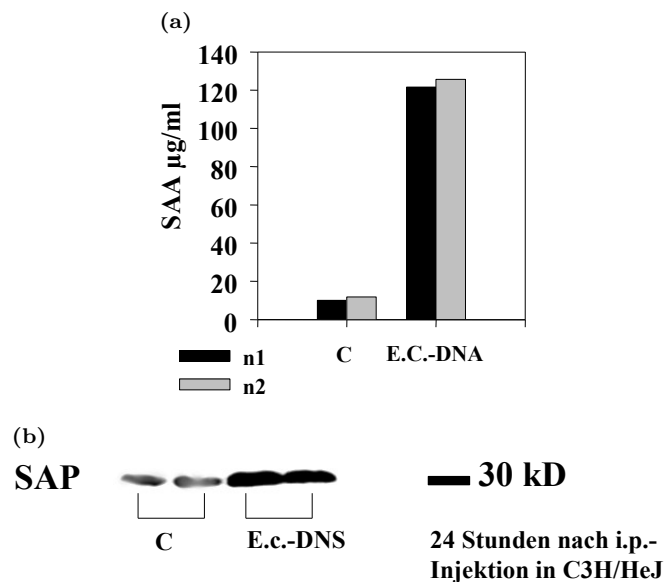


Abb. 4.16: DNS von *E. coli* induziert die Expression von SAA und SAP.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. C3H/HeJ-Mäusen wurde entweder nur das Lösungsmittel, nämlich LPS-freies Wasser (mit „C“ bezeichnet) oder 300 μ g darin gelöste DNS von *E. coli* intraperitoneal injiziert. Nach 24 Stunden wurden die SAA- und SAP-Werte aller Tiere bestimmt. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Die zwei Tiere der ersten Versuchsreihe werden in der Abbildung mit „n1“, die 2 Tiere der zweiten Versuchsreihe mit „n2“ bezeichnet.

4.6.2 CpG-Oligodesoynukleotide (CpG-ODN) induzieren die Synthese von SAA und SAP *in vivo*

Wie in Kapitel 1.7 bereits beschrieben, fanden Sparwasser et al. 1997 in weiterführenden Untersuchungen heraus, daß in Mäuse injizierte synthetische CpG-ODN Makrophagen aktivieren, die wiederum $\text{TNF}\alpha$ liberieren, welches schließlich zum Septischen Schock führt (SPARWASSER 1997a). In dieser Arbeit wurde beschrieben, daß 10nmol eines synthetischen ODN mit einem CpG-Motiv (vgl. Kapitel 1.7), welches „1668“ genannt wurde, in Kombination mit DGal einen Septischen Schock auslösen kann, wohingegen die gleiche Menge eines ODN ohne CpG-Motiv („1720“ genannt), dazu nicht mehr in der Lage ist. In Tabelle 3.9 auf Seite 30 sind die exakten Sequenzen dieser beiden ODN aufgelistet. Man erkennt hier, daß der einzige Unterschied dieser beiden ODN-Sequenzen lediglich in einer Baseninversion liegt, welche zur Zerstörung des CpG-Motivs in ODN 1720 führt: ODN 1720 trägt also das Motiv „GpC“. CpG-ODN sind synthetisch hergestellte DNS-Fragmente, welche im wesentlichen aus der, 1995 als essentiell für die immunstimulatorische Wirkung bakterieller DNS beschriebenen (KRIEG 1995), Konsensussequenz „Pu-Pu-CpG-Py-Py“, bestehen.

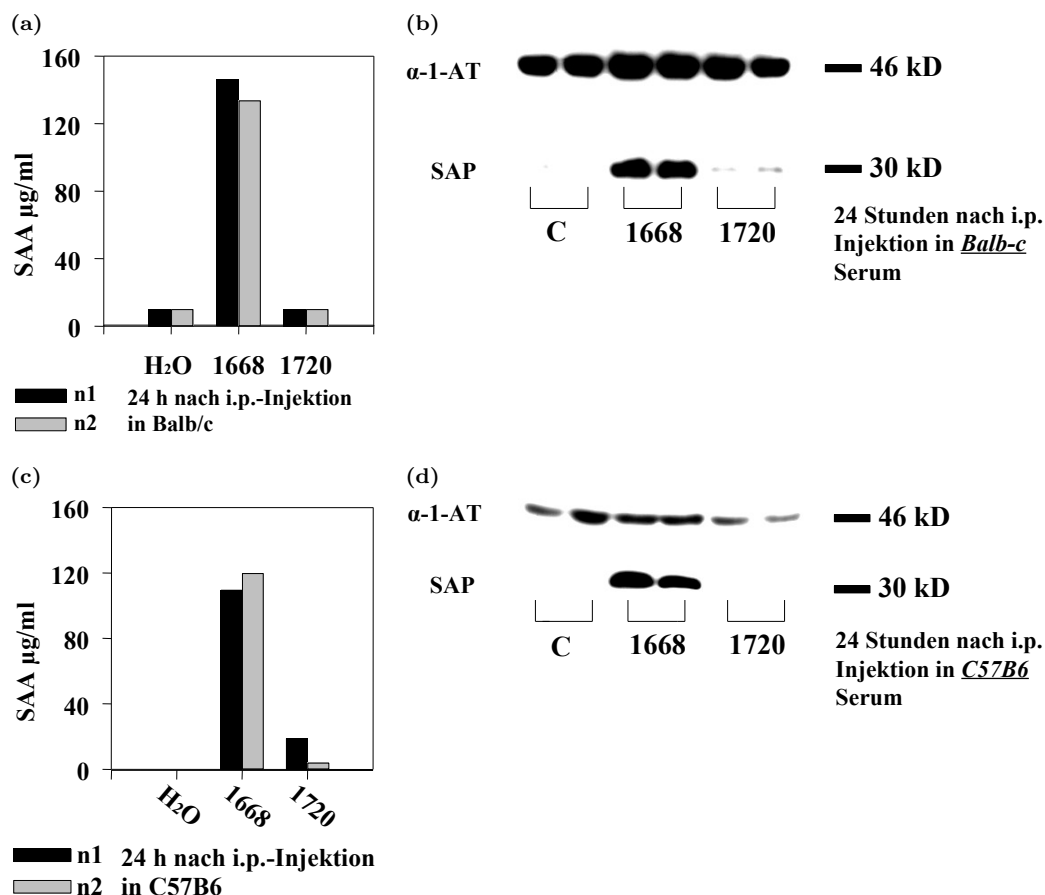


Abb. 4.17: CpG-ODN induzieren die Synthese von SAA und SAP sowohl in Balb/c als auch in C57B/6-Mäusen.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Balb/c-Mäusen (Abb. 4.17a, 4.17b) wurde entweder nur das Lösungsmittel, nämlich LPS-freies steriles Wasser (mit „C“ oder mit „H₂O“ bezeichnet) oder 10nmol ODN (entweder ODN 1668 oder ODN 1720) intraperitoneal injiziert. Nach 24 Stunden wurden die SAA- und SAP-Werte aller Tiere bestimmt. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Die zwei Tiere der ersten Versuchsreihe werden in den Abbildungen 4.17a und 4.17c mit „n1“, die 2 Tiere der zweiten Versuchsreihe mit „n2“ bezeichnet. In den Westernblots sind die Tiere der Gruppen „n1“ abgebildet.

Um herauszufinden, inwieweit dieses CpG-Motiv für die Induktion der Bakterien-DNS vermittelten Akute-Phase-Antwort relevant ist, injizierten wir jeweils 10nmol beider ODN, also 1668 und 1720, in Balb/c-Mäuse und bestimmten 24 Stunden später die SAA- und SAP-Serumkonzentrationen der so behandelten Tiere. Wie aus Abb. 4.17a - 4.17d hervorgeht, ist Interessanterweise nur das ODN 1668 mit der intakten Konsensussequenz in der Lage, die Sythese von SAA und SAP zu stimulieren. Das ODN 1720 hingegen stimuliert die Sythese beider APP nicht. Es wurden zwei verschiedene Wildtyp-Mausstämme (Balb/c und C57B/6) untersucht, um zu zeigen, daß die beobachteten Effekte unabhängig vom Mausstamm sind.

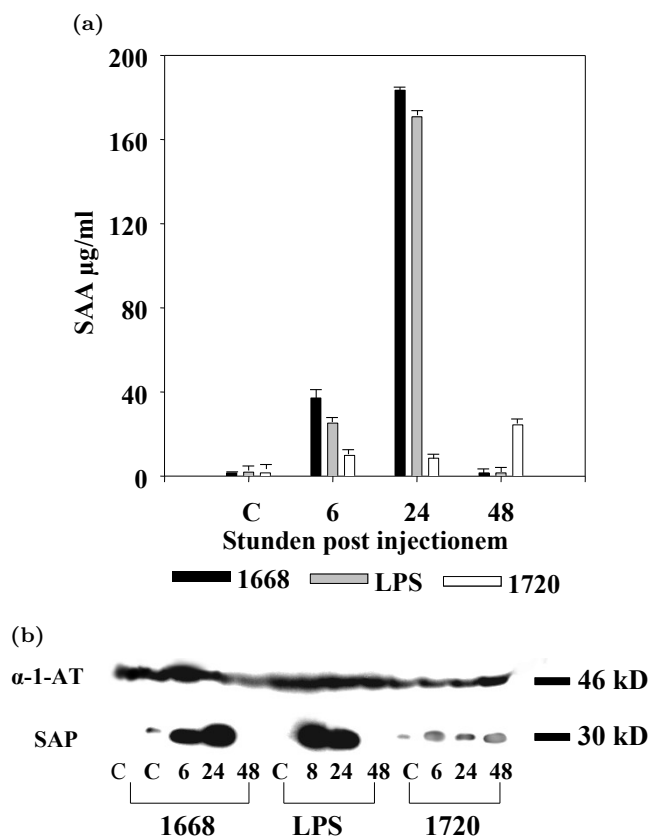


Abb. 4.18: Die Kinetiken der durch CpG-ODN und LPS induzierten SAA- und SAP-Konzentrationen im Serum verlaufen nahezu identisch.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Balb/c-Mäusen wurde entweder nur das Lösungsmittel, nämlich LPS-freies steriles Wasser (mit „C“ bezeichnet) oder 10nmol ODN (entweder ODN 1668 oder ODN 1720) oder 100 μ g LPS intraperitoneal injiziert. Nach 6, 24 oder 48 Stunden wurden die SAA- und SAP-Werte aller Tiere bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die abgebildeten Standardabweichung in der Darstellung der ELISA-Analyse sind signifikant. Bei nahezu identischen Ergebnissen wird nur ein repräsentativer Westernblot abgebildet.

Nachdem also festgestellt werden konnte, daß CpG-ODN in der Lage sind, die Akute-Phase-Antwort der Maus zu stimulieren, sollte als Ergänzung noch die Kinetik der SAA- und SAP-Konzentrationen nach ihrer Induktion durch CpG-ODN (ODN 1668) untersucht und mit der Kinetik eines bekannten Induktors, nämlich LPS, verglichen werden. Hierzu wurden Balb/c-Mäusen entweder 100 μ g LPS, 10nmol ODN 1668, 10nmol ODN 1720 oder das Lösungsmittel dieser Substanzen (gereinigtes H₂O - Negativkontrolle) intraperitoneal injiziert. Wie aus den Abbildungen 4.18a und 4.18b hervorgeht, besteht weder zwischen dem Verlauf der Kinetiken noch zwischen dem Ausmaß der SAA- bzw. SAP-Synthese beider Induktoren, also ODN 1668 und LPS, kein wesentlicher Unterschied: Das Maximum der SAA- und SAP-Spiegel lag sowohl nach Induktion durch LPS als auch nach Induktion durch 1668 ODN, in dem hier verwendeten Experimentalaufbau, bei 24 Stunden. Die Konzentrationen beider APP waren, unabhängig von ihrem Induktor,

4 Ergebnisse

48 Stunden post injectionem wieder auf ihren Ausgangswert abgefallen. Der abgebildete Nachweis der α 1-AT-Konzentrationen diente erneut als Kontrolle der Proteinmenge und zeigt, daß die erhöhten SAP-Serumkonzentrationen nicht durch erhöhte Gesamtproteinmengen verursacht werden. Ferner wird hieraus ersichtlich, daß CpG-ODN, wie die bisher untersuchten Induktoren von SAA und SAP, ebenfalls nicht in der Lage sind, die Expression von α 1-AT zu induzieren.

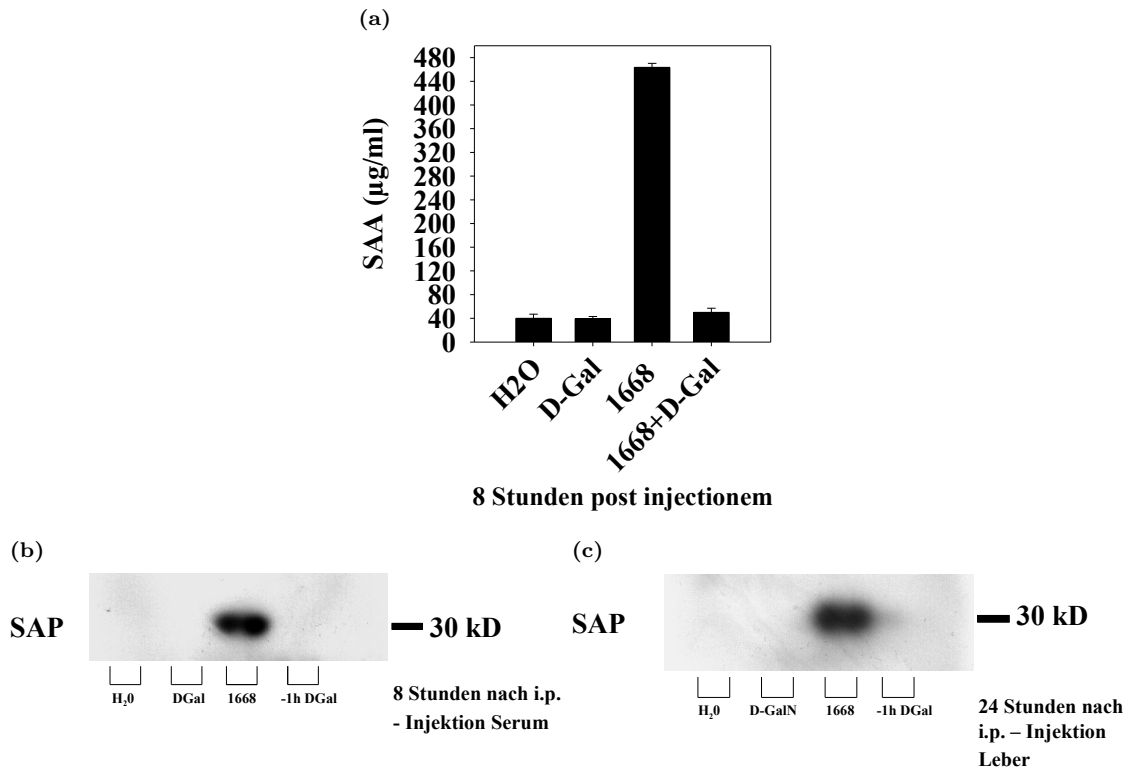


Abb. 4.19: DGal blockiert CpG-ODN (1668)- induzierte SAA und SAP-Synthese.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. Balb/c-Mäusen wurde entweder nur das Lösungsmittel, nämlich LPS-freies steriles Wasser (mit „H₂O“ bezeichnet) oder 10nmol ODN (entweder ODN 1668 oder ODN 1720) oder 100µg LPS intraperitoneal injiziert. Nach 8 Stunden wurden die SAA-Serumkonzentrationen sowie die SAP-Serum (4.19b) - und Leberkonzentrationen (4.19c) aller Tiere bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die abgebildeten Standardabweichungen (Standardabweichungen des Mittelwerts (±SE)) der Ergebnisse der SAA-ELISA-Analyse sind signifikant. Bei nahezu identischen Ergebnissen wird von der Serum- und der Leberhomogenisatanalyse jeweils nur ein repräsentativer Westernblot abgebildet.

Vor dem Hintergrund, daß CpG-ODN gemeinsam mit DGal einen letalen murinen Septischen Schock auslösen können, wurde schliesslich noch geprüft, ob die CpG-induzierte SAP- und SAA-Expression, wie die LPS- und TNF α -induzierte auch (vgl. Abb. 4.1 und 4.2), vollständig durch D-Gal zu blockieren ist bzw. ob sich Hinweise für eine suffiziente, CpG-induzierte extrahepatische Synthese von SAP finden. Letzteres ist, wie aus den Abbildungen 4.19a und 4.19b ersichtlich, nicht der Fall, d.h. auch hier kann nach der Kombinationsbehandlung bestehend aus CpG-ODN und DGal kein Anstieg der SAA- bzw. SAP-Serumspiegel nachgewiesen werden, womit sich also keine Hinweise auf eine suffiziente kompensatorische extrahepatische Synthese von SAA und SAP fanden. In Abb. 4.19c erkennt man, daß die kombinierte Verabreichung von CpG-ODN 1668 und DGal, wie erwartet, die hepatische SAP-Synthese vollständig blockiert. Die Mäuse, die CpG-ODN 1668 und DGal erhalten hatten, starben spätestens 9 Stunden nach der Injektion von ODN 1668. Daher wurden die SAA- und SAP-Werte bei allen Mäusen, also sowohl die Negativkontrollen, als auch die mit ODN 1668 bzw. kombiniert mit ODN 1668/DGal behandelten Tieren, 8 Stunden post injectionem geopfert.

4.6.3 Die CpG-ODN-vermittelte Induktion der Synthese von SAA und SAP ist unabhängig vom TNFRp55

Wie bereits in Kapitel 4.6.2 zitiert, publizierten Sparwasser et al. 1997, daß der durch die Kombination aus CpG-ODN und DGal induzierte Septische Schock im wesentlichen durch die Induktion der TNF verursacht wird (SPARWASSER 1997b).

Da bisher die Fähigkeit von CpG-ODN, Akute-Phase-Proteine zu induzieren, nicht bekannt war, war ebenfalls unbekannt, ob die CpG-ODN-induzierte Synthese der Akute-Phase-Proteine abhängig vom TNFRp55 ist. Um dieses herauszufinden, wurde TNFRp55^{-/-}-Mäusen entweder 100µg LPS oder 10nmol ODN 1668 bzw. ODN 1720 intraperitoneal injiziert. In den Abbildungen 4.20a und 4.20b erkennt man, daß TNFRp55^{-/-}-Mäuse 24 Stunden nach der Verareicherung des CpG-ODN 1668 eine deutliche Induktion der Synthese von SAA (Abb. 4.20a) und SAP (Abb. 4.20b) aufweisen. Somit wird deutlich, daß auch die CpG-ODN-induzierte Synthese von Akute-Phase-Proteinen (APP) unabhängig von TNFRp55 ist.

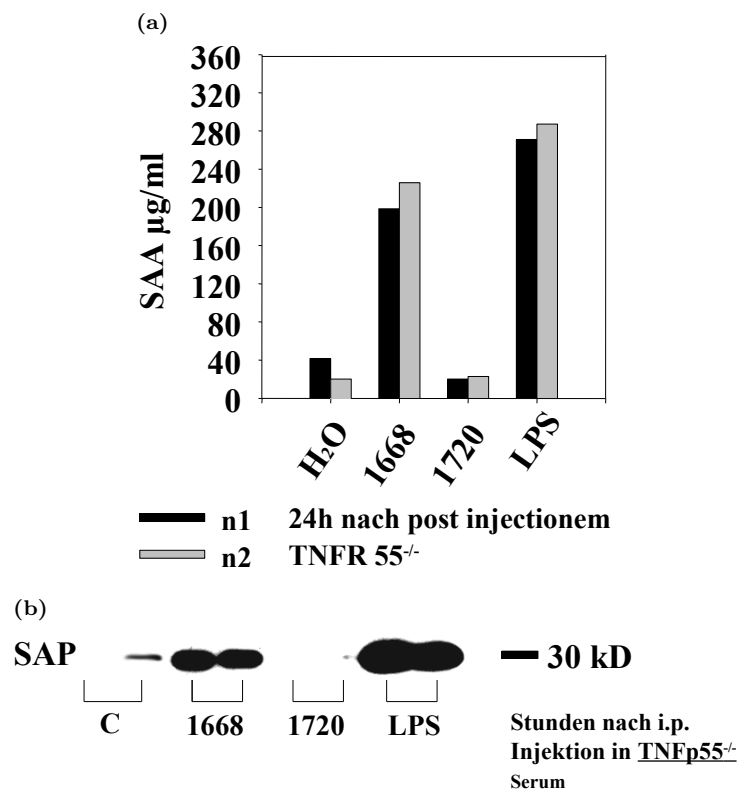


Abb. 4.20: Die CpG-ODN vermittelte Induktion von SAA und SAP ist unabhängig vom TNFRp55.

Probengewinnung und Versuchsaufbau erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben. TNFRp55^{-/-}-Mäusen wurde entweder nur das Lösungsmittel, nämlich LPS-freies steriles Wasser (hier mit „H₂O“ bezeichnet) oder 10nmol ODN (entweder ODN 1668 oder ODN 1720) oder 100µg LPS intraperitoneal injiziert. Nach 24 Stunden wurden die SAA- und SAP-Werte aller Tiere bestimmt. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Tiere der ersten Versuchsreihe werden in den Abbildungen 4.20a und 4.20b mit „n1“, die Tiere der zweiten Versuchsreihe mit „n2“ bezeichnet. In den Westernblots sind die Tiere der Gruppen „n1“ abgebildet.

5 Diskussion

5.1 Die Kinetiken der SAA-, SAP- und α 1-AT-Konzentrationen in Serum und Leber

5.1.1 Der Verlauf der Kinetiken der SAA- und SAP-Serum- bzw. Leberkonzentrationen ist unabhängig vom Induktor der SAA- bzw. SAP-Expression.

Vorangestellt werden muß diesem Kapitel, daß in dieser Arbeit über die relative Potenz der jeweiligen SAA- und SAP-Induktoren keine Aussage gemacht werden kann, da bei diesen untersuchten Induktoren unterschiedliche „Ladungsdosen“ pro Gramm Körpergewicht der Maus gewählt wurden: Beispielsweise kann anhand des Vergleichs der SAA-Serumkonzentrationen zweier Mäuse, von der die eine 100 μ g LPS (bspw. Abb. 4.1) und die andere lediglich 500ng IL-6 (vgl. Abb.4.4) erhalten hat, keine Aussage darüber gemacht werden, ob IL-6 oder LPS der jeweils potentere Induktor der SAA-Synthese ist. Die Verwendung solch unterschiedlicher Ladungsdosen resultierte aus Erfahrungswerten des Labors bzw. aus bereits publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen.

Vergleicht man die Abbildungen 4.1 - 4.3, 4.7, 4.16 und 4.18 wird deutlich, daß der Verlauf der Kinetiken der SAA- bzw. SAP-Serum- und Leberkonzentrationen im Mausmodell des Septischen Schocks unabhängig von Art und Menge des jeweiligen Induktors der SAA- bzw. SAP-Expression, und ferner auch unabhängig vom Mausstamm, ist. Eine derartige systematische Untersuchung der Kinetiken dieser beiden Proteine fand sich bislang in der Literatur nicht.

Alle, hier diesbezüglich untersuchten, bekannten Induktoren der SAA- und SAP-Synthese, also TNF α , IL-1 β , und LPS sowie die im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierten Induktoren, nämlich bakterielle DNS bzw. CpG-ODN und SEB, induzieren nach einmaliger intraperitonealer Instillation einen nahezu identischen Verlauf der SAA- und SAP-Konzentrationen in Serum und Leber der Maus. Wie aber können so verschiedenartige Induktoren eine solche Gleichförmigkeit der SAA- bzw. SAP-Kinetiken hervorrufen? Prinzipiell hängt die Kinetik der Konzentration eines Proteins von Geschwindigkeit und Ausmaß seiner Synthese sowie der Geschwindigkeit seines Abbaus ab. Offenbar beeinflussen alle hier identifizierten Induktoren die Synthese sowie die Degradation von SAA bzw. SAP auf eine sehr ähnliche Weise. Da die Synthese von SAA und SAP einer bedeutend stärkeren Regulation unterliegt, als ihr Abbau (Kapitel 1.8), kann man von der hier präsentierten Gleichförmigkeit ihrer Kinetiken, auf eine Gleichförmigkeit der, durch die verschiedenartigen Induktoren aktivierten, expressionsfördernden Signaltransduktionskaskaden schließen. In anderen Worten bedeutet das, daß man aus der Uniformität des Verlaufs aller SAA- und SAP-Kinetiken die Hypothese

ableiten kann, daß alle im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Induktoren der SAA- bzw. SAP-Synthese, ähnliche, wenn nicht gar streckenweise identische, Signaltransduktionskaskaden auf ihrem Weg zur Induktion der Proteinsynthese nutzen. Um diese Signaltransduktionskaskaden näher zu beleuchten, wurden drei Mitglieder der TNF/TNF-Rezeptor-Superfamilie ausgewählt und hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Regulation der Akute-Phase-Proteine $\alpha 1$ -AT, SAA und SAP untersucht, wie im Kapitel 5.3 diskutiert werden wird.

Durch Modifikation des bereits 1979 von Galanos etablierten DGal-Schockmodells (vgl. Kapitel 1.6 und 4.2.1) gelang es hier also, ein Mausmodell zur Untersuchung der Regulation der Akute-Phase-Proteine SAA, SAP sowie $\alpha 1$ -AT im Septischen Schock zu etablieren und gleichzeitig die Kinetiken der bereits bekannten Induktoren LPS, TNF, IL-1 β und IL-6 zu ermitteln. Interessanterweise scheinen die Kinetiken der Akute-Phase-Proteine in unterschiedlichen Spezies unterschiedlich zu verlaufen, bspw. weisen Rentiere nach LPS-Administration erst nach 48 Stunden die maximale SAA-Serumkonzentration auf (ORRO 2004).

Wie im Kapitel 1.6 ausgeführt, ist das Krankheitsbild des Septischen Schocks des Menschen u.a. durch ein prolongiertes Einwirken über Tage und ggf. Wochen, der sich im betroffenen Organismus zunächst ständig vermehrenden, Bakterien gekennzeichnet. Wie auch aus dem klinischen Alltag, bspw. von der CRP-Bestimmung zur Beurteilung eines Infektionsverlaufs bekannt ist, korrelieren die Spiegel der Haupt-APP mit der Krankheitsaktivität.

Diese Korrelation zeigt auch eine kürzlich erschienene Arbeit über, mit *Mycobacterium tuberculosis Erdman* infizierte, Mäuse, die 3 Wochen post inoculationem die höchsten SAP-Serumspiegel aufwiesen, wobei die SAP-Spiegel in der Akutphase der Infektion stets mit der Bakterienmenge korrelierten (SINGH 2005). Dieser Aspekt des, für eine systemische Infektion charakteristischen, prolongierten Einwirkens der Pathogene, wird in dem hier etablierten Mausmodell nicht berücksichtigt. Außerdem weist ein pathogener Bakterienstamm in der Regel nicht nur ein Toxin, sondern eine Reihe von Virulenzfaktoren auf: Bspw. kann ein *Staphylococcus aureus*-Stamm, der SEB produziert, Virulenzfaktoren wie Katalase, Hämolysin, Protein A, und viele mehr besitzen, die jeweils eine Fülle unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden im infizierten Organismus aktivieren (ARCHER 1998). Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem humanen und dem, hier untersuchten, experimentellen murinen Modell des Septischen Schocks besteht darin, daß Menschen viel sensibler auf Endo- bzw. Enterotoxine reagieren, als Mäuse (YEUNG 1996), weshalb den hier untersuchten Mäusen, zur Sensibilisierung gegenüber den bakteriellen Toxinen, das hepatotoxische DGal verabreicht werden mußte, um überhaupt ein, mit dem humanen Septischen Schock vergleichbares, murines Krankheitsbild auslösen zu können.

Somit spiegelt das in dieser Arbeit verwendete „Mausmodell des Septischen Schocks“ natürlich nur isolierte Teilaspekte des humanen Septischen Schocks wider.

Weiterführende Experimente ergaben, daß IL-1 β und TNF α in der Lage sind, Akute-Phase-Proteine, hier im Speziellen SAA und SAP, *in vivo* dosisabhängig zu induzieren (Abbildungen 4.5 und 4.6). Als weitere neue Erkenntnis ist der hier vorliegenden Arbeit zu entnehmen, daß SEB ebenfalls in der Lage ist, die Synthese von SAA und SAP *in vivo* zu stimulieren (Abb. 4.7). In Anbetracht der Tatsache, daß die systemische Verabreichung von SEB den raschen Anstieg der Serumspiegel des proinflammatorischen Zytokins TNF bewirkt (MIETHKE 1992b), war dieser Befund zwar zu erwarten, wurde aber bislang noch nicht veröffentlicht.

5.1.2 Die Regulation der Synthese des murinen α 1-AT.

Wie unter 4.1 ausgeführt, wurde in einigen Experimenten zusätzlich α 1-AT zur Kontrolle der Gesamtproteinmenge bestimmt. α 1-AT wird zum überwiegenden Teil in der Leber, und zu einem sehr geringen Teil auch in PBMC und Alveolarmakrophagen, synthetisiert. Anhand von Zellkulturstudien konnte gezeigt werden, daß die Administration von LPS die Synthese von α 1-AT zwar in humanen isolierten PBMC, nicht jedoch in Leberzellen, anregen kann (RAY 1995). IL-6 ist der Hauptinduktor der α 1-AT-Synthese im Menschen. Während der Akute-Phase-Reaktion kann sich die Konzentration des, zu den Akute-Phase-Proteinen zählenden, α 1-AT, im Menschen allerhöchstens verdreifachen. Somit ist die α 1-AT-Synthese nicht annähernd so stark reguliert wie die Synthese der Haupt-APP CRP, bzw. SAP, und SAA (STEEL 1994).

Über die Regulation der Synthese des murinen α 1-AT ist hingegen, außer daß diese durch Hyperthermie-Schock nicht beeinflusst werden kann (YIANGOU 1998), kaum etwas bekannt. Mittels eines, in dieser Arbeit nicht als Abbildung präsentierten, initialen kleinen Satzes von Experimenten konnte hier herausgefunden werden, daß sich nach intraperitonealer Instillation von $100\mu\text{g}$ LPS nach 6, 12, 16, 24 und 48 Stunden jeweils *keine* Veränderungen der Serumkonzentrationen der Akute-Phase-Proteine α 1-Glycoprotein und α 1-AT zeigen. Das durch LPS induzierte IL-6 reicht in der Maus also offenbar nicht aus, um die α 1-AT-Synthese in der Leber bzw. den murinen PBMC nach einmaliger Instillation von LPS zu fördern. Wir beschlossen daraufhin, α 1-AT als Kontrolle der Gesamtproteinmenge, also als sogenannte Beladungskontrolle, mitzuführen. An sich ist eine solche Kontrolle bei der Bestimmung von Serumparametern, nicht zwingend erforderlich, da die Gesamtproteinmenge des Serums einer außerordentlich geringen interindividuellen Varianz unterliegt (s. Kapitel 4.1), doch auf diese Weise konnte hier, sozusagen nebenbefundlich, die bislang nicht erforschte Regulation des murinen α 1-AT im Mausmodell des Septischen Schocks untersucht werden.

Aus den Abbildungen 4.9, 4.10 und 4.12b geht hervor, daß sich die α 1-AT-Serumkonzentrationen sich weder durch i.p.-Injektion des Endotoxins LPS noch des Enterotoxins SEB beeinflussen lassen. Auch die i.p.-Administration von CpG-DNS ruft innerhalb von 48 Stunden post injectionem weder in Balb-c- noch in C57B/6-Mäusen Veränderungen ihrer α 1-AT-Serumkonzentrationen hervor (Abb 4.4b und 4.4c). Die Halbwertszeit von α 1-AT im menschlichen Plasma wird in der Literatur unterschiedlich beziffert - nämlich zwischen 4,5 Tagen (BRANTLY 1988) und 8 Tagen (VANHOVE 2003). Die Halbwertszeit des murinen α 1-AT im murinen Plasma ist hingegen auf jeden Fall deutlich kürzer, da hier bestimmte glykosilierte Seitenketten fehlen, und liegt sowohl in gesunden Mäusen, als auch in Mäusen, die sich in der Akute-Phase-Reaktion befinden, jeweils bei etwa 4 Stunden (NATHOO 1986, VANHOVE 2003). Die α 1-AT-Serumkonzentrationen wurden 6 Stunden nach Instillation von $10\mu\text{g}$ bzw. $100\mu\text{g}$ Anti-FAS-AK gemessen: Wie aus den Abb. 4.12a und 4.12b hervorgeht, findet sich weder eine Steigerung noch eine Reduktion der α 1-AT-Serumspiegel. Da die Plasmahalbwertszeit von α 1-AT in der Maus bei etwa 4 Stunden liegt, ist aus den, in diesen Abbildungen, präsentierten Experimenten nicht eindeutig abzuleiten, ob Anti-FAS-AK 6 Stunden nach seiner Verabreichung, also kurz vor dem Tode der so behandelten Mäuse, bereits eine Blockade der α 1-AT-Synthese bewirkt hat oder nicht. Zudem ist bis dato noch nicht geklärt, ob der Abbau des α 1-AT hauptsächlich in der Leber erfolgt. Wäre dieses der Fall, könnten die unveränderten α 1-AT-Serumkonzentrationen nach systemischer Applikation von Anti-FAS-AK sich auch durch eine Hemmung seiner hepatischen Degradation durch die hepatotoxische Wirkung von Anti-FAS-AK erklären lassen.

Sicher ist jedoch, daß *subletale* Konzentrationen von Anti-FAS-AK keinen Einfluß auf die α 1-AT-Synthese in der Maus haben, da die α 1-AT-Serumspiegel der damit behandelten Tiere auch 24 Stunden post injectionem keine Veränderungen aufwiesen (vgl. Kapitel 4.5).

Zusammenfassend wurde hier erstmalig der Verlauf der murinen α 1-AT-Serumkonzentration nach Injektion von LPS, SEB, CpG-DNS und Anti-FAS-AK untersucht und beschrieben, daß all diese Substanzen nach einmaliger i.p.-Instillation im Mausmodell *keine* Veränderungen der α 1-AT-Serumkonzentrationen hervorrufen. Zudem liegt α 1-AT in der gesunden, also nicht stimulierten Maus, in einer deutlich höheren Serumkonzentration als SAA und SAP vor. Wie aus den Abbildungen 4.8 und 4.11 hervorgeht, fand sich nebenbefundlich bei der Analyse der Auswirkung des TNFRp55 und des LTR β auf die SAA- bzw. SAP-Synthese, daß die konstitutive Synthese von α 1-AT durch das Fehlen der beiden eben genannten Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie nicht beeinträchtigt wird. α 1-AT ist im Gegensatz, zu den durch LPS, SEB, und CpG-DNS induzierbaren SAA und SAP, eine Akute-Phase-Protein der Klasse 2. Interessant wäre herauszufinden, ob sich die α 1-AT-Synthese durch einen lokalen Stimulus der APR, wie bspw. Terpentin, in der Maus stimulieren ließe, da viele regulatorische Unterschiede zwischen der lokalen- und der systemisch-induzierten APR beschrieben sind (vgl. Kapitel 1.8).

5.2 Die suffiziente Synthese von Akute-Phase-Proteinen ist möglicherweise für das Überleben der Maus im Endo- bzw. Enterotoxinschock von essentieller Bedeutung.

Wie eben ausgeführt, reagieren Menschen viel sensibler auf Endo- bzw. Enterotoxine als Mäuse (YEUNG 1996), weshalb den hier untersuchten Mäusen, zur Sensibilisierung gegenüber den bakteriellen Toxinen, das hepatotoxische DGal verabreicht wurde, um überhaupt ein, mit dem humanen Septischen Schock vergleichbares, murines Krankheitsbild auslösen zu können. Galaktosamin wird in erster Linie von Hepatozyten aufgenommen und unter Verbindung mit Uracil-Nukleotiden verstoffwechselt. Dadurch kommt es zu einem selektiven Mangel an Uridylat (Uridinmonophosphat)-Verbindungen in der Leber und nachfolgend zu einer Inhibition der Transkription bzw. der Translation, was eine unspezifische Reduktion der Produktion hepatisch synthetisierter Proteine zur Folge hat (KMIEC 1994). Dieser DGal-vermittelte Transkriptionsarrest ist für die LPS- bzw. TNF-vermittelte, letztendlich letale, Induktion der hepatozellulären Apoptose zwingend erforderlich (LEIST 1994). TNF α bzw. der TNFRp55 sind seit längerem als Hauptmediatoren dieser letalen Wirkung von DGal/LPS bekannt (TIEGS 1989, NOWAK 2000).

Es ist bereits publiziert worden, daß der IL-1-vermittelte Anstieg der murinen Serum-SAA-Spiegel 8 Stunden nach der Administration von DGal vollständig blockiert werden kann (VOGELS 1993). Wie aus Abb. 4.3a hervorgeht, konnten wir diese Ergebnisse bestätigen und können ergänzen, daß die SAA-Serumspiegel 24 Stunden nach der kombinierten IL-1 β /DGal Behandlung wieder leicht ansteigen. Zudem konnten wir demonstrieren, daß DGal einerseits erwartungsgemäß zwar die hepatische Synthese des IL-1 β -induzierten SAP blockieren kann (Abb. 4.3c), jedoch interessanterweise andererseits dadurch nur einen unwesentlichen Absinken des SAP-Serumspiegels verursacht (Abb. 4.3b). Letzteres weist darauf hin, daß das im Serum nachgewiesene, durch IL-1 β stimulierte, SAP extrahepatisch synthetisiert worden sein muß. SAP wird beim Menschen anscheinend ausschließlich in der Leber synthetisiert (INTRONA 1996). In lediglich einer Publikation fanden sich Angaben zur Expression von SAP in der Maus: In dieser Arbeit von Marhaug et al. konnte mittels mRNS-Hybridisierung keine extrahepatische Expression des murinen SAP in der Niere, Lunge, Darmmukosa, in den Testes oder den Ovarien festgestellt werden (MARHAUG 1997). In Anbetracht der, im Rahmen dieser Arbeit erhobenen, Befunde, die eindeutige Hinweise auf eine extrahepatische Expression von SAP liefern, sollten ergänzende, systematische Untersuchungen zur Exploration der extrahepatischen SAP-

Synthese in der Maus unternommen werden. Für SAA sind hingegen murine extrahepatische Syntheseorte beschrieben worden - Marhaug et al. fanden SAA-mRNS in Darm und Niere der Maus (MARHAUG 1997). Es ist vorstellbar, daß genau diese Fähigkeit der Mäuse, 24 Stunden nach der Verabreichung von DGal und $1\mu\text{g}$ IL- 1β , SAP, und ggf. noch andere APP, synthetisieren zu können, wesentlich zu ihrem Überleben beigetragen haben könnte. IL- 1β ist die einzige aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Substanzen, die, jedenfalls in der Dosierung von $1\mu\text{g}$, in Kombination mit DGal keine tödlichen Auswirkungen für die so behandelten Mäuse hatte. Die Verabreichung von IL- 1β stimuliert die TNF-Synthese *in vivo* (IKEJIMA 1990), jedoch, in Anbetracht der fehlenden letalen Auswirkung der kombinierten DGal/ $1\mu\text{g}$ IL- 1β Instillation, offenbar in vergleichsweise geringem Ausmaß. Einige Stunden nach der jeweiligen gemeinsamen Verabreichung von LPS/DGal, TNF/DGal, SEB/DGal sowie CpG-DNS/DGal starben die Mäuse hingegen. Der rasch eintretende Tod der so behandelten Tiere erklärt sich im wesentlichen aus dem Serumspiegelanstieg von TNF, der, wie den Kapiteln 1.4, 1.5 und 1.6 zu entnehmen ist, nicht nur nach der Verabreichung von LPS, sondern auch nach der intraperitonealen Instillation von SEB und CpG-DNS nachgewiesen werden konnte und, nach erfolgter Induktion eines Transkriptionsarrests durch DGal eine Apoptose der Leberzellen verursacht.

Wie den Abbildungen 4.1a, 4.7c und 4.19c zu entnehmen ist, findet sich 6 Stunden nach der kombinierten Behandlung mit DGal und entweder LPS, SEB oder CpG-DNS, die jeweils zu erwartende Blockade der hepatischen SAP-Synthese, wobei sich in diesen Fällen keine Hinweise für eine kompensatorische extrahepatische SAP-Synthese zeigten und alle so behandelten Mäuse starben. Diese Ergebnisse unterstützen, in Zusammenschau mit dem bereits diskutierten Resultat, daß IL- 1β /DGal-behandelte Mäuse überleben und gleichzeitig zur kompensatorischen extrahepatischen SAP-Synthese in der Lage sind, die Hypothese, daß die DGal-medierte Blockade der Synthese der Akute-Phase-Proteine ursächlich wesentlich zum Eintreten des raschen Todes der, mit DGal und einem TNF-Induktor behandelten, Versuchstiere beiträgt. Dieses bedeutet im Umkehrschluss, daß die Administration von Akute-Phase-Proteinen in diesem Mausmodell protektiv bzw. eventuell gar lebensrettend wirken könnte. In der Literatur finden sich einige Arbeiten, die diese Hypothese stützen: 1994 wurde berichtet, daß Mäuse durch Verabreichung eines anderen Akute-Phase-Proteins, nämlich $\alpha 1$ -Glykoprotein, vor dem Tod durch per se letale Konzentrationen an TNF bzw. einer DGal/TNF-Kombinationsbehandlung, geschützt werden konnten (LIBERT 1994). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte 2 Jahre später, daß Mäuse, einen, per se letalen, TNF/DGal-Schock überleben können, wenn ihnen 2 Stunden vor der Verabreichung dieser letalen Substanzkombination, $\alpha 1$ -AT parenteral verabreicht worden war (LIBERT 1996). Vogels et al. publizierte 1993, daß eine Vorbehandlung mit IL-1 Mäuse vor den Auswirkungen einer instillierten letalen DGal/LPS-Kombination schützen könne (VOGELS 1993).

In Anbetracht dieser Auswahl an Publikationen und der unmittelbar zuvor diskutierten Ergebnisse ist der Einsatz von Akute-Phase-Proteinen zur lokalen oder gar systemischen Behandlung von Infektionen denkbar, wie im Kapitel 5.6 noch ausführlicher diskutiert werden wird.

Die Instillation einer DGal/TNF-Induktor-Kombination induziert in den so behandelten Mäusen einen fulminanten Leberschaden, der wesentlich, wenn nicht gar hauptsächlich, für den rasch nach dieser Behandlung eintretenden Tod der Tiere verantwortlich ist. Die hier diskutierten Daten unterstützen zusammenfassend die Hypothese, daß der durch diesen Leberschaden verursachte Mangel an Akute-Phase-Proteinen ätiopathogenetisch in wesentlichem Ausmaß am raschen Eintritt des Todes der, mit DGal/TNF-Induktor-Kombinationen behandelten, Tiere beteiligt ist und im Umkehrschluß die Administration von Akute-Phase-Proteinen sich protektiv für den an einer Sepsis leidenden Organismus auswirken könne. Nun verursacht die kombinierte Administration von DGal und einem TNF-Induktor nicht nur eine Syntheseblockade der

Akute-Phase-Proteine, sondern einen Stillstand der Produktion *aller* hepatisch synthetisierten Proteine. Damit kann anhand der hier vorliegenden Experimente keine Aussage darüber getroffen werden, in welchem Ausmaß die Syntheseblockade anderer Proteine bzw. die Leberdestruktion per se, also die durch diese hervorgerufenen Änderungen der Homöostase, an der Herbeiführung des raschen Todes der kombiniert mit DGal und einem TNF-Induktor behandelten Tiere beteiligt sind. Bspw. ist es vorstellbar, daß der Ausfall der Synthese von Gerinnungsfaktoren in erheblichem Ausmaß zum raschen Eintritt des Todes der Mäuse beitragen könnte - dagegen spricht jedoch, daß sich bei der Sektion der verstorbenen Tiere an keinem ihrer Organe makroskopisch erkennbare Mikro- bzw. Makrohämorrhagien fanden.

5.3 Die Rezeptoren TNFRp55 und $LT\beta$ sind für die Endo- bzw. Enterotoxin-vermittelte Induktion der Akute-Phase-Proteine SAA und SAP im Septischen Schock entbehrlich.

Wie in Kapitel 5.1.1 erwähnt, kann man aus der hier präsentierten Uniformität des Verlaufs aller SAA- und SAP-Kinetiken die Hypothese ableiten, daß alle im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Induktoren der SAA- bzw. SAP-Synthese, ähnliche, wenn nicht gar streckenweise identische, Signaltransduktionskaskaden auf ihrem Weg zur Induktion der Proteinsynthese nutzen. Wesentliche Bestandteile dieser Signaltransduktionskaskaden stellen, wie in Kapitel 1.8 ausgeführt ist, die Zytokine IL-6, IL-1 und TNF dar. Diese proinflammatorischen Zytokine spielen eine Hauptrolle bei der Induktion von Akute-Phase-Proteinen und regulieren sich gegenseitig, wie in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt ist (CECILIANI 2002).

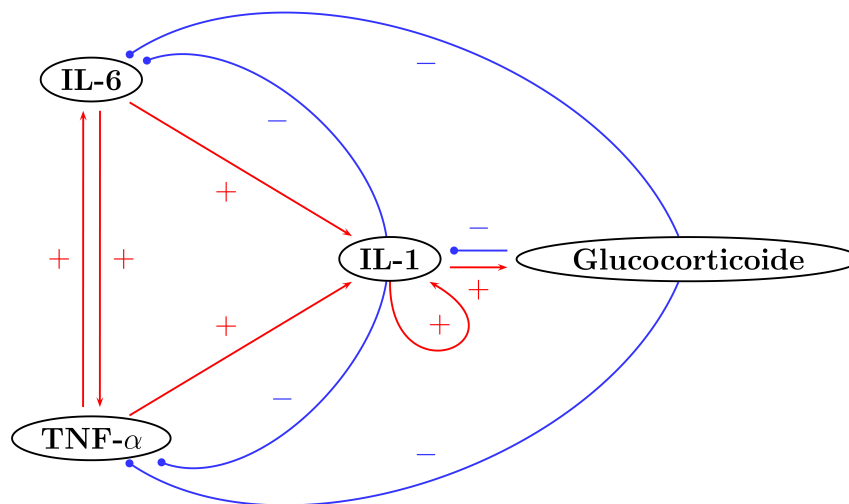


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Regulation der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und $TNF\alpha$ – modifiziert nach Ceciliani et al. (CECILIANI 2002)

Wie auch aus den Abbildungen 4.1 bis 4.3 hervorgeht, können SAP und SAA sowohl durch IL-1, IL-6 und TNF induziert werden, was auf ihre Zugehörigkeit zu den Klasse 1-APP hinweist (vgl. Kapitel 1.8.1). Es wurde bereits gezeigt, daß $IL-1\beta^{-/-}$ -Mäuse sowie $TNF\alpha^{-/-}$ -Mäuse nach LPS-Administration keine, $IL-6^{-/-}$ -Mäuse eine allenfalls diskrete, Beeinträchtigung ihrer SAA-Synthese aufweisen (FATTORI 1994, FANTUZZI 1996, MARINO 1997). $IL-6^{-/-}$ -Mäuse produzieren jedoch nach LPS-Instillation drei Mal mehr $TNF\alpha$ als der entsprechende Wildtyp (FATTORI 1994). Diese Arbeiten deuten zusammenfassend darauf hin, daß weder $IL-1\beta$, noch $IL-6$, noch $TNF\alpha$ für die Sythese von Klasse1-APP zwingend erforderlich

sind, sondern daß im Falle einer Dysfunktion eines dieser drei Zytokine, ein anderes Zytokin dieser Gruppe einspringen kann, um die Synthese der APP zu gewährleisten.

IL-1, IL-6 und TNF binden an spezifische Rezeptoren jeweils gleichen Namens. TNF bindet also an den sogenannten TNF-Rezeptor, der aus dem TNFRp55 und dem TNFRp75 besteht. Der Hauptteil der TNF-medierten Effektorfunktionen wird über den TNFRp55 vermittelt (vgl. Kapitel 1.4). TNF kann via TNFRp55 u.a. den Transkriptionsfaktor NF κ B aktivieren, der danach in den Nucleus transloziert und dort, gemeinsam mit anderen Transkriptionsfaktoren, die Synthese der Akute-Phase-Proteine (vgl. Kapitel 1.8) stimuliert. Über die Bedeutung dieses TNFRp55 für die Akute-Phase-Antwort der Maus ist bislang nur sehr wenig bekannt. Erste Hinweise hierzu lieferte die Arbeit von O'Brien et al., in der gezeigt wird, daß die SAP-Serumspiegel von TNFRp55^{-/-}-Mäusen und C57B/6-Mäusen nach der Inokulation von *Streptococcus pneumoniae* vergleichbar hoch sind (O'BRIEN 1999). TNF-p55^{-/-}-Mäuse sind resistent gegenüber einem Endotoxinschock, also gegenüber der, für andere Mäuse tödlichen, kombinierten Verabreichung von DGal und LPS (PFEFFER 1993). Im Hinblick auf die im vorangegangenen Kapitel diskutierte, aus den Daten der Abb. 4.2 abgeleitete Hypothese, Akute-Phase-Proteine könnten für das Überleben der Mäuse im Endo- bzw. Enterotoxinschock eine essentielle Bedeutung haben, wurde, zur Überprüfung dieser Annahme, die SAA- bzw. SAP-Synthese von DGal/LPS-behandelten TNFRp55^{-/-}-Mäusen untersucht. Tatsächlich zeigte die kombinierte Verabreichung von LPS und DGal *keinen* Einfluß auf die Höhe der SAA- und SAP-Serumspiegel der TNFRp55^{-/-}-Mäuse, wie in den Abbildung 4.9 dargestellt.

Hier kann also erstmalig gezeigt werden, daß sich das SAA- bzw. SAP-Expressionsniveau von TNFRp55^{-/-}-Mäusen und C57B/6-Mäusen nach Endo- bzw. Enterotoxin Instillation nicht wesentlich unterscheidet. Damit kann behauptet werden, daß die SAA- bzw. SAP-Synthese der Maus unabhängig vom TNFRp55 ist. Dieses Ergebnis impliziert, daß IL-1 und/oder IL-6 den Ausfall der TNF-vermittelten Signaltransduktion kompensieren können. Zudem steht dieses Resultat im Einklang mit den bereits diskutierten Ergebnissen der Charakterisierung der IL-1- und IL-6-defizienten Mäuse, die jeweils ebenfalls eine nahezu ungestörte SAA-Synthese aufwiesen. Des weiteren ist festzustellen, daß die im vorangehenden Kapitel diskutierte Hypothese, APP hätten im Endotoxinschock der Maus eine potentielle überlebenswichtige Bedeutung, durch das Ergebnis untermauert wird, daß die Endotoxinschock-resistenten TNFRp55^{-/-}-Mäuse nach kombinierter Instillation von DGal und LPS eine ungestörte SAA- und SAP-Synthese aufweisen. Die aus diesen Daten ableitbare, potentielle protektive Auswirkung von SAA und SAP gegenüber den letalen Auswirkungen eines Endotoxinschocks steht dabei im Einklang mit ihrer gemeinsamen, bereits bekannten Eigenschaft, LPS zu binden und neutralisieren zu können (NOURSADEGHI 2000, VAN LEEUWEN 2003).

Es gibt eine Reihe Mitglieder der TNFR-Superfamilie, u.a. den LTR β , der im Gegensatz zum TNFRp55 nicht unmittelbar in Apoptose-induzierenden Kaskaden involviert ist, wie im Kapitel 1.4 ausgeführt wurde. Es fanden sich im Schrifttum bislang lediglich indirekte Hinweise dafür, daß der LTR β in der Akute-Phase-Antwort eine Rolle spielen könnte: Bspw. wurde gezeigt, daß LTR β den Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert, der für die Initiation der Transkription vieler APP eine große Rolle spielt. (NAKANO 1996, CHANG 2002). Kürzlich wurde außerdem berichtet, daß durch die Aktivierung von LTR β in Mastzell-Kulturen die Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-4, IL6 und TNF induziert werden kann (STOPFER 2004). In einem kleinen Satz von Experimenten (vgl. Abb 4.11) kann hier demonstriert werden, daß zwischen Ausmaß und Kinetik der SEB- und LPS-induzierten SAA- bzw. SAP-Synthese von LTR β ^{-/-}-Mäusen und ihrem korespondierenden Wildtyp, den CD1-Mäusen, jeweils kein Unterschied besteht. Somit ist der LTR β , wie auch der TNFRp55, für die Endo- bzw. Enterotoxin-induzierte SAA- bzw. SAP-Synthese in der Maus entbehrlich.

5.4 Die Aktivierung des FAS-Rezeptors durch intraperitoneal instillierten Anti-FAS-AK führt nicht zu einer Induktion der SAA- bzw. SAP-Synthese.

FAS ist ebenfalls ein Mitglied der TNFR-Superfamilie und weist eine hohe Sequenzhomologie mit dem TNFRp55 auf. (NAGATA 1997) Wie in Kapitel 4.5.3 beschrieben, konnte hier reproduziert werden, daß Instillation von 10 μ g bzw. 100 μ g Anti-FAS-AK innerhalb weniger Stunden den Tod der so behandelten Mäuse herbeiführt, ohne daß hierzu die zusätzliche Gabe von DGal notwendig ist. Die hier verwendeten Anti-FAS-AK imitieren den FAS-Liganden (FAS-L), binden also an den FAS-Rezeptor, auch kurz FAS genannt, und induzieren rasch die Apoptose der betreffenden Zellen. Die Aktivierung von FAS durch FAS-L führt, wie die Aktivierung des TNFRp55, via MAP3K-Kinase zudem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und fördert außerdem die IL-6-Ausschüttung. TNFRp55 ist jedoch der vergleichsweise stärkere NF κ B-Aktivatoren der beiden Rezeptoren (RENSING-EHL 1995). FAS-Ligand-defiziente Mäuse sind, wie TNFRp55-defiziente Mäuse auch, deutlich weniger suszeptibel gegenüber den letalen Auswirkungen eines Endotoxinschocks (WESCHE 2005). Aus der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit von TNFRp55 und FAS sowie speziell dem Faktum, daß beide Rezeptoren in Signaltransduktionskaskaden eingebunden sind, die u.a. an der Induktion der Expression von Akute-Phase-Proteinen beteiligt sind, wurde hier die Hypothese abgeleitet, daß die Aktivierung des FAS-Rezeptors ebenfalls die Synthese von SAA und SAP fördern kann. Um dieses zu prüfen, wurde Balb/c-Mäusen zunächst 10 μ g bzw. 100 μ g Anti-FAS-AK intraperitoneal instilliert. 6 Stunden später konnte jedoch keine Erhöhung der SAA- bzw. SAP-Serumspiegel der so behandelten Mäuse festgestellt werden. Es wurden histologische Präparate der Lebern mit 100 μ g Anti-FAS-AK behandelten Mäuse angefertigt (vgl. Abb 4.14), die die zu erwartende Destruktion des Leberparenchyms zeigten, wodurch die Wirksamkeit des hier verwendeten Anti-FAS-AK unter Beweis gestellt werden konnte. Unter der Vorstellung, daß die Applikation letaler Dosen von Anti-FAS-AK rasch einen großen Teil der Leber destruiert und somit die hepatische Proteinsynthese, also auch die APP-Synthese unterbindet, wurde Mäusen im folgenden subletale Konzentrationen von 1 μ g Anti-FAS-AK/Maus und weniger verabreicht (vgl. Kapitel 4.5.3). Die so behandelten Mäuse starben nicht, ihre Lebern zeigten keine nennenswerten mikroskopischen Veränderungen, aber es fanden sich ebenfalls *keine* Veränderungen der SAA- bzw. SAP-Serumspiegel nach 6 bzw. 24 Stunden post injectionem. Zur Absicherung dieses negativen Ergebnisses wurde noch ein weiterer Anti-FAS-AK in verschiedenen Konzentrationen intraperitoneal in Mäuse injiziert, jedoch ließ sich mit diesem ebenfalls keine Beeinflussung der SAA- bzw. SAP-Synthese erzielen. Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß durch die intraperitoneale Instillation letaler und sublethaler Konzentrationen von Anti-FAS-AK die murine SAA- bzw. SAP-Synthese nicht beeinflusst werden kann. Daraus kann man schließen, daß die Bindung des FAS-L an den FAS-Rezeptor in der Maus keine Induktion der Synthese der Haupt-Akute-Phase-Proteine SAA und SAP hervorruft. Bei der Interpretation dieser Daten ist jedoch in Betracht zu ziehen, daß das murine FAS/Anti-FAS-AK-Schockmodell im Hinblick auf die Mengenverteilung von FAS und FAS-L weit von dem, unter physiologischen Bedingungen vorhandenen, Mengenverhältnis dieser beiden Bindungspartner zueinander entfernt ist: FAS wird in der Maus ubiquitär exprimiert, die Expression des FAS-Liganden beschränkt sich hingegen auf einige wenige Zelltypen, zu denen u.a. zytotoxische T-Zellen zählen (vgl. Kapitel 1.5), sodaß unter physiologischen Bedingungen ein großer relativer Überschuß an FAS-Rezeptor vorliegt und die Wahrscheinlichkeit, daß es zu einer Bindung von FAS an den FAS-Liganden kommt, weitaus geringer ist, als in unserem murinen FAS/Anti-FAS-AK-Schockmodell. Somit kommt es während der Akute-Phase-Reaktion unter physiologischen Konditionen in

der Regel nicht zu einem Leberversagen bzw. einem Ausfall der hepatischen Proteinsynthese. Daher wurde hier versucht, sich diesen physiologischen Mengenverhältnissen von FAS zu FAS-L durch Verabreichung titrierter *subletaler* Konzentrationen an Anti-FAS-AK anzunähern, wobei auch hierdurch, wie berichtet, die SAA- bzw. SAP-Synthese nicht stimuliert werden konnte. Des Weiteren ist in Erwägung zu ziehen, wie in Kapitel 5.1 bereits diskutiert, daß im Regelfall ein pathogenes Agens, welches eine Akute-Phase-Reaktion auslöst, prolongiert einwirkt, und nicht nur einmalig, wie es in den hier untersuchten Mausmodellen der Fall ist. Es ist damit vorstellbar, daß sich, gerade im Falle einer systemischen Infektion, Regelkreise aktiviert werden, die sich in den hier untersuchten Mausmodellen nicht abbilden können. Somit kann mit den hier durchgeführten Experimenten nicht endgültig ausgeschlossen werden, daß das FAS/FAS-L-System in die Regulationskaskaden der Synthese von SAA bzw. SAP involviert ist. Diese Experimente lassen jedoch den Rückschluß zu, daß der FAS-Rezeptor, im Vergleich zum TNFRp55, bei der Synthese von Akute-Phase-Proteinen eine eher untergeordnete Rolle spielt. Vielleicht würde eine andere Verabreichungsform des Anti-FAS-AK, wie bspw. die subkutane Injektion, die physiologischen Mengen- und Zeitrelationen des FAS/FAS-L-Interaktion besser abbilden können.

5.5 CpG-DNS induziert die Akute-Phase-Proteine SAA und SAP

Wie in Kapitel 1.7 bereits besprochen, wurde 1995 von Krieg et al. beschrieben, daß bakterieller DNS immunmodulatorisch wirkt und daß dafür die darin enthaltenen sogenannten CpG-Motive verantwortlich sind, die aus der Konsensussequenz „Pu-Pu-CpG-Py-Py“, bestehen (KRIEG 1995). Sparwasser et al. fanden 1997 in weiterführenden Untersuchungen heraus, daß in Mäuse injizierte synthetische CpG-ODN Makrophagen aktivieren, die wiederum TNF α liberieren, welches schließlich zum Septischen Schock führt (SPARWASSER 1997b). Ferner stimuliert CpG-DNS die Freisetzung von IL-1 und IL-6 (HÄCKER 2000). In Anbetracht all dieser Befunde, stellte sich die Frage, ob bakterielle DNS auch die Synthese von Akute-Phase-Proteinen stimulieren kann. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde Mäusen zunächst bakterielle LPS-freie DNS, später auch das CpG-ODN 1668 bzw. ein ODN mit einer zerstörten CPG-Konsensussequenz gleicher Länge (1720) intraperitoneal instilliert.

In dieser Arbeit, bzw. in der aus ihr hervorgegangenen Publikation, wird erstmalig beschrieben, daß bakterielle DNS in der Lage ist, die Synthese von Akute-Phase-Proteinen zu stimulieren, und daß hierfür das CpG Motiv zwingend erforderlich ist (Abb. 4.16 - 4.18). In anderen Worten wird hier ein neuer Stimulus der Akute-Phase-Reaktion definiert, nämlich CpG-DNS. Das es sich hierbei erwartungsgemäß nicht nur um einem Mausstamm-übergreifenden, sondern um einen Spezies-übergreifenden Effekt der CpG-DNS handelt, zeigt ein Artikel, der Jahre nach der, aus den Daten der hier vorliegenden Arbeit entstandenen Publikation, nämlich im Jahre 2004 veröffentlicht wurde. In jenem Artikel wird beschrieben, daß Schafe nach der Verabreichung von CpG-DNS deutlich erhöhte Haptoglobin-Serumspiegel, sowie entzündliche Blutbildveränderungen aufweisen (NICHANI 2004).

Wie in Kapitel 5.1 bereits beschrieben, ist kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Verlauf der CpG-ODN-induzierten SAA, α 1-AT bzw. SAP-Kinetiken und dem Verlauf der Kinetiken nach der Instillation von LPS, IL-1 β , TNF α und SEB zu erkennen. Wie zu erwarten, kann die hepatische Synthese von CpG-induziertem SAP durch DGal blockiert werden; der gleichzeitig blockierte Anstieg der SAA- bzw. SAP-Serumspiegel weist darauf hin, daß der hepatische Syntheseblock nicht, wie im Falle der IL-1 β -induzierten

SAP-Synthese, durch eine extrahepatische Produktion kompensiert werden kann (vgl. Abb. 4.19). In Kapitel 5.3 wurde bereits diskutiert, daß die Endo- bzw. Enterotoxin-vermittelte Induktion der SAA- bzw. SAP-Synthese unabhängig vom TNFRp55 ist. Auch die CpG-induzierte Synthese dieser beiden Akute-Phase-Proteine ist unabhängig vom TNFRp55, wie aus Abbildung 4.20 hervorgeht. Da, wie eben erwähnt, CpG-DNS nicht nur die Freisetzung von TNF, sondern auch von IL-1- und IL-6 fördert, ist es wahrscheinlich, daß diese beiden Interleukine den Defekt in der TNF-Signaltransduktionskaskade der TNFRp55^{-/-}-Mäuse vollständig kompensieren können und sich deshalb das Ausmaß der SAA- bzw. SAP-Synthese dieser gentechnisch veränderten Mäuse von der ihres korrespondierenden Wildtyps (C57B/6-Mäuse) nicht wesentlich unterscheidet. Natürlich kann anhand der hier vorliegenden Experimente eine direkte Interaktion von CpG-DNS mit Hepatozyten nicht endgültig ausgeschlossen werden, jedoch ist es viel wahrscheinlicher, daß die CpG-induzierte Stimulation von der Synthese von Akute-Phase-Proteinen ebenfalls hauptsächlich über die drei eben aufgezählten proinflammatorischen Zytokine vermittelt wird.

In der Zusammenschau dieser Resultate mit den, bereits im Kapitel 5.3 zitierten, Ergebnissen der Charakterisierung der Akute-Phase-Antwort von IL-1^{-/-}- und IL-6^{-/-}-Mäuse, wird deutlich, daß die Aktivierungswege der APP-Synthese zumindest partiell redundant sind, da beim Ausfall eines der drei Zytokine ein anderes dessen Funktion nahezu vollständig übernehmen kann. Man könnte diese Redundanz aus evolutionsbiologischer Sicht als Indiz für eine potentiell lebenswichtige Bedeutung der Akute-Phase-Proteine werten.

5.6 Klinische Implikationen und Ausblick

Wie in Kapitel 5.2 bereits ausführlich diskutiert und zitiert wurde, gibt es im Schriftum eine Reihe von Arbeiten, die die protektive Rolle von Akute-Phase-Proteinen, vor allem von α 1-AT und α 1-Glykoprotein, in Tiermodellen der systemischen Infektion bzw. des Septischen Schocks beschreiben. Diese bereits publizierten Daten werden durch einige der in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen und ebenfalls bereits ausführlich diskutierten Befunde (Kapitel 5.2 und 5.3), unterstützt bzw. ergänzt. Im Hinblick darauf ist der Einsatz von Akute-Phase-Proteinen zur lokalen oder gar systemischen Behandlung von Infektionen, und damit auch zur Behandlung bzw. Prävention des Septischen Schocks, denkbar. In einer Vielzahl von Publikationen werden zwei Krankheitsstadien der Sepsis beschrieben: Initial kommt es zur einer hyperinflammatorischen Immunantwort, auf die dann eine Phase der sogenannten „relativen Immunsuppression“ folgt, die u.a. durch sehr niedrige Zytokin-Serumspiegel charakterisiert ist. Diese beiden Phasen können auch mehrfach alternierend während des Krankheitsverlaufs auftreten. (RIEDEMANN 2003, POLDERMAN 2004). Es ist vorstellbar, daß sich der therapeutische Einsatz von Akute-Phase-Proteinen, neben einer potentiellen prophylaktischen Anwendung im Rahmen von noch nicht exazerbierten systemischen Infektionen, gerade in jener Phase der relativen Immunsuppression stützend auf das Immunsystem des betroffenen Organismus auswirken könnte.

Einschränkend muß hierzu erwähnt werden, daß Arbeiten, die die Nebenwirkungen einer Überexpression von bestimmten Akute-Phase-Proteinen aufzeigen, die Entwicklung derartiger therapeutischer Ansätze etwas gehemmt haben: Beispielsweise entwickeln transgene Mäuse, die α 1-Glykoprotein überexprimieren, eine schwere Colitis (HOICHEPIED 2002). In letzter Zeit findet sich jedoch erneut eine Reihe von Publikationen, die sich mit dem potentiellen therapeutischen Einsatz von Akute-Phase-Proteinen befassen: Beispielsweise wurde gezeigt, daß α 1-Glykoprotein vor Ischämie-bedingten Gewebsdestruktionen schützen kann und daß SAA die entzündlichen Veränderungen beim Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis

bekämpft (DE VRIES 2004, MULLAN 2006). Die aus den, im Rahmen dieser Arbeit erhobenen, Daten ableitbare, potentielle protektive Auswirkung von SAA und SAP gegenüber den letalen Auswirkungen eines Endotoxinschocks steht im Einklang mit ihrer gemeinsamen Eigenschaft, LPS zu binden und neutralisieren zu können (NOURSADEGHI 2000, VAN LEEUWEN 2003). Andererseits zeigen SAP-defiziente Mäuse eine nur gering erhöhte Suszeptibilität gegenüber LPS. Mit hochdosiertem SAP vorbehandelte SAP^{-/-}-Mäuse weisen nach einer kombinierten DGal/LPS-Administration keine eindrücklich erhöhten Überlebensraten auf. Wenn Mäuse hingegen mit dem, eng mit SAP verwandten, CRP vorbehandelt werden, steigt deren Überlebensrate nach der kombinierten DGal/LPS-Instillation deutlich an (NOURSADEGHI 2000). Diese Veröffentlichungen machen noch einmal deutlich, daß die Vielzahl von Akute-Phase-Proteinen auch eine eben solche Vielzahl an Funktionen aufweist und daß sich nicht alle APP in gleichem Maße für einen experimentellen therapeutischen Ansatz im Rahmen der Sepsisbehandlung eignen würden. Zusammenfassend sollten, in Anbetracht der Vielzahl ermutigender Ergebnisse, weitere Anstrengungen unternommen werden, die präventive bzw. therapeutische Nutzbarkeit der Applikation von Akute-Phase-Proteinen beim Septischen Schock des Menschen, bzw. allgemein bei humanen Infektionskrankheiten, zu explorieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig systematisch explorierten Kinetiken der SAA- und SAP-Serum- bzw. Leberkonzentrationen unterstreichen die in der Literatur bereits bekannte, und klinisch auch genutzte, Eignung mancher Akute-Phase-Proteine als Marker für die Krankheitsaktivität systemischer Infektionen. Einen solchen, in der klinischen Medizin bereits genutzten, Marker stellt das bekannte CRP dar. Interessant ist, daß in letzter Zeit insbesondere SAA als prognostischer Marker bei der klinischen Verlaufsbeurteilung bzw. -prognose der humanen Sepsis diskutiert wird (ARNON 2004, ARNON 2005).

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wird bakterielle DNS, bzw. CpG-DNS, als neuer Induktor der Akute-Phase-Antwort identifiziert. Die Akute-Phase-Proteine sind Teil des evolutiv älteren, unspezifischen Abwehrsystems, das durch die Entdeckung der TLR (vgl. Kapitel 1.2) in letzter Zeit wieder in den Blickpunkt der Wissenschaft gerückt wurde. CpG-DNS wird von TLR9 erkannt. Der therapeutische Einsatz von CpG-DNS wird seit längerem vor allem in der Onkologie und Allergologie als Therapeutikum diskutiert bzw. klinisch geprüft. In der Onkologie werden sich v.a. von der Eigenschaft der CpG-DNS, dendritische Zellen und NK-Zellen stimulieren zu können (vgl. Kapitel 1.7), welche wiederum in der Lage sind, zytotoxische T-Zellen zu aktivieren, die die Tumorzellen schließlich zu attackieren vermögen, therapeutische Erfolge erhofft (KRIEG 2002). Darüber hinaus gibt es eine Reihe an vielversprechenden Ergebnissen aus Studien, die den Einsatz von CpG-DNS als Adjuvans für Impfstoffe prüfen (SPIES 2003, PAYETTE 2006). Außerdem wurde berichtet, daß eine Vorbehandlung von Mäusen mit CpG-DNS diese vor den letalen Auswirkungen einer nachfolgenden experimentellen Infektion mit bspw. *Listeria monocytogenes* oder *Francisella tularensis* schützen kann (KRIEG 1998, ELKINS 1999). Da dieser CpG-vermittelte Schutz nach einmaliger CpG-Instillation bis zu einigen Wochen anhält, ist es sehr unwahrscheinlich, daß die, in dieser Arbeit beschriebene CpG-vermittelte Induktion der Akute-Phase-Proteine wesentlich zum eben berichteten protektiven Effekt von CpG-DNS beiträgt, da die SAA- und SAP-Serumkonzentrationen, nach einmaliger CpG-ODN-Administration bereits nach 48 Stunden fast wieder ihren Ausgangswert erreicht haben. Die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebene Fähigkeit bakterieller DNS, bzw. CpG-DNS, die Synthese von Akute-Phase-Proteinen zu stimulieren, kann also derzeit zwar nicht unmittelbar erkenntnisfördernd in einen der existenten bzw. hypothetischen therapeutischen Ansätze integriert werden, jedoch ergänzen die hier erhobenen Resultate die bereits bekannte Vielzahl immunstimulatorischer Fähigkeiten der CpG-DNS um eine weitere. Zudem lassen sich aus diesen Befunden Rückschlüsse auf die durch bakterielle DNS angestoßenen Signaltransduktionskaskaden ziehen, bspw. daß die durch CpG-ODN induzierte Menge an IL-1 und IL-6 für die Induktion der SAA- und SAP-Synthese ausreichen.

6 Zusammenfassung

Etwa die Hälfte der an einer Sepsis erkrankten Patienten erleidet einen Septischen Schock, welcher, trotz moderner intensivmedizinischer Behandlungsmöglichkeiten, noch immer mit einer Mortalitätsrate von über 50% einhergeht. Es finden sich in der Literatur vielversprechende Angaben darüber, daß die Vorbehandlung mit verschiedenen Akute-Phase-Proteinen Nagetiere vor den letalen Auswirkungen eines Endotoxinschocks bewahren kann. Die hier erhobenen Daten stehen im Einklang mit diesen bereits publizierten Befunden und ergänzen diese: Mäusen unterschiedlicher Stämme wurde eine Kombination von DGal mit jeweils unterschiedlichen TNF-Induktoren, u.a. LPS und SEB, parenteral verabreicht und 6 Stunden später ihre SAA- bzw. SAP-Serumkonzentrationen sowie ihre SAP-Leberkonzentrationen bestimmt. Es fiel auf, daß die wenigen Mäuse, die diese Behandlung überlebten, eine nahezu ungestörte bzw. nur partiell beeinträchtigte Synthese dieser beiden Akute-Phase-Proteine aufwiesen, wohingegen in den Tieren, die an dieser Behandlung erwartungsgemäß verendeten, kurz vor ihrem Tod keine bzw. allenfalls diskrete Mengen an SAA und SAP nachgewiesen werden konnten: Die TNFRp55^{-/-}-Mäusen überlebten DGal/LPS bzw. SEB-Behandlung erwartungsgemäß und wiesen dabei eine ungestörte SAA- bzw. SAP-Synthese auf. Auch die mit DGal und 1µg IL-1β behandelten Mäuse überlebten und konnten dabei, erstaunlicherweise ausschließlich im Falle von SAP, den DGal-vermittelte Transkriptionsarrest in der Leber durch eine suffiziente extrahepatische SAP-Synthese kompensieren. In der Literatur finden sich bislang keine ausführlichen Untersuchungen darüber, inwieweit SAP in der Maus auch außerhalb der Leber synthetisiert werden kann, insofern handelt es sich hier um die Erstbeschreibung. Anzeichen für eine extrahepatische SAP-Synthese fanden sich interessanterweise ausschließlich nach der Stimulation der Mäuse mit IL-1β.

Natürlich kann anhand der hier vorliegenden Experimente keine Aussage darüber gemacht werden, in welchem Ausmaß die, durch die kombinierte Verabreichung von DGal und einem TNF-Induktor hervorgerufene, Blockade der Synthese der Akute-Phase-Proteine ursächlich zum rasch eintretenden Tod der mit dieser Kombination behandelten Tiere beiträgt, da DGal in diesem Tiermodell ja unspezifisch die Synthese aller hepatisch produzierten Proteine unterbindet.

In dieser Arbeit wird ebenfalls erstmalig beschrieben, dass die Synthese von SAA und SAP nach Endo- bzw. Enterotoxininstillation in TNFRp55^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ungestört verläuft, woraus gleichzeitig entnommen werden kann, dass IL-1 und IL-6 den Defekt der TNF-Signaltransduktionskaskade dieser Mäuse problemlos zu kompensieren vermögen. Neben dem TNFRp55 wurden noch zwei weitere Mitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie bezüglich ihrer Bedeutung für die SAA- bzw. SAP-Synthese untersucht, nämlich der LTRβ und FAS: Die hier vorliegenden Daten zeigen, dass die systemische Induktion von SAA und SAP unabhängig von LTRβ ist, da in LTRβ^{-/-}-Mäusen weder nach der Instillation von LPS, noch nach der Instillation von SEB, ein Defekt der SAA- oder der SAP-Synthese nachgewiesen werden konnte. Erstaunlicherweise führt die intraperitoneale Instillation von Anti-FAS-AK, sowohl in letalen wie auch in verschiedenen subletalen Konzentrationen, *nicht* zu einer Induktion der SAA- bzw. SAP-Synthese.

Ferner wird SEB, welches nach systemischer Applikation zur Erhöhung der TNF-Serumspiegel führt, erstmalig im Rahmen dieser Arbeit als Induktor von Akute-Phasen-Proteinen, speziell als Induktor der SAA- und der SAP-Synthese beschrieben.

In einem anderen Teil der hier vorliegenden Arbeit konnte bakterielle DNS als neuer Induktor der Synthese von Akute-Phase-Proteinen identifiziert werden. Hierbei sind die CpG-Motive der bakteriellen DNS für die Induktion der SAA- bzw. SAP-Synthese zwingend erforderlich, der TNFRp55 des Wirtsorganismus hingegen entbehrlich. Das Repertoire der bereits bekannten immunstimulatorischen Wirkungen der CpG-DNS konnte also um eine weitere Wirkung ergänzt werden. Anders formuliert, konnte hier mit CpG-DNS ein neuer Induktor der Akute-Phase-Antwort identifiziert werden, der in keiner Weise den bereits bekannten Stimulatoren dieser evolutiv hochkonservierten unspezifischen Abwehrreaktion der Vertebraten ähnelt und der darüber hinaus allen Bakterien gemein ist.

Die eben beschriebenen Resultate ergaben sich im wesentlichen aus der systematischen Untersuchung der Kinetiken der SAA-Serumkonzentrationen bzw. der SAP-Serum- und Leberkonzentrationen, bei der zudem festgestellt werden konnte, dass der Verlauf dieser Kinetiken unabhängig vom Induktor der SAA- bzw. SAP-Synthese ist und somit immer gleichförmig aussieht. Nebenbefundlich wurde hier erstmalig die Regulation des murinen α 1-AT im Endo- bzw. Enterotoxinschock untersucht, und festgestellt, dass dieses Akute-Phase-Protein in der Maus offenbar konstitutiv exprimiert wird bzw. sich die α 1-AT-Synthese durch Endo- und Enterotoxine nicht beeinflussen lässt.

Literaturverzeichnis

- ABERNATHY, T.J. und D. AVERY (1941). *The occurrence during infection of a protein not normally present in the blood. I. Distribution of the reactive protein in patients sera and the effects of calcium on the flocculation reaction with C-polysaccharide of pneumococcus.* J. Exp. Med., 73:173.
- ACHA-ORBEA, H. und H. MACDONALD (1995). *Superantigens of mouse mammary tumor virus.* Annu Rev Immunol, 13:459–86.
- AHMAD-NEJAD, PARVIZ, H. HÄCKER, M. RUTZ, S. BAUER, R. M. VABULAS und H. WAGNER (2002). *Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments.* Eur J Immunol, 32(7):1958–1968.
- ALIMZHANOV, M. B., D. V. KUPRASH, M. H. KOSCO-VILBOIS, A. LUZ, R. L. TURETSKAYA, A. TARAKHOVSKY, K. RAJEWSKY, S. A. NEDOSPASOV und K. PFEFFER (1997). *Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 94(17):9302–9307.
- AOUDIJT, F., R. AL-DACCAK und W. LÉVEILLE, C. AND MOURAD (1995). *Effects and mechanisms underlying the interaction of bacterial superantigens with MHC class II-positive cells.* In: *Bacterial superantigens: Structure, function and therapeutic potential*, S. 147–160. Thibbodoeau & Sekly, Heidelberg, Springer Verlag Aufl.
- ARCHER, G. L. (1998). *Staphylococcus aureus: a well-armed pathogen.* Clin Infect Dis, 26(5):1179–1181.
- ARNON, SHMUEL, I. LITMANOVITZ, R. REGEV, S. BAUER, M. LIS, R. SHAINKIN-KESTENBAUM und T. DOLFIN (2005). *Serum amyloid A protein is a useful inflammatory marker during late-onset sepsis in preterm infants.* Biol Neonate, 87(2):105–110.
- ARNON, SHMUEL, I. LITMANOVITZ, R. REGEV, M. LIS, R. SHAINKIN-KESTENBAUM und T. DOLFIN (2004). *The prognostic virtue of inflammatory markers during late-onset sepsis in preterm infants.* J Perinat Med, 32(2):176–180.
- BADOLATO, R., J. M. WANG, W. J. MURPHY, A. R. LLOYD, D. F. MICHIEL, L. L. BAUSSERMAN, D. J. KELVIN und J. J. OPPENHEIM (1994). *Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes.* J Exp Med, 180(1):203–209.
- BALABAN, N. und A. RASOOLY (2000). *Staphylococcal enterotoxins.* Int J Food Microbiol, 61:1–10.
- BALLAS, Z.K., W. RASMUSSEN und A. KRIEG (1996). *Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA.* J Immunol, 157:1840–1845.
- BAUER, M., K. HEEG, H. WAGNER und G. B. LIPFORD (1999). *DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner.* Immunology, 97(4):699–705.
- BAUER, S., C. J. KIRSCHNING, H. HÄCKER, V. REDECKE, S. HAUSMANN, S. AKIRA, H. WAGNER und G. B. LIPFORD (2001). *Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition.* Proc Natl Acad Sci U S A, 98(16):9237–9242.
- BAUMANN, H. und J. GAULDIE (1994). *The acute phase response.* Immunol Today, 15(2):74–80.

- BAYBUTT, H. N. und F. HOLSBOER (1990). *Inhibition of macrophage differentiation and function by cortisol..* Endocrinology, 127(1):476–480.
- BEER, M. C. DE, M. S. KINDY, W. S. LANE und F. C. DE BEER (1994). *Mouse serum amyloid A protein (SAA5) structure and expression..* J Biol Chem, 269(6):4661–4667.
- BICKERSTAFF, M. C., M. BOTTO, W. L. HUTCHINSON, J. HERBERT, G. A. TENNENT, A. BYBEE, D. A. MITCHELL, H. T. COOK, P. J. BUTLER, M. J. WALPORT und M. B. PEPYS (1999). *Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity..* Nat Med, 5(6):694–697.
- BIRD, A. P. (1986). *CpG-rich islands and the function of DNA methylation..* Nature, 321(6067):209–213.
- BLANK, C., A. LUZ, S. BENDIGS, A. ERDMANN, H. WAGNER und K. HEEG (1997). *Superantigen and endotoxin synergize in the induction of lethal shock.* Eur J Immunol, 27(4):825–33.
- BODMANN, K.F. und F. VOGEL (2001). *Antimikrobielle Therapie der Sepsis.* Chemotherapie Journal, Heft 2:43–55.
- BONE, R. C. (1996). *Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS.* Crit Care Med, 24:1125–1128.
- BONE, R.C. (1991). *The pathogenesis of sepsis.* Ann Int Med, 115:457–469.
- BORST, J., H. JACOBS und G. BROUNS (1996). *Composition and function of T-cell receptor and B-cell receptor complexes on precursor lymphocytes.* Curr. Opin. Immunol., 8:181–190.
- BOTTO, M., P. N. HAWKINS, M. C. BICKERSTAFF, J. HERBERT, A. E. BYGRAVE, A. MCBRIDE, W. L. HUTCHINSON, G. A. TENNENT, M. J. WALPORT und M. B. PEPYS (1997). *Amyloid deposition is delayed in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene..* Nat Med, 3(8):855–859.
- BRANTLY, M., T. NUKIWA und R. G. CRYSTAL (1988). *Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency..* Am J Med, 84(6A):13–31.
- BRUNN, C. FOYN, K. SLETTEN und G. MARHAUG (1998). *Mouse serum amyloid A (SAA) proteins isolated by two-dimensional electrophoresis: characterization of isotypes and the effect of separate and combined administrations of cytokines, dexamethasone and lipopolysaccharide (LPS) on serum levels and isotype distribution..* Clin Exp Immunol, 111(1):231–236.
- BUTLER, P. J., G. A. TENNENT und M. B. PEPYS (1990). *Pentraxin-chromatin interactions: serum amyloid P component specifically displaces H1-type histones and solubilizes native long chromatin..* J Exp Med, 172(1):13–18.
- CASTELL, J. V., M. J. GÓMEZ-LECHÓN, M. DAVID, R. FABRA, R. TRULLENQUE und P. C. HEINRICH (1990). *Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6..* Hepatology, 12(5):1179–1186.
- CECILIANI, FABRIZIO, A. GIORDANO und V. SPAGNOLO (2002). *The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins..* Protein Pept Lett, 9(3):211–223.
- CHANG, YING-HSIN, S.-L. HSIEH, M.-C. CHEN und W.-W. LIN (2002). *Lymphotoxin beta receptor induces interleukin 8 gene expression via NF-kappaB and AP-1 activation..* Exp Cell Res, 278(2):166–174.
- CHO, KIHU, T. N. PHAM, S. D. CRIVELLO, J. JEONG, T. L. GREEN und D. G. GREENHALGH (2004). *Involvement of CD14 and toll-like receptor 4 in the acute phase response of serum amyloid A proteins and serum amyloid P component in the liver after burn injury..* Shock, 21(2):144–150.
- COETZEE, G. A., A. F. STRACHAN, D. R. VAN DER WESTHUYZEN, H. C. HOPPE, M. S. JEENAH und F. C. DE BEER (1986). *Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition..* J Biol Chem, 261(21):9644–9651.
- COLE, B.C. und C. ATKIN (1991). *The Mycoplasma arthritis T-cell mitogen, MAM: a model superantigen.* Immunol Today, 12(8):271–6. Review.

- CSUKAS, Z., K. TORO, I. JANKOVICS, F. ROZGONYI und P. SOTONYI (2001). *Detection and toxin production of Staphylococcus aureus in sudden infant death cases in Hungary*. Acta Microbiol Immunol Hung., 48(2):129–41.
- DALPKE, A.H. und K. HEEG (2003). *Synergistic and antagonistic interactions between LPS and superantigens*. J. Endotoxin Res., 9(1):51–54.
- DAMTEW, B., D. RZEWNICKI, G. LOZANSKI und I. KUSHNER (1993). *IL-1 receptor antagonist affects the plasma protein response of Hep 3B cells to conditioned medium from lipopolysaccharide-stimulated monocytes*. J Immunol, 150(9):4001–4007.
- DANDONA, P., D. NIX, M. F. WILSON, A. ALJADA, J. LOVE, M. ASSICOT und C. BOHUON (1994). *Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 79(6):1605–1608.
- DAVIS, M.M. und P. BJORKMAN (1988). *T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition*. Nature, 334:395–402. [published erratum appears in Nature 1988 Oct 20;335(6192):744].
- DELLABONA, M., J. PECCOUD, J. KAPPLER, P. MARRACK, C. BENOIST und S. D. MATHI (1990). *Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove*. Cell, 62:1115–1121.
- DINARELLO, C. A. (1983). *Pathogenesis of fever during hemodialysis*. Contrib Nephrol, 36:90–99.
- DOBRESCU, D., B. URSEA, M. POPE, A. ASCH und D. POSNETT (1995). *Enhanced HIV-1 replication in V beta 12 T cells due to human cytomegalovirus in monocytes: evidence for a putative herpesvirus superantigen*. Cell, 82(5):753–63.
- DONNELLY, J. J., J. B. ULMER, J. W. SHIVER und M. A. LIU (1997). *DNA vaccines*. Annu Rev Immunol, 15:617–648.
- DUNNE, A und L. O 'NEILL (2005). *Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity*. FEBS Lett., 10:499–502. [Epub ahead of print].
- DUSTIN, M.L. und J. COOPER (2000). *The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling*. Nature Immunol., 1:23–29.
- ELKINS, K. L., T. R. RHINEHART-JONES, S. STIBITZ, J. S. CONOVER und D. M. KLINMAN (1999). *Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria*. J Immunol, 162(4):2291–2298.
- ERIKSEN, N. und E. P. BENDITT (1980). *Isolation and characterization of the amyloid-related apoprotein (SAA) from human high density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 77(11):6860–6864.
- FAMILIAN, A., B. ZWART, H. G. HUISMAN, I. RENSINK, D. ROEM, P. L. HORDIJK, L. A. AARDEN und C. E. HACK (2001). *Chromatin-independent binding of serum amyloid P component to apoptotic cells*. J Immunol, 167(2):647–654.
- FANTUZZI, G., F. BENIGNI, M. SIRONI, M. CONNI, M. CARELLI, L. CANTONI, L. SHAPIRO, C. A. DINARELLO, J. D. SIPE und P. GHEZZI (1995). *Ciliary neurotrophic factor (CNTF) induces serum amyloid A, hypoglycaemia and anorexia, and potentiates IL-1 induced corticosterone and IL-6 production in mice*. Cytokine, 7(2):150–156.
- FANTUZZI, G., H. ZHENG, R. FAGGIONI, F. BENIGNI, P. GHEZZI, J. D. SIPE, A. R. SHAW und C. A. DINARELLO (1996). *Effect of endotoxin in IL-1 beta-deficient mice*. J Immunol, 157(1):291–296.
- FATTORI, E., M. CAPPELLETTI, P. COSTA, C. SELBITTO, L. CANTONI, M. CARELLI, R. FAGGIONI, G. FANTUZZI, P. GHEZZI und V. POLI (1994). *Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice*. J Exp Med, 180(4):1243–1250.
- FISCH, P., E. MEUER, D. PENDE, S. ROTHENFUSSER, O. VIALE, S. KOCK, S. FERRONE, D. FRADELIZI, G. KLEIN, L. MORETTA, H. RAMMENSEE, T. BOON, P. COULIE und P. VAN DER BRUGGEN (1997). *Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity*. Eur.J.Immunol., 27:3368–3379.

- FRASER, J., V. ARCUS, P. KONG, E. BAKER und T. PROFT (2000). *Superantigens - powerful modifiers of the immune system*. Mol. Med., 6:125–132.
- FREUDENBERG, M.A. und G. C. (1991). *Tumor necrosis factor alpha mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in D-galactosamine-treated mice*. Infect Immun, 59(6):2110–2115.
- FÜTTERER, A., K. MINK, A. LUZ, M. H. KOSCO-VILBOIS und K. PFEFFER (1998). *The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues*. Immunity, 9(1):59–70.
- GABAY, C. und I. KUSHNER (1999). *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. N Engl J Med, 340(6):448–454.
- GALANOS, C., M. FREUDENBERG und W. REUTTER (1979). *Galactosamine-induced sensitization of the lethal effects of endotoxin*. Proc Natl Acad Sci USA, 76:5939–5939.
- GANGLOFF, S.C., U. ZHRINGER, C. BLONDIN, M. GUENOUNOU, J. SILVER und S. GOYERT (2005). *Influence of CD14 on Ligand Interactions between Lipopolysaccharide and Its Receptor Complex*. The Journal of Immunology, 175:3940–3945.
- GAO, J. J., Q. XUE, C. J. PAPASIAN und D. C. MORRISON (2001). *Bacterial DNA and lipopolysaccharide induce synergistic production of TNF-alpha through a post-transcriptional mechanism*. J Immunol, 166(11):6855–6860.
- GASCOIGNE, N.R.J (1993). *Interaction of the T cell receptor with bacterial superantigens*. Semin. Immunol., 5:13.
- GAUR, UPASNA und B. B. AGGARWAL (2003). *Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily*. Biochem Pharmacol, 66(8):1403–1408.
- GERSHOV, D., S. KIM, N. BROTH und K. B. ELKON (2000). *C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity*. J Exp Med, 192(9):1353–1364.
- GERVOIS, PHILIPPE, R. KLEEMANN, A. PILON, F. PERCEVAULT, W. KOENIG, B. STAELS und T. KOOISTRA (2004). *Global suppression of IL-6-induced acute phase response gene expression after chronic in vivo treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate*. J Biol Chem, 279(16):16154–16160.
- GHOSH, S., M. J. MAY und E. B. KOPP (1998). *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 16:225–260.
- GILFILLAN, S., C. BENOIST und D. MATHIS (1995). *Mice Lacking Terminal Deoxynucleotidyl Transferase: Adult Mice with a Fetal Antigen Receptor Repertoire*. Immunol. Rev., 148:201–219.
- GUTFELD, ORIT, D. PRUS, Z. ACKERMAN, S. DISHON, R. P. LINKE, M. LEVIN und S. URIELI-SHOVAL (2006). *Expression of Serum Amyloid A, in Normal, Dysplastic, and Neoplastic Human Colonic Mucosa: Implication for a Role in Colonic Tumorigenesis*. J Histochem Cytochem, 54(1):63–73.
- HAAS, C. J. DE, R. VAN DER ZEE, B. BENAÏSSA-TROUW, K. P. VAN KESSEL, J. VERHOEF und J. A. VAN STRIJP (1999). *Lipopolysaccharide (LPS)-binding synthetic peptides derived from serum amyloid P component neutralize LPS*. Infect Immun, 67(6):2790–2796.
- HART, D.N. (1997). *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood, 90:3245–87.
- HÄCKER, H. (2000). *Signal transduction pathways activated by CpG-DNA*. Curr Top Microbiol Immunol, 247:77–92.
- HEHLGANS, THOMAS und K. PFEFFER (2005). *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 115(1):1–20.

- HEIL, FLORIAN, P. AHMAD-NEJAD, H. HEMMI, H. HOCHREIN, F. AMPENBERGER, T. GELLERT, H. DIETRICH, G. LIPFORD, K. TAKEDA, S. AKIRA, H. WAGNER und S. BAUER (2003). *The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily.. Eur J Immunol*, 33(11):2987–2997.
- HEINRICH, P. C., J. V. CASTELL und T. ANDUS (1990). *Interleukin-6 and the acute phase response.. Biochem J*, 265(3):621–636.
- HEMMI, H., O. TAKEUCHI, T. KAWAI, T. KAISHO, S. SATO, H. SANJO, M. MATSUMOTO, K. HOSHINO, H. WAGNER, K. TAKEDA und S. AKIRA (2000). *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.. Nature*, 408(6813):740–745.
- HERMAN, A., J. KAPPLER, P. MARRACK und A. PULLEN (1991). *Superantigens: Mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. Annu. Rev. Immunol.*, 9:745–772.
- HIRAKURA, YUTAKA, I. CARRERAS, J. D. SIPE und B. L. KAGAN (2002). *Channel formation by serum amyloid A: a potential mechanism for amyloid pathogenesis and host defense.. Amyloid*, 9(1):13–23.
- HOCHPIED, T., A. WULLAERT, F. G. BERGER, H. BAUMANN, P. BROUCKAERT, L. STEIDLER und C. LIBERT (2002). *Overexpression of alpha(1)-acid glycoprotein in transgenic mice leads to sensitisation to acute colitis.. Gut*, 51(3):398–404.
- HOFFMAN, J. S. und E. P. BENDITT (1983). *Plasma clearance kinetics of the amyloid-related high density lipoprotein apoprotein, serum amyloid protein (apoSAA), in the mouse. Evidence for rapid apoSAA clearance.. J Clin Invest*, 71(4):926–934.
- HUANG, L. und I. CRISPE (1993). *Superantigen-driven peripheral deletion of T cells. Apoptosis occurs in cells that have lost the alpha/beta T cell receptor. J. Immunol.*, 151:1844–1851.
- HUTCHINSON, W. L., G. E. NOBLE, P. N. HAWKINS und M. B. PEPYS (1994). *The pentraxins, C-reactive protein and serum amyloid P component, are cleared and catabolized by hepatocytes in vivo.. J Clin Invest*, 94(4):1390–1396.
- IKEJIMA, T., S. OKUSAWA, P. GHEZZI, J. W. VAN DER MEER und C. A. DINARELLO (1990). *Interleukin-1 induces tumor necrosis factor (TNF) in human peripheral blood mononuclear cells in vitro and a circulating TNF-like activity in rabbits.. J Infect Dis*, 162(1):215–223.
- INTRONA, M., V. V. ALLES, M. CASTELLANO, G. PICARDI, L. D. GIOIA, B. BOTTAZZAI, G. PERI, F. BREVIARIO, M. SALMONA, L. D. GREGORIO, T. A. DRAGANI, N. SRINIVASAN, T. L. BLUNDELL, T. A. HAMILTON und A. MANTOVANI (1996). *Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites.. Blood*, 87(5):1862–1872.
- IRWIN, M.J. und N. GASCOIGNE (1993). *Interplay between superantigens and the immune system. J. Leukoc. Biol.*, 54:495–503.
- ITO, Y., J. ABE, K. YOSHINO, T. TAKEDA und T. KOHSAKA (1995). *Sequence analysis of the gene for a novel superantigen produced by Yersinia pseudotuberculosis and expression of the recombinant protein. J Immunol.*, 154(11):5896–906.
- ITOH, Y., S. TAKEUCHI, K. SHIGEMOTO, S. KUBO, S. HANDA, N. ISHIKAWA und N. MARUYAMA (1992). *The strain-dependent constitutive expression of murine serum amyloid-P component is regulated at the transcriptional level.. Biochim Biophys Acta*, 1131(3):261–269.
- JANEWAY, C.A. und R. MEDZHITOV (1998). *Introduction: The Role of Innate Immunity in the Adaptive Immune Response. Sem. Immunol.*, 10:349–350.
- JENSEN, K.E., A. NEAL, R. E. OWENS und J. WARREN (1963). *Interferon Responses of Chick Embryo Fibroblasts to Nucleic Acids and Related Compounds. Nature*, 200:433–434.
- JENSEN, L. E., M. P. HINEY, D. C. SHIELDS, C. M. UHLAR, A. J. LINDSAY und A. S. WHITEHEAD (1997). *Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response.. J Immunol*, 158(1):384–392.

- JIANG, S. L., D. SAMOLS, D. RZEWNICKI, S. S. MACINTYRE, I. GREBER, J. SIPE und I. KUSHNER (1995). *Kinetic modeling and mathematical analysis indicate that acute phase gene expression in Hep 3B cells is regulated by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms..* J Clin Invest, 95(3):1253–1261.
- KENGATHARAN, K.M., S. DE KIMPE, C. ROBSON, S. FOSTER und T. C. (1998). *Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure.* J. Exp. Med., 188:305–315.
- KENT, J. (1992). *Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis..* Br Vet J, 148(4):279–282.
- KHOVIDHUNKIT, WEERAPAN, M.-S. KIM, R. A. MEMON, J. K. SHIGENAGA, A. H. MOSER, K. R. FEINGOLD und C. GRUNFELD (2004). *Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host..* J Lipid Res, 45(7):1169–1196.
- KISILEVSKY, R. und L. SUBRAHMANYAN (1992). *Serum amyloid A changes high density lipoprotein's cellular affinity. A clue to serum amyloid A's principal function..* Lab Invest, 66(6):778–785.
- KMIEC, Z., M. MARLEWSKI, R. T. SMOLENSKI und H. A. SIMMONDS (1994). *Effect of galactosamine on adenine and uracil nucleotide levels in isolated hepatocytes of young and old rats..* Adv Exp Med Biol, 370:523–526.
- KOJ, A. (1996). *Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines..* Biochim Biophys Acta, 1317(2):84–94.
- KOJ, A. (1998). *Termination of acute-phase response: role of some cytokines and anti-inflammatory drugs..* Gen Pharmacol, 31(1):9–18.
- KOTZIN, B.L., D. LEUNG, J. KAPPLER und P. MARRACK (1993). *Superantigens and their potential role in human disease.* Advan. Immunol., 54:99–166.
- KRIEG, A. M., L. LOVE-HOMAN, A. K. YI und J. T. HARTY (1998). *CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to Listeria monocytogenes challenge..* J Immunol, 161(5):2428–2434.
- KRIEG, A. M., A. K. YI, S. MATSON, T. J. WALDSCHMIDT, G. A. BISHOP, R. TEASDALE, G. A. KORETZKY und D. M. KLINMAN (1995). *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation..* Nature, 374(6522):546–549.
- KRIEG, ARTHUR M (2002). *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects..* Annu Rev Immunol, 20:709–760.
- KUSHNER, I. (1982). *The phenomenon of the acute phase response..* Ann N Y Acad Sci, 389:39–48.
- KUSHNER, I. (1993a). *Regulation of the acute phase response by cytokines..* Perspect Biol Med, 36(4):611–622.
- KUSHNER, I. und A. MACKIEWICZ (1993b). *Acute Phase Proteins - Molecular Biology, Biochemistry and Clinical Applications*, Kap. The acute phase response: an overview, S. 3–19. Boca Raton, Florida, CRC Press.
- LANZAVECCHIA, A. (1988). *Clonal sketches of the immune response.* EMBO J., 7:2945–2951.
- LANZAVECCHIA, A. und F. SALLUSTO (2000). *Dynamics of T Lymphocyte Responses: Intermediates, Effectors and Memory Cells.* Science, 290:92–97.
- LAPATSCHEK, M.S., S. DURR, G. SUTTER, H. WAGNER und T. MIETHKE (2001). *Functional evaluation of HIV/SIV Nef as superantigen.* Virology, 282(2):329–37.
- LATZ, EICKE, A. SCHOENEMEYER, A. VISINTIN, K. A. FITZGERALD, B. G. MONKS, C. F. KNETTER, E. LIEN, N. J. NILSEN, T. ESPEVIK und D. T. GOLENBOCK (2004). *TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome..* Nat Immunol, 5(2):190–198.
- LE, J. M. und J. VILCEK (1989). *Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response..* Lab Invest, 61(6):588–602.

- LE, P. T., M. T. MULLER und R. F. MORTENSEN (1982). *Acute phase reactants of mice. I. Isolation of serum amyloid P-component (SAP) and its induction by a monokine..* J Immunol, 129(2):665–672.
- LEE, JONGDAE, T.-H. CHUANG, V. REDECKE, L. SHE, P. M. PITHA, D. A. CARSON, E. RAZ und H. B. COTTAM (2003). *Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7..* Proc Natl Acad Sci U S A, 100(11):6646–6651.
- LEEUWEN, HENK J VAN, E. C. J. M. HEEZIUS, G. M. DALLINGA, J. A. G. VAN STRIJP, J. VERHOEF und K. P. M. VAN KESSEL (2003). *Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis..* Crit Care Med, 31(5):1359–1366.
- LEIST, M., F. GANTNER, I. BOHLINGER, P. G. GERMANN, G. TIEGS und A. WENDEL (1994). *Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest..* J Immunol, 153(4):1778–1788.
- LENSCHOW, D.L., T. WALUNAS und J. BLUESTONE (1996). *CD28/B7 system of T cell costimulation..* Annu.Rev.Immunol., 14:233–258.
- LIAO, W. S., S. Y. LU, J. HUANG, L. LI und Z. BING (1995). *Transcription factors as targets of cytokine signals..* Ann N Y Acad Sci, 762:238–50; discussion 251.
- LIBERT, C., S. VAN BLADEL, P. BROUCKAERT, A. SHAW und W. FIERS (1991). *Involvement of the liver, but not of IL-6, in IL-1-induced desensitization to the lethal effects of tumor necrosis factor..* J Immunol, 146:2625–2632.
- LIBERT, C., P. BROUCKAERT und W. FIERS (1994). *Protection by alpha 1-acid glycoprotein against tumor necrosis factor-induced lethality..* J Exp Med, 180:1571–1575.
- LIBERT, C., W. VAN MOLLE, P. BROUCKAERT und W. FIERS (1996). *alpha1-Antitrypsin inhibits the lethal response to TNF in mice..* J Immunol, 157:5126–5129.
- LIPFORD, G. B., M. BAUER, C. BLANK, R. REITER, H. WAGNER und K. HEEG (1997a). *CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants..* Eur J Immunol, 27(9):2340–2344.
- LIPFORD, G. B., S. BENDIGS, K. HEEG und H. WAGNER (2000). *Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines..* Immunology, 101(1):46–52.
- LIPFORD, G. B., T. SPARWASSER, M. BAUER, S. ZIMMERMANN, E. S. KOCH, K. HEEGL und H. WAGNER (1997b). *Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines..* Eur J Immunol, 27:3420–3426.
- LITTMAN, D.R. (1987). *The structure of the CD4 and CD8 genes..* Annu.Rev.Immunol., 5:561–584.
- LOWELL, C. A., D. A. POTTER, R. S. STEARMAN und J. F. MORROW (1986). *Structure of the murine serum amyloid A gene family. Gene conversion..* J Biol Chem, 261(18):8442–8452.
- MALOY, K.J. und F. POWRIE (2001). *Regulatory T cells in the control of immune pathology..* Nature Immunol, 2(9):816–822.
- MARHAUG, G., B. HACKETT und S. B. DOWTON (1997). *Serum amyloid A gene expression in rabbit, mink and mouse..* Clin Exp Immunol, 107(2):425–434.
- MARINO, M. W., A. DUNN, D. GRAIL, M. INGLESE, Y. NOGUCHI, E. RICHARDS, A. JUNGBLUTH, H. WADA, M. MOORE, B. WILLIAMSON, S. BASU und L. J. OLD (1997). *Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice..* Proc Natl Acad Sci U S A, 94(15):8093–8098.
- MARRACK, P. und J. KAPPLER (1990). *The staphylococcal enterotoxins and their relatives..* Science, 248(4956):705–711.
- MASHIBA, H., K. MATSUNAGA, H. TOMODA und M. FURUSAWA (1990). *In vitro augmentation of macrophage-activating-factor release from peripheral blood cells of cancer patients by a DNA fraction from Mycobacterium bovis BCG..* Jpn J Med Sci Biol, 43(4):133–139.

- MATSUMOTO, MISAKO, K. FUNAMI, M. TANABE, H. OSHIUMI, M. SHINGAI, Y. SETO, A. YAMAMOTO und T. SEYA (2003). *Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells.* J Immunol, 171(6):3154–3162.
- MEDEMA, J. P. und J. BORST (1999). *Cell Signaling: a Decision of Life and Death.* Hum. Immunol., 60:403–411.
- MEDZHITOV, R. und C. JANEWAY JR. (1997). *Innate immunity: impact on the adaptive immune response.* Current Opinion in Immunology, 9:4–9.
- MEDZHITOV, R. und C. JANEWAY JR. (1998). *An Ancient System of Host Defense.* Current Opinion in Immunology, 10:12–15.
- MEDZHITOV, R. und C. JANEWAY JR. (2002). *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system.* Science, S. 298–300.
- MEEK, R. L., N. ERIKSEN und E. P. BENDITT (1992). *Murine serum amyloid A3 is a high density apolipoprotein and is secreted by macrophages.* Proc Natl Acad Sci U S A, 89(17):7949–7952.
- MEGYERI, P., J. SADOWSKA, T. ISSEKUTZ und A. ISSEKUTZ (1990). *Endotoxin-stimulated human macrophages produce a factor that induces polymorphonuclear leucocyte infiltration and is distinct from interleukin-1, tumour necrosis factor alpha and chemotactic factors.* Immunology, 69(1):155–6.
- MENG, G., M. RUTZ, M. SCHIEMANN, J. METZGER, A. GRABIEC, R. SCHWANDNER, P. LUPPA, F. EBEL, D. BUSCH, S. BAUER, H. WAGNER und K. C.J. (2004). *Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes.* Clin Invest, 113(10):1473–1481.
- MENG, YUXIA, A. F. CARPENTIER, L. CHEN, G. BOISSERIE, J.-M. SIMON, J.-J. MAZERON und J.-Y. DELATTRE (2005). *Successful combination of local CpG-ODN and radiotherapy in malignant glioma.* Int J Cancer, 116(6):992–997.
- MIERT, A. S. VAN (1995). *Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects.* Vet Q, 17(2):41–50.
- MIETHKE, T., K. DUSCHEK, C. WAHL, K. HEEG und H. WAGNER (1993a). *Pathogenesis of the toxic shock syndrome: T cell mediated lethal shock caused by the superantigen TSST-1.* Eur J Immunol., 23(7):1494–500.
- MIETHKE, T., H. GAUS, C. WAHL, K. HEEG und H. WAGNER (1992a). *T-cell-dependent shock induced by a bacterial superantigen.* Chem Immunol., 55:172–84. Review.
- MIETHKE, T., C. WAHL, K. HEEG, B. ECHTENACHER, P. H. KRAMMER und H. WAGNER (1992b). *T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor.* J Exp Med, 175(1):91–98.
- MIETHKE, T., C. WAHL, B. HOLZMANN, K. HEEG und H. WAGNER (1993b). *Bacterial superantigens induce rapid and T cell receptor V beta-selective downregulation of L-selectin (gp90Mel-14) in vivo.* J. Immunol., 151:6777–6782.
- MIGITA, K., Y. KAWABE, M. TOMINAGA, T. ORIGUCHI, T. AOYAGI und K. EGUCHI (1998). *Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts.* Lab Invest, 78(5):535–539.
- MINAMI, M., C. SCHREFFLER und C. COWING (1980). *Characterization of the stimulator cells in the murine primary mixed leucocyte response.* J. Immunol., 124:1314–1321.
- MITCHELL, T. I., C. I. COON und C. E. BRINCKERHOFF (1991). *Serum amyloid A (SAA3) produced by rabbit synovial fibroblasts treated with phorbol esters or interleukin 1 induces synthesis of collagenase and is neutralized with specific antiserum.* J Clin Invest, 87(4):1177–1185.
- MOLD, C., H. D. GRESHAM und T. W. D. CLOS (2001). *Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc gamma Rs.* J Immunol, 166(2):1200–1205.

- MONDAY, S.R., G. VATH, W. FERENS, C. DEOBALD, J. RAGO, P. GAHR, D. MONIE, J. IANDOLO, S. CHAPES, W. DAVIS, D. OHLENDORF, P. SCHLIEVERT und G. BOHACH (1999). *Unique superantigen activity of staphylococcal exfoliative toxins*. J. Immunol., 162(8):4550–4559.
- MONSHOUWER, M., R. F. WITKAMP, S. M. NIJMEIJER, L. A. V. LEENGOED, H. C. VERNOOY, J. H. VERHEIJDEN und A. S. V. MIERT (1996a). *A lipopolysaccharide-induced acute phase response in the pig is associated with a decrease in hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism..* J Vet Pharmacol Ther, 19(5):382–388.
- MONSHOUWER, M., R. F. WITKAMP, S. M. NUJMEIJER, J. G. V. AMSTERDAM und A. S. V. MIERT (1996b). *Suppression of cytochrome P450- and UDP glucuronosyl transferase-dependent enzyme activities by proinflammatory cytokines and possible role of nitric oxide in primary cultures of pig hepatocytes..* Toxicol Appl Pharmacol, 137(2):237–244.
- MORTENSEN, R. F., K. BEISEL, N. J. ZELEZNIK und P. T. LE (1983). *Acute-phase reactants of mice. II. Strain dependence of serum amyloid P-component (SAP) levels and response to inflammation..* J Immunol, 130(2):885–889.
- MORTENSEN, R. F., J. SHAPIRO, B. F. LIN, S. DOUCHES und R. NETA (1988). *Interaction of recombinant IL-1 and recombinant tumor necrosis factor in the induction of mouse acute phase proteins..* J Immunol, 140(7):2260–2266.
- MOSCOVIS, S.M., A. GORDON, S. HALL, M. GLEESON, R. SCOTT, J. ROBERTS-THOMSOM, D. WEIR, A. BUSUTTL und C. BLACKWELL (2004). *Interleukin 1-beta responses to bacterial toxins and sudden infant death syndrome*. FEMS Immunol Med Microbiol, 42(1):139–45.
- MOUNTZ, J. D., T. J. BAKER, D. R. BORCHERDING, H. BLUETHMANN, T. ZHOU und C. K. EDWARDS (1995). *Increased susceptibility of fas mutant MRL-lpr/lpr mice to staphylococcal enterotoxin B-induced septic shock..* J Immunol, 155(10):4829–4837.
- MULLAN, RONAN H, B. BRESNIHAN, L. GOLDEN-MASON, T. MARKHAM, R. O'HARA, O. FITZGERALD, D. J. VEALE und U. FEARON (2006). *Acute-phase serum amyloid A stimulation of angiogenesis, leukocyte recruitment, and matrix degradation in rheumatoid arthritis through an NF-kappaB-dependent signal transduction pathway..* Arthritis Rheum, 54(1):105–114.
- MULLER, S. und H. KOHLER (1997). *B cell superantigens in HIV-1 infection*. Int Rev Immunol, 14(4):339–49.
- NAGATA, S. (1997). *Apoptosis by death factor..* Cell, 88(3):355–365.
- NAKANO, H., H. OSHIMA, W. CHUNG, L. WILLIAMS-ABBOTT, C. F. WARE, H. YAGITA und K. OKUMURA (1996). *TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor..* J Biol Chem, 271(25):14661–14664.
- NATHOO, S. A. und T. H. FINLAY (1986). *Immunological and chemical properties of mouse alpha 1-protease inhibitors..* Arch Biochem Biophys, 246(1):162–174.
- NETA, R., S. N. VOGEL, J. D. SIPE, G. G. WONG und R. P. NORDAN (1988). *Comparison of in vivo effects of human recombinant IL 1 and human recombinant IL 6 in mice..* Lymphokine Res, 7(4):403–412.
- NICHANI, A. K., A. MENA, Y. POPOWYCH, D. DENT, H. G. G. TOWNSEND, G. K. MUTWIRI, R. HECKER, L. A. BABIUK und P. J. GRIEBEL (2004). *In vivo immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotide in cattle and sheep..* Vet Immunol Immunopathol, 98(1-2):17–29.
- NORRBY-TEGLUND, A., P. THULIN, B. GAN, M. KOTB, A. MCGEER, J. ANDERSSON und D. LOW (2001). *Evidence for superantigen involvement in severe group a streptococcal tissue infections*. J Infect Dis, 184(7):853–60.
- NOURSADEGHI, M., M. C. BICKERSTAFF, J. R. GALLIMORE, J. HERBERT, J. COHEN und M. B. PEPYS (2000). *Role of serum amyloid P component in bacterial infection: protection of the host or protection of the pathogen..* Proc Natl Acad Sci U S A, 97(26):14584–14589.

- NOWAK, M., G. C. GAINES, J. ROSENBERG, R. MINTER, F. R. BAHJAT, J. RECTENWALD, S. L. MACKAY, C. K. EDWARDS und L. L. MOLDAWER (2000). *LPS-induced liver injury in D-galactosamine-sensitized mice requires secreted TNF-alpha and the TNF-p55 receptor..* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 278(5):R1202–R1209.
- NUMEROF, R. P., J. D. SIPE, E. G. TREHU, C. A. DINARELLO und J. W. MIER (1992). *Suppression of IL-2-induced SAA gene expression in mice by the administration of an IL-1 receptor antagonist..* Cytokine, 4(6):555–560.
- O'BRIEN, D. P., D. E. BRILES, A. J. SZALAI, A. H. TU, I. SANZ und M. H. NAHM (1999). *Tumor necrosis factor alpha receptor I is important for survival from Streptococcus pneumoniae infections..* Infect Immun, 67(2):595–601.
- OGASAWARA, J., R. WATANABE-FUKUNAGA, M. ADACHI, A. MATSUZAWA, T. KASUGAI, Y. KITAMURA, N. ITOH, T. SUDA und S. NAGATA (1993). *Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice..* Nature, 364(6440):806–809.
- OLSSON, N., A. SIEGBAHN und G. NILSSON (1999). *Serum amyloid A induces chemotaxis of human mast cells by activating a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway..* Biochem Biophys Res Commun, 254(1):143–146.
- ORRO, T., S. SANKARI, T. PUDAS, A. OKSANEN und T. SOVERI (2004). *Acute phase response in reindeer after challenge with Escherichia coli endotoxin..* Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 27(6):413–422.
- PALIARD, X., S. WEST, J. LAFFERTY, J. CLEMENTS, J. KAPPLER, P. MARRACK und B. KOTZIN (1991). *Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis.* Science, 253(5017):325–9.
- PARRILLO, J.E. (1993). *Pathogenetic mechanisms of septic shock.* N Engl J Med, 328(20):1471–1477. Review.
- PAYETTE, PAUL J, X. MA, R. D. WEERATNA, M. J. MCCLUSKIE, M. SHAPIRO, R. E. ENGLE, H. L. DAVIS und R. H. PURCELL (2006). *Testing of CpG-Optimized Protein and DNA Vaccines against the Hepatitis B Virus in Chimpanzees for Immunogenicity and Protection from Challenge..* Intervirology, 49(3):144–151.
- PENG, L. (2005). *Signaling in B cells via Toll-like receptors..* Curr Opin Immunol, 17(3):230–236.
- PEPYS, M. B. und M. L. BALTZ (1983). *Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein..* Adv Immunol, 34:141–212.
- PEPYS, M. B., A. C. DASH, R. E. MARKHAM, H. C. THOMAS, B. D. WILLIAMS und A. PETRIE (1978). *Comparative clinical study of protein SAP (amyloid P component) and C-reactive protein in serum..* Clin Exp Immunol, 32(1):119–124.
- PEPYS, M. B., J. HERBERT, W. L. HUTCHINSON, G. A. TENNENT, H. J. LACHMANN, J. R. GALLIMORE, L. B. LOVAT, T. BARTFAI, A. ALANINE, C. HERTEL, T. HOFFMANN, R. JAKOB-ROETNE, R. D. NORCROSS, J. A. KEMP, K. YAMAMURA, M. SUZUKI, G. W. TAYLOR, S. MURRAY, D. THOMPSON, A. PURVIS, S. KOLSTOE, S. P. WOOD und P. N. HAWKINS (2002). *Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis..* Nature, 417(6886):254–259.
- PEPYS, M.B., D. BOOTH, W. HUTCHINSON, J. GALLIMORE, P. COLLINS und E. HOHENESTER (1997). *Amyloid P component. A critical review..* Amyloid: Int J Exp Clin Invest, S. 274–295.
- PERLIK, V., Z. LI, S. GOORHA, L. BALLOU und C. BLATTEIS (2005). *LPS-activated complement, not LPS per se, triggers the early release of PGE2 by Kupffer cells.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 289(2):R332–R339. Epub 2005 Mar 31.
- PFEFFER, K., T. MATSUYAMA, T. M. KÜNDIG, A. WAKEHAM, K. KISHIHARA, A. SHAHINIAN, K. WIEGMANN, P. S. OHASHI, M. KRÖNKE und T. W. MAK (1993). *Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection..* Cell, 73(3):457–467.
- POLDERMAN, KEES H und A. R. J. GIRBES (2004). *Drug intervention trials in sepsis: divergent results..* Lancet, 363(9422):1721–1723.

- POLTORAK, A., X. HE, I. SMIRNOVA, M. Y. LIU, C. V. HUFFEL, X. DU, D. BIRDWELL, E. ALEJOS, M. SILVA, C. GALANOS, M. FREUDENBERG, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI, B. LAYTON und B. BEUTLER (1998). *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene..* Science, 282(5396):2085–2088.
- PRECIADO-PATT, L., R. HERSHKOVIZ, M. FRIDKIN und O. LIDER (1996). *Serum amyloid A binds specific extracellular matrix glycoproteins and induces the adhesion of resting CD4+ T cells..* J Immunol, 156(3):1189–1195.
- RAMADORI, G. und T. ARMBRUST (2001). *Cytokines in the liver..* Eur J Gastroenterol Hepatol, 13(7):777–784.
- RAMADORI, G. und B. CHRIST (1999). *Cytokines and the hepatic acute-phase response..* Semin Liver Dis, 19(2):141–155.
- RAMADORI, G., J. V. DAMME, H. RIEDER und K. H. M. ZUM BÜSCHENFELDE (1988). *Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 beta and tumor necrosis factor-alpha..* Eur J Immunol, 18(8):1259–1264.
- RAY, A., X. GAO und B. K. RAY (1995). *Role of a distal enhancer containing a functional NF-kappa B-binding site in lipopolysaccharide-induced expression of a novel alpha 1-antitrypsin gene..* J Biol Chem, 270(49):29201–29208.
- RAY, B. K. und A. RAY (1997). *Induction of serum amyloid A (SAA) gene by SAA-activating sequence-binding factor (SAF) in monocyte/macrophage cells. Evidence for a functional synergy between SAF and Sp1..* J Biol Chem, 272(46):28948–28953.
- RAYNES, J. G. (1994). *The acute phase response..* Biochem Soc Trans, 22(1):69–74.
- REAP, E. A., D. LESLIE, M. ABRAHAMS, R. A. EISENBERG und P. L. COHEN (1995). *Apoptosis abnormalities of splenic lymphocytes in autoimmune lpr and gld mice..* J Immunol, 154(2):936–943.
- RENSING-EHL, A., S. HESS, H. W. ZIEGLER-HEITBROCK, G. RIETHMÜLLER und H. ENGELMANN (1995). *Fas/Apo-1 activates nuclear factor kappa B and induces interleukin-6 production..* J Inflamm, 45(3):161–174.
- RIEDEMANN, NIELS C, R.-F. GUO und P. A. WARD (2003). *Novel strategies for the treatment of sepsis..* Nat Med, 9(5):517–524.
- ROGERS, J. T., K. R. BRIDGES, G. P. DURMOWICZ, J. GLASS, P. E. AURON und H. N. MUNRO (1990). *Translational control during the acute phase response. Ferritin synthesis in response to interleukin-1..* J Biol Chem, 265(24):14572–14578.
- ROMAN, M., E. MARTIN-OROZCO, J. S. GOODMAN, M. D. NGUYEN, Y. SATO, A. RONAGHY, R. S. KORNBLOTH, D. D. RICHMAN, D. A. CARSON und E. RAZ (1997). *Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants..* Nat Med, 3(8):849–854.
- ROVERE, P., G. PERI, F. FAZZINI, B. BOTTAZZI, A. DONI, A. BONDANZA, V. S. ZIMMERMANN, C. GARLANDA, U. FASCIO, M. G. SABBADINI, C. RUGARLI, A. MANTOVANI und A. A. MANFREDI (2000). *The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells..* Blood, 96(13):4300–4306.
- SCHINDLER, R., J. MANCILLA, S. ENDRES, R. GHORBANI, S. C. CLARK und C. A. DINARELLO (1990). *Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF..* Blood, 75(1):40–47.
- SCHOTTMÜLLER, H. (1914). *Wesen und Behandlung der Sepsis.* Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med., 31:257–280.
- SELLAR, G. C., K. OGHENE, S. BOYLE, W. A. BICKMORE und A. S. WHITEHEAD (1994). *Organization of the region encompassing the human serum amyloid A (SAA) gene family on chromosome 11p15.1..* Genomics, 23(2):492–495.
- SINGH, PRATI PAL und S. KAUR (2005). *Serum amyloid P-component in murine tuberculosis: induction kinetics and intramacrophage Mycobacterium tuberculosis growth inhibition in vitro..* Microbes Infect.

- SIPE, J. (1999). *Revised nomenclature for serum amyloid A (SAA). Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. Part 2.* Amyloid, 6(1):67–70.
- SIRIPONT, J., J. M. TEBO und R. F. MORTENSEN (1988). *Receptor-mediated binding of the acute-phase reactant mouse serum amyloid P-component (SAP) to macrophages.* Cell Immunol, 117(2):239–252.
- SMITH, C. A., T. FARRAH und R. G. GOODWIN (1994). *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death.* Cell, 76(6):959–962.
- SMYTH, D.S., P. HARTIGAN, W. MEANEY, J. FITZGERALD, C. DEOBALD, G. BOHACH und C. SMYTH (2005). *Superantigen genes encoded by the egc cluster and SaPIbov are predominant among Staphylococcus aureus isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry.* J Med Microbiol., 54(Pt 4):401–411.
- SPARWASSER, T., E. KOCH, R. VABULAS, K. HEEG, G. LIPFORD, J. ELLWART und H. WAGNER (1998). *Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells.* Eur J Immunol, 28:2045–2054.
- SPARWASSER, T., T. MIETHKE, G. LIPFORD, K. BORSCHERT, H. HACKER und K. HEEG ET AL (1997a). *Bacterial DNA causes septic shock.* Nature, 386:336–337.
- SPARWASSER, T., T. MIETHKE, G. LIPFORD, A. ERDMANN, H. HACKER und K. HEEG ET AL (1997b). *Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock.* Eur J Immunol, 27:1671–1679.
- SPARWASSER, T., R. M. VABULAS, B. VILLMOW, G. B. LIPFORD und H. WAGNER (2000). *Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins.* Eur J Immunol, 30(12):3591–3597.
- SPIES, BARBARA, H. HOCHREIN, M. VABULAS, K. HUSTER, D. H. BUSCH, F. SCHMITZ, A. HEIT und H. WAGNER (2003). *Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice.* J Immunol, 171(11):5908–5912.
- STACEY, KATRYN J, G. R. YOUNG, F. CLARK, D. P. SESTER, T. L. ROBERTS, S. NAIK, M. J. SWEET und D. A. HUME (2003). *The molecular basis for the lack of immunostimulatory activity of vertebrate DNA.* J Immunol, 170(7):3614–3620.
- STACEY, K.J., M. SWEET und D. HUME (1996). *Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA.* J Immunol, 157:2116–2122.
- STEEL, D.M. und A. WHITEHEAD (1994). *The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein.* Immunol Today, 15:81–88.
- STEINMAN, R.M., B. GUTCHINOV, M. WITMER und M. NUSSENZWEIG (1983). *Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice.* J. Exp. Med., 157:613–627.
- STEVENS, FRED J (2004). *Hypothetical structure of human serum amyloid A protein.* Amyloid, 11(2):71–80.
- STOPFER, PETER, D. N. MÄNNEL und T. HEHLGANS (2004). *Lymphotoxin-beta receptor activation by activated T cells induces cytokine release from mouse bone marrow-derived mast cells.* J Immunol, 172(12):7459–7465.
- STRISSEL, K. J., M. T. GIRARD, J. A. WEST-MAYS, W. B. RINEHART, J. R. COOK, C. E. BRINCKERHOFF und M. E. FINI (1997). *Role of serum amyloid A as an intermediate in the IL-1 and PMA-stimulated signaling pathways regulating expression of rabbit fibroblast collagenase.* Exp Cell Res, 237(2):275–287.
- STUART, J. und J. T. WHICHER (1988). *Tests for detecting and monitoring the acute phase response.* Arch Dis Child, 63(2):115–117.
- SUMIDA, T., F. YONAHARA, T. MAEDA, E. TANABE, T. KOIKE, H. TOMIOKA und S. YOSHIDA (1992). *T cell receptor repertoire of infiltrating T cells in lips of Sjogren's syndrome patients.* J Clin Invest, 89(2):681–5. Erratum in: J Clin Invest 1992 Jul;90(1):293.
- SZALAI, A. J., A. AGRAWAL, T. J. GREENHOUGH und J. E. VOLANAKIS (1999). *C-reactive protein: structural biology and host defense function.* Clin Chem Lab Med, 37(3):265–270.

- SZALAI, A. J., F. W. VAN GINKEL, S. A. DALRYMPLE, R. MURRAY, J. R. MCGHEE und J. E. VOLANAKIS (1998). *Testosterone and IL-6 requirements for human C-reactive protein gene expression in transgenic mice..* J Immunol, 160(11):5294–5299.
- SZALAI, A. J., F. W. VAN GINKEL, Y. WANG, J. R. MCGHEE und J. E. VOLANAKIS (2000). *Complement-dependent acute-phase expression of C-reactive protein and serum amyloid P-component..* J Immunol, 165(2):1030–1035.
- TAPE, C. und R. KISILEVSKY (1990). *Apolipoprotein A-I and apolipoprotein SAA half-lives during acute inflammation and amyloidogenesis..* Biochim Biophys Acta, 1043(3):295–300.
- TIEGS, G., M. WOLTER und A. WENDEL (1989). *Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice..* Biochem Pharmacol, 38(4):627–631.
- TILG, H., C. A. DINARELLO und J. W. MIER (1997). *IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators..* Immunol Today, 18(9):428–432.
- TOKUNAGA, T., H. YAMAMOTO, S. SHIMADA, H. ABE, T. FUKUDA, Y. FUJISAWA, Y. FURUTANI, O. YANO, T. KATAOKA und T. SUDO (1984). *Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity..* J Natl Cancer Inst, 72(4):955–962.
- TOKUNAGA, T., O. YANO, E. KURAMOTO, Y. KIMURA, T. YAMAMOTO, T. KATAOKA und S. YAMAMOTO (1992). *Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of Mycobacterium bovis BCG induce interferons and activate natural killer cells..* Microbiol Immunol, 36(1):55–66.
- TREY, J. E. und I. KUSHNER (1995). *The acute phase response and the hematopoietic system: the role of cytokines..* Crit Rev Oncol Hematol, 21(1-3):1–18.
- UHLAR, C. M., C. J. BURGESS, P. M. SHARP und A. S. WHITEHEAD (1994). *Evolution of the serum amyloid A (SAA) protein superfamily..* Genomics, 19(2):228–235.
- UHLAR, C. M. und A. S. WHITEHEAD (1999). *Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant..* Eur J Biochem, 265(2):501–523.
- URIELI-SHOVAL, S., R. P. LINKE und Y. MATZNER (2000). *Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states..* Curr Opin Hematol, 7(1):64–69.
- VANHOVE, BERNARD, G. LAFLAMME, F. COULON, M. MOUGIN, P. VUSIO, F. HASPOT, J. TIOLLIER und J.-P. SOULILLOU (2003). *Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody..* Blood, 102(2):564–570.
- VOGELS, M. T., L. CANTONI, M. CARELLI, M. SIRONI, P. GHEZZI und J. W. VAN DER MEER (1993). *Role of acute-phase proteins in interleukin-1-induced nonspecific resistance to bacterial infections in mice..* Antimicrob Agents Chemother, 37(12):2527–2533.
- VRIES, BART DE, S. J. WALTER, T. G. A. M. WOLFS, T. HOCHPIED, J. RÄBINÄ, P. HEERINGA, J. PARKKINEN, C. LIBERT und W. A. BUURMAN (2004). *Exogenous alpha-1-acid glycoprotein protects against renal ischemia-reperfusion injury by inhibition of inflammation and apoptosis..* Transplantation, 78(8):1116–1124.
- VUKMANOVIC-STEJIC, M., B. VYAS, P. GORAK-STOLINSKA, A. NOBLE und D. KEMENY (2000). *Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface functional phenotypes.* Blood, 95(1):231–240.
- WAGNER, H. (2001). *Toll Meets Bacterial CpG-DNA.* Immunity, 10:499–502.
- WAGNER, H., K. HEEG und T. MIETHKE (1992). *T cell mediated lethal shock induced by bacterial superantigens.* Behring Inst Mitt., (91):46–53. Review.
- WAGNER, HERMANN (2002). *Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity..* Curr Opin Microbiol, 5(1):62–69.

- WALDMANN, H. und S. COBBOLD (2001). *Regulating the immune response to transplants: a role for CD4+ regulatory cells*. *Immunity*, 14:399–406.
- WALSH, M. T., A. DIVANE und A. S. WHITEHEAD (1996). *Fine mapping of the human pentraxin gene region on chromosome 1q23*. *Immunogenetics*, 44(1):62–69.
- WANG, C., M. BOGUE, D. ROTH und K. MEEK (1997). *Normal Junctional Diversification of Immune Receptors in p53-Deficient Mice*. *J. Immunol.*, 159:757–762.
- WANG, HUI, E. RAYBURN und R. ZHANG (2005a). *Synthetic oligodeoxynucleotides containing deoxycytidyl-deoxyguanosine dinucleotides (CpG ODNs) and modified analogs as novel anticancer therapeutics*. *Curr Pharm Des*, 11(22):2889–2907.
- WANG, LIMIN, H. A. LASHUEL und W. COLÓN (2005b). *From hexamer to amyloid: marginal stability of apolipoprotein SAA2.2 leads to in vitro fibril formation at physiological temperature*. *Amyloid*, 12(3):139–148.
- WARE, C. F., P. D. CROWE, M. H. GRAYSON, M. J. ANDROLEWICZ und J. L. BROWNING (1992). *Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells*. *J Immunol*, 149(12):3881–3888.
- WEINER, G. J., H. M. LIU, J. E. WOOLDRIDGE, C. E. DAHLE und A. M. KRIEG (1997). *Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(20):10833–10837.
- WERLING, D., F. SUTTER, M. ARNOLD, G. KUN, P. C. TOOTEN, E. GRUYS, M. KREUZER und W. LANGHANS (1996). *Characterisation of the acute phase response of heifers to a prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide*. *Res Vet Sci*, 61(3):252–257.
- WESCHE, DOREEN E, J. L. LOMAS-NEIRA, M. PERL, C.-S. CHUNG und A. AYALA (2005). *Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock*. *J Leukoc Biol*, 78(2):325–337.
- WHETSELL, M., R. MOSLEY, L. WHETSELL, F. SCHAEFER, K. MILLER und J. KLEIN (1991). *Rearrangement and junctional-site sequence analyses of T-cell receptor gamma genes in intestinal intraepithelial lymphocytes from murine athymic chimeras*. *Mol. Cell Biol.*, 11:5902–5909.
- WHITE, J., A. HERMAN, A. PULLEN, R. KUBO, J. KAPPLER und P. MARRACK (1989). *The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice*. *Cell*, 56:27–35.
- WHITEHEAD, A. S., M. C. DE BEER, D. M. STEEL, M. RITS, J. M. LELIAS, W. S. LANE und F. C. DE BEER (1992). *Identification of novel members of the serum amyloid A protein superfamily as constitutive apolipoproteins of high density lipoprotein*. *J Biol Chem*, 267(6):3862–3867.
- WILLIAMS, L. A., W. EGNER und D. N. HART (1994). *Isolation and function of human dendritic cells*. *Int Rev Cytol*, 153:41–103.
- WOOD, C. und S. TONEGAWA (1983). *Diversity and joining segments of mouse immunoglobulin heavy chain genes are closely linked and in the same orientation: implications for the joining mechanism*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:3030–3034.
- WRIGHT, S.D., R. RAMOS, P. TOBIAS, R. ULEVITCH und J. MATHISON (1990). *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. *Science*, 249:1431–1433.
- WUCHERPFENNIG, K.W., J. NEWCOMBE, H. LI, C. KEDDY, M. CUZNER und D. HAFLE (1992). *T cell receptor V alpha-V beta repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions*. *J Exp Med*, 175(4):993–1002.
- XU, L., R. BADOLATO, W. J. MURPHY, D. L. LONGO, M. ANVER, S. HALE, J. J. OPPENHEIM und J. M. WANG (1995). *A novel biologic function of serum amyloid A. Induction of T lymphocyte migration and adhesion*. *J Immunol*, 155(3):1184–1190.
- YAMADA, T. (1999). *Serum amyloid A (SAA): a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness*. *Clin Chem Lab Med*, 37(4):381–388.

- YAMAMOTO, S., E. KURAMOTO, S. SHIMADA und T. TOKUNAGA (1988). *In vitro* augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG.. Jpn J Cancer Res, 79(7):866–873.
- YAMAMOTO, S., T. YAMAMOTO, T. KATAOKA, E. KURAMOTO, O. YANO und T. TOKUNAGA (1992a). *Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity.* J Immunol, 148:4072–4076.
- YAMAMOTO, S., T. YAMAMOTO, S. SHIMADA, E. KURAMOTO, O. YANO, T. KATAOKA und T. TOKUNAGA (1992b). *DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth.* Microbiol Immunol, 36(9):983–997.
- YAMAMOTO, T., S. YAMAMOTO, T. KATAOKA, K. KOMURO, M. KOHASE und T. TOKUNAGA (1994). *Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro.* Jpn J Cancer Res, 85(8):775–779.
- YASUDA, KEI, P. YU, C. J. KIRSCHNING, B. SCHLATTER, F. SCHMITZ, A. HEIT, S. BAUER, H. HOCHREIN und H. WAGNER (2005). *Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways.* J Immunol, 174(10):6129–6136.
- YEUNG, R. S., J. M. PENNINGER, T. KÜNDIG, W. KHOO, P. S. OHASHI, G. KROEMER und T. W. MAK (1996). *Human CD4 and human major histocompatibility complex class II (DQ6) transgenic mice: supersensitivity to superantigen-induced septic shock.* Eur J Immunol, 26(5):1074–1082.
- YIANGOU, M., E. PARASKEVA, C. C. HSIEH, E. MARKOU, P. VICTORATOS, Z. SCOURAS und J. PAPANICOLAOU (1998). *Induction of a subgroup of acute phase protein genes in mouse liver by hyperthermia.* Biochim Biophys Acta, 1396(2):191–206.
- YOKOI, KENJI, L.-C. N. SHIH, R. KOBAYASHI, J. KOOMEN, D. HAWKE, D. LI, S. R. HAMILTON, J. L. ABBRUZZESE, K. R. COOMBES und I. J. FIDLER (2005). *Serum amyloid A as a tumor marker in sera of nude mice with orthotopic human pancreatic cancer and in plasma of patients with pancreatic cancer.* Int J Oncol, 27(5):1361–1369.
- YORK, I.A., A. GOLDBERG, X. MO und K. ROCK (1999). *Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation.* Immunol. Rev., 172:49–66.
- ZAHEDI, K. (1997). *Characterization of the binding of serum amyloid P to laminin.* J Biol Chem, 272(4):2143–2148.
- ZAHEDI, K. und A. S. WHITEHEAD (1993). *Regulation of mouse serum amyloid P gene expression by cytokines in vitro.* Biochim Biophys Acta, 1176(1-2):162–168.
- ZANDMAN-GODDARD, G., M. BLANK, P. LANGEVITZ, L. SLUTSKY, M. PRAS, Y. LEVY, O. SHOVMAN, T. WITTE, A. DORIA, J. ROVENSKY und Y. SHOENFELD (2005). *Anti-serum amyloid component P antibodies in patients with systemic lupus erythematosus correlate with disease activity.* Ann Rheum Dis, 64(12):1698–1702.
- ZHAI, Y., R. GUO, T. L. HSU, G. L. YU, J. NI, B. S. KWON, G. W. JIANG, J. LU, J. TAN, M. UGUSTUS, K. CARTER, L. ROJAS, F. ZHU, C. LINCOLN, G. ENDRESS, L. XING, S. WANG, K. O. OH, R. GENTZ, S. RUBEN, M. E. LIPPMAN, S. L. HSIEH und D. YANG (1998). *LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer.* J Clin Invest, 102(6):1142–1151.
- ZHANG, NING, M. H. AHSAN, A. F. PURCHIO und D. B. WEST (2005). *Serum amyloid A-luciferase transgenic mice: response to sepsis, acute arthritis, and contact hypersensitivity and the effects of proteasome inhibition.* J Immunol, 174(12):8125–8134.
- ZINKERNAGEL, R.M. und P. DOHERTY (1974a). *Characteristics of the interaction in vitro between cytotoxic thymus-derived lymphocytes and target monolayers infected with lymphocytic choriomeningitis virus.* Scand.J.Immunol., 3:287–294.
- ZINKERNAGEL, R.M. und P. DOHERTY (1974b). *Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis.* Nature, 251:547–548.

Danksagung

Zum Schluß möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Mein besonderer und größter Dank gebührt hierbei Herrn Prof Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner, zum einen für die Möglichkeit, am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München diese Arbeit anfertigen zu können, zum anderen für die Überlassung des Themas sowie insbesondere für die gute Betreuung, Förderung und stetige Unterstützung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Miethke für die gute Betreuung.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Dr. Hans Häcker und Herrn Professor Dr. Georg Häcker für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und moralische Unterstützung.

Bei allen anderen Kollegen des Labors „Wagner“, insbesondere bei Dr. Robin Gilbert und Frau Renate Bittlingmaier, möchte ich mich für die ausgezeichnete technische Unterstützung bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Überlassung der TNFRp55-defizienten und LTR/ β -defizienten Mäuse.

Ich danke Herrn Dr. Uwe Gößlar für die unterhaltsame Anleitung bei der Durchführung der Tierexperimente.

Mein Dank gilt auch meinem Vater, der mich zu seinen Lebzeiten stets unterstützte, und meinem Lebenspartner Cornel, den ich während der Anfertigung dieser Arbeit kennen und lieben lernte und der mir große Hilfe bei der graphischen Gestaltung der vorliegenden Arbeit geleistet hat.