

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Chirurgische Klinik und Poliklinik

Klinische Forschergruppe Sepsis

Klinikum rechts der Isar

*Rolle von Zellen des adaptiven Immunsystems zur Immunpathologie  
der polymikrobiellen Sepsis*

**Kay Markus Westenfelder**

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

*Doktors der Medizin*

**genehmigten Dissertation.**

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

**Prüfer der Dissertation:**

- 1. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann**
- 2. apl. Prof. Dr. Th. Chr. Miethke**

**Die Dissertation wurde am 08.04.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch  
die Fakultät für Medizin am 23.09.2009 angenommen.**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Krankheitsbild der Sepsis	1
1.2 Tiermodelle der Sepsis	4
1.3 Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Sepsis	5
1.4 Die Rolle der B-Lymphozyten in der Sepsis	7
1.5 Vorarbeiten zu dieser Arbeit	10
1.5.1 Rolle der B-Zelle in der Frühphase von Entzündungsgeschehen	10
1.5.2 Ziel der Arbeit	10
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1 Bezugsquellennachweis	12
2.2 Medien und Puffer	14
2.2.1 Stammlösungen und Puffer	14
2.2.2 Medien und Reagenzien für die Zellkultur	14
2.3 Zelllinien und Antikörper	15
2.4 Tierexperimentelle Methoden	16
2.4.1 Colon Ascendens Stent Peritonitis	16
2.4.2 Intraperitoneale Injektion Lipopolysaccharide (LPS)	16
2.4.3 Rekonstitution von B-Lymphozyten	16
2.5 Gewinnung von ex vivo Zellen/ Organentnahmen	17
2.5.1 Blutentnahme /Serumgewinnung	17
2.5.2 Gewinnung und Verarbeitung der Peritonealflüssigkeit	17
2.5.3 Organperfusion	17
2.5.4 Milzentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension	17
2.5.5 Lungenentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension	18
2.6 Zellbiologische Methoden	18
2.6.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen	18
2.6.2 In-vitro-Stimulation von Milzzellen	18
2.6.3 Bestimmung der Bakterienzahl in der Bauchhöhle	19
2.6.4 FACS – Durchflusszytometrische Analyse von Antigenen auf der Zelloberfläche	19
2.6.5 Analyse von reaktiven Sauerstoffradikalen ("oxidative Burst")	20

2.6.6 MACS Zellisolation per magnetischer Microbeads	20
2.6.7 CFSE (CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester) Markierung	21
<b>2.7 Proteinanalytische Methoden</b>	<b>21</b>
2.7.1 Organverarbeitung für ELISA	21
2.7.2 Gesamt-Protein-Assay	22
2.8.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA	22
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Einleitung</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Zellaktivierung in der CASP</b>	<b>23</b>
3.2.1 Analyse der Aktivierungsmaker CD69 und CD25 auf CD3 positiven T-Zellen	24
3.2.2 Analyse der Aktivierungsmaker CD69, CD80 und CD86 auf B220 positiven B-Zellen	25
3.2.3 Analyse der Aktivierungsmaker CD69, CD80 und CD86 auf CD11c positiven DC	26
3.2.4 Analyse der Aktivierungsmaker CD69, CD80 und CD86 auf CD11b positiven Zellen	28
<b>3.3 TLR-Stimulation von B-Zellen</b>	<b>31</b>
3.3.1 Analyse der Zytokin-/ Chemokinproduktion der B-Zellen von WT-Mäusen 12h nach TLR-Stimulation	31
3.3.2 Analyse der Zytokin-/ Chemokinproduktion der B-Zellen von MyD88 <sup>-/-</sup> Mäusen 12h nach TLR-Stimulation	32
<b>3.4 Zytokin-/Chemokinanalyse in der CASP RAG1<sup>-/-</sup> vs. WT</b>	<b>33</b>
3.4.1 Systemische Zytokin-/ Chemokinbestimmung	33
3.4.2 Zytokin-/ Chemokinbestimmung im Lebergewebe	34
3.4.3 Zytokin-/ Chemokinbestimmung im Lungengewebe	34
3.4.4 Zytokin-/ Chemokinbestimmung im Milzgewebe	35
3.4.5 Zytokin-/ Chemokinbestimmung im Nierengewebe	36
3.4.6 Zytokin-/ Chemokinbestimmung in der Peritonealflüssigkeit	37
<b>3.5 Rekonstitutionsvorversuch</b>	<b>38</b>
<b>3.6 Überlebensexperiment B-Zell-Rekonstitution in RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse</b>	<b>39</b>
<b>3.7 Zytokin-/ Chemokinbestimmung B-Zell-Rekonstitution in RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen</b>	<b>40</b>
3.7.1 Systemische Zytokinbestimmung im Serum	41
3.7.2 Zytokinbestimmung im Lebergewebe	41
3.7.3 Zytokinbestimmung im Lungengewebe	42
3.7.4 Zytokinbestimmung im Milzgewebe	42
3.7.5 Zytokinbestimmung im Nierengewebe	43
3.7.6 Zytokinbestimmung in der Peritonealflüssigkeit	43

<b>3.8 Bakterienlast der Peritonealflüssigkeit 12h nach CASP</b>	<b>44</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>46</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>58</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>64</b>
8.1 Abbildungen	64
8.2 Tabellen	65
<b>9. Danksagung</b>	<b>66</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>67</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Krankheitsbild der Sepsis

---

Die Sepsis ist eine systemische Antwort auf ein entzündliches Geschehen. Sie gilt als klinisch definiert wenn mindestens zwei der folgenden vier Punkte erfüllt sind und zusätzlich eine Bakteriämie besteht:

- Hyperthermie bzw. Hypothermie
- Tachykardie
- Tachypnoe bzw. Hypokapnie ( $p\text{CO}_2 < 32 \text{ mm Hg}$ )
- Leukozytose, Leukozytopenie

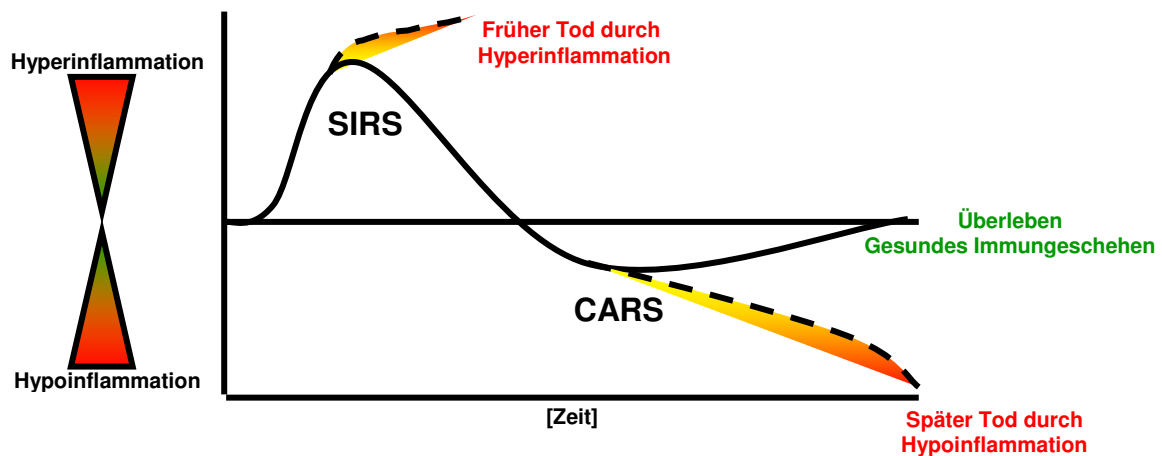
Vom Krankheitsbild der schweren Sepsis spricht man, wenn mindestens das Versagen eines Organs hinzukommt, tritt zusätzlich eine auf Volumengabe nicht ansprechende Hypotension auf, handelt es sich um einen septischen Schock.

Bei allen Formen treten mehr oder minder Symptome wie disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), Trombozytopenie, Vasodilatation und andere metabolische Störungen auf, letztendlich führt die Krankheit häufig über multiples Organversagen und Schock zum Tod.

Auch heute, unter Einbezug neuester Therapieformen wie der Gabe von aktiviertem Protein C (Drotrecogin Alpha, Xigris<sup>®</sup>) oder der EGDT (Early Goal-Directed Resuscitation Therapy) und klassischer Methoden wie chirurgischer Focussanierung und Antibiotikagabe kann die Mortalität bei der Sepsis auf Intensivstationen kaum unter 30% gesenkt werden, einige Patientengruppen weisen jedoch weitaus höhere Sterberaten auf (Rivers, McIntyre et al. 2005).

Im Rahmen der Therapiefindung stellt sich auch heute noch die Frage nach dem vollständigen Wissen um die Pathophysiologie der Sepsis. So vermutete man anfangs, es handele sich hierbei einzig um eine massive, systemische Hyperinflammation, primär induziert durch Erreger-assoziierte Bestandteile wie Lipopolysacchrid (LPS), Cytosin-Phosphat-Guanin- Motive bakterieller DNA (CpG) und andere. Diese würden bei Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs) die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 oder IL-6 induzieren (Thijs and Hack 1995) (van Deventer, Buller et al. 1990) was sich letztendlich in einer massiven, systemischen Entzündungsreaktion widerspiegeln würde. Diese massive, unkontrollierte Entzündung induziert dann Organschäden und führt letztendlich zum Tod. Die Hyperinflammation ist in der Tat ein wichtiger Bestandteil der Sepsis. Antiinflammatorische Therapieansätze waren jedoch bis

heute wenig effektiv, so wird beispielsweise in einer Metaanalyse von Reinhart et al. ein maximaler Überlebensvorteil von 3-6% bei Gabe von antiinflammatorischen TNF- $\alpha$ -Antikörpern angegeben (Reinhart and Karzai 2001). Nähere Analysen ergaben eine weitere, wichtige Komponente der septischen Reaktion. Als Reaktion auf die Inflammation – SIRS (systemic inflammatory response syndrome) erfolgt eine starke Aktivierung antiinflammatorischer, immunsuppressiver Prozesse – CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome). Diese bergen ebenfalls ein großes Gefahrenpotential für den Sepsispatienten. Die Immunschwäche vermindert die Fähigkeit zur Erregerabwehr, kann sich zu einer fulminanten Immunschwäche ausweiten und im späteren Verlauf zum Tode des Patienten wegen fehlender Wirtsabwehr führen. (Kox, Volk et al. 2000) (Abb. 1).



**Abb. 1 Pathogenese der Sepsis (Modifiziert nach Kox et al. 2000)**

SIRS = systemic inflammatory response syndrome

Frühes Versterben des Patienten am septischen Schock durch hyperinflammatorisches Geschehen.

CARS = compensatory anti-inflammatory response syndrome

Spätes Versterben durch Immunsuppression im Verlauf der Sepsis.

Diese Immunsuppression wird unter anderem durch die Suppression von Leukozyten mit Zytokinen erreicht, als Antwort auf diesen Reiz exprimieren die Leukozyten antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, IL13 und TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta). Dies hat eine Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine bei Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen zur Folge (van der Poll 2001) was sich in einer reduzierten Erregerabwehr des Patienten widerspiegelt.

Das im Rahmen des CARS auftretende Bild der monozytären Dysfunktion als Ursache für eine gesteigerte Mortalität bei der postoperativen Sepsis setzt sich auch in der Expression von MHC (Major Histocompatibility Complex) Klasse II Molekülen fort. Patienten mit verminderter monozytärer MHC II Produktion und somit verminderter Antigenpräsentation

zeigten einen Trend für ein schlechteres Outcome in der Sepsis (Heidecke, Weighardt et al. 2000).

Bezüglich der Frage, ob man das Outcome der Sepsis-Patienten vor einer Operation prognostizieren könnte, zeigten Studien von Weighardt et al., dass die Fähigkeit der Monozyten septischer Patienten, IL-12, IL-10, und IL-1 $\beta$  zu produzieren, eine wichtige Rolle für deren Überleben darstellt. So konnte für Patienten mit einer schon im Voraus verminderten monozytären Interleukinproduktion eine höhere Mortalität durch postoperative Sepsis als bei Patienten mit regulärer Monozyten-Funktion registriert werden (Weighardt, Heidecke et al. 2000).

Man kann davon ausgehen, dass es im Verlauf der Sepsis zu einer sensiblen Verzahnung pro und antiinflammatorischer Prozesse kommen muss, deren Ausmaß und zeitliche Abfolge maßgeblich für den Ausgang der Krankheit sind. Neben einer separaten Hyper- bzw. Hypoinflammation gibt es auch das Antagonistische Reaktionssyndroms (Mixed Antagonistic Response Syndrome = MARS), einen Zustand, in dem sich kurze pro- als auch antiinflammatorische Phasen abwechseln (Kox, Volk et al. 2000; Muller-Werdan 2003).

Ebenfalls von großer Bedeutung ist das Gerinnungssystem, welches durch die Ausschüttung von proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 über TF (tissue factor) aktiviert wird (Aird 2001). Im Verlauf massiver systemischer Entzündungen werden disseminierte intravasale Gerinnungsreaktionen (DIC – disseminated intravascular Coagulation) ausgelöst und führen über den Verschluss der Gewebskapillaren zu hypoxie-bedingten Gewebnekrosen bis hin zu irreversiblen Organschäden (Thijs, de Boer et al. 1993).

Die Sepsis stellt also ein „außer Kontrolle geraten“ der normalerweise vorherrschenden Regulationskapazität zwischen Entzündung und Entzündungshemmung („host defense failure“) dar.

So wird über die massive Aktivierung von NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) in Makrophagen und Monozyten (Bohrer, Qiu et al. 1997) eine Reihe proinflammatorischer Mediatoren, wie TNF- $\alpha$  (Beutler, Milsark et al. 1985; Echtenacher, Falk et al. 1990), IL1- $\beta$  (Ohlsson, Bjork et al. 1990), IL-6, MIF („macrophage migration inhibitory factor“) (Calandra, Echtenacher et al. 2000) und HMGB<sub>1</sub> („high mobility group box protein1“) (Wang, Yang et al. 2001) sowie eine Reihe von Adhäsionsmolekülen und Sauerstoffradikalen produziert. Auch das Gerinnungssystem wird über Wechselwirkungen mit der Entzündungskaskade angeregt. Dies alles endet in einer überschießenden Immun- und Gerinnungsaktivierung. Mit fortschreitendem Verlauf der Sepsis versucht der Körper über antiinflammatorische Prozesse gegen zu regulieren, woraus eine Immunsuppression mit unzureichender Infektabwehr,

Gewebeschädigung, MOF („multi organ failure“) und letztendlich dem Tod des Patienten resultiert. (Hörner, Bouchon et al. 2004)

Bei etwa 60.000 Todesfällen allein durch das Krankheitsbild Sepsis in Deutschland (Marx, Schuerholz et al. 2005), sollte die Aufklärung der Pathophysiologie weiterhin als wichtiges Ziel gesehen werden, um dann gezielter in das Komplexe System eingreifen zu können.

## 1.2 Tiermodelle der Sepsis

---

Im Rahmen pathophysiologischer Untersuchungen zum Thema Sepsis galt es, ein möglichst aussagekräftiges Mausmodell für das Krankheitsbild zu finden. Sicherlich die einfachste Möglichkeit, ein sepsisähnliches Krankheitsbild zu erzeugen ist die intraperitoneale Injektion von Lipopolysaccharid (LPS), Membranbestandteilen von Bakterien oder ganzen Bakterien. Der durch LPS bzw. Bakterien ausgelöste Schock simuliert jedoch nur Teile einer ausgeprägten Sepsis, da zum Beispiel ein andauernder septischer Focus fehlt (Bone 1991; Beutler and Rietschel 2003). Auf dieser Basis erarbeitete Therapieprinzipien sind bei der Übertragung auf Patienten daher eventuell wenig effektiv (Maier, Traeger et al. 2004).

Um wirkungsvollere Therapien entwickeln zu können, wurden komplexere Tiermodelle zur Simulation einer fulminanten Sepsis entwickelt. Wichtig war hier die Möglichkeit, einen beständigen Fokus zu erzeugen. Das Model der Cecal Ligation and Puncture (CLP) besteht aus einer unter Anästhesie durchgeführten Laparotomie bei der das Zökum 15mm proximal der Ileozökalklappe mit einem chirurgischen Faden ligiert und anschließend mit einer Nadel perforiert wird. Der Focus entsteht hier durch Auspressen von Darminhalt durch die Perforation.

Besonderer Aspekt dieses Modells ist sicherlich ein Wiederverschluss des Darmdefekts durch Aszitesbildung (Maier, Traeger et al. 2004).

Um dieses Problem zu lösen und einen dauerhaften Focus zu erzeugen wurde das Modell der Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) entwickelt (Zantl, Uebe et al. 1998) Im Unterschied zur CLP wird hier in 10mm Entfernung von der Ileozökalklappe ein dünner Stent in die Darmwand eingebracht. Dieser sorgt für einen ständigen Austritt von Darminhalt in die Bauchhöhle, so wie es auch bei Patienten mit z.B. perforierten Hohlorganen zu erwarten wäre. In einer vergleichenden Arbeit wurde gezeigt, dass das Modell der CLP eher dem Krankheitsbild eines intraabdominellen Abszesses entspricht, hingegen die CASP der diffusen Peritonitits tatsächlich recht nahe kommt. (Maier, Traeger et al. 2004)



Ein weiterer Vorteil der CASP, neben dem bestehenden septischen Focus, ist die Möglichkeit den Stent operativ wieder entfernen zu können. Dies simuliert die chirurgische Focussanierung, was auch heute noch einen wichtigen Bestandteil der Sepsistherapie darstellt.

### **1.3 Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Sepsis**

---

Das angeborene Immunsystem ist ein Mechanismus, der in kurzer Zeit ohne Anpassung auf nahezu jedes Pathogen mit der Auslösung einer Immunantwort reagieren kann. Zusätzlich gibt es auch Induktionsmöglichkeiten für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort.

Im Normalfall leistet das angeborene Immunsystem einen Grossteil der körpereigenen Abwehrarbeit gegen Pathogene unterschiedlichster Art. Phylogenetisch einfache Organismen wie zum Beispiel Insekten besitzen nur das angeborene Immunsystem, das erworbene Immunsystem der Wirbeltiere ist hingegen eine spätere Entwicklung der Evolution. Somit ist es nicht verwunderlich, dass auch beim Menschen bis zu 99% der Infektionen über das angeborene Immunsystem beherrscht werden können (Hörner, Bouchon et al. 2004).

Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und Natürliche Killer- (NK-) Zellen stellen die wichtigsten Zellen des angeborenen Immunsystems dar. Über sog. „pattern recognition receptors“ (PRRs) können unterschiedliche, für Pathogene spezifische „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) erkannt werden.

Komponenten dieser Erkennungsmechanismen sind humorale Komponenten wie C-reaktives Protein, Mannose-Bindungsprotein, LPS-Bindungsprotein und Komplement sowie zelluläre Proteine wie Mannose-, Scavenger-, LPS- und Komplement-Rezeptoren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß Rezeptoren mit Homologie zum Drosophila Toll Protein (Toll-like Receptors, TLR) (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997) eine wichtige Rolle bei der Erkennung mikrobieller Strukturen und der dadurch ausgelösten Zellaktivierung spielen. Im Gegensatz zu den oben genannten Strukturen können diese Signale weiterleiten und komplexere Immungeschehen auslösen. Beim Menschen sind heute 11 verschiedene TLR-Rezeptoren bekannt (Akira and Takeda 2004), die verschiedene bakterielle oder virale Strukturkomponenten erkennen können (Tab.1).

<b>Tab.1 Toll-Like Rezeptoren und ihre Liganden</b>		
<b>Rezeptor</b>	<b>Ligand</b>	<b>Herkunft der Liganden</b>
TLR1	Triacyl Lipopeptide Lösliche Faktoren	Bakterien und Mycobakterien Neisseria meningitidis
TLR2	Lipoproteine/Lipopeptide Peptidoglycane Lipoteichonsäuren Lipoarabinomannane Phenol-lösliches Modulin Glycoinositolphospholipide Glycolipide Porine Atypische Lipopolysaccharide Atypische Lipopolysaccharide Zymosan Hitzeschockprotein 70''	Diverse Pathogene Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mycobakterien Staphylokokkus epidermidis Trypanosoma cruzi Treponema maltophilum Neisserien Leptospira interrogans Porphyromonas gingivalis Pilze Wirt
TLR3	Doppelsträngige DNA	Viren
TLR4	Lipopolysaccharide Taxol Fusionsproteine „Envelope“ Proteine Hitzeschockprotein 60'' Hitzeschockprotein 70'' Typ III repeat extra Domäne A von Fibronectin Oligosaccharide von Hyaluronsäuren Polysaccharidfragmente von Heparinsulfat Fibrinogen	Gram-negative Bakterien Pflazen Respiratory syncytial virus Mouse mammary-tumor virus Chlamydia pneumoniae Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Diacyl Lipopeptide Lipoteichonsäuren Zymosan	Mycoplasmen Gram-positive Bakterien Pilze
TLR7	Imidazoquinoline Loxoribine Bropirimine Einzelstrang RNA	Synthetische Verbindung Synthetische Verbindung Synthetische Verbindung Viren
TLR8	Imidazoquinole Einzelstrang RNA	Synthetische Verbindung Viren
TLR9	CpG DNA	Bakterien u. Viren
TLR10	Unbekannt	Unbekannt
TLR11	Unbekannt	Uropathogene Bakterien

modifiziert nach Akira et al. 2004

Nach Bindung des spezifischen PAMP-Liganden an den TLR erfolgt mittels intrazellulärem Signaling die Rekrutierung von MyD88. Dies führt zur Aktivierung von NFκB über die Rekrutierung von IRAK-Kinasen und TRAF6. Ein zweiter Signalweg führt von der Rekrutierung von TRIF entweder über TRAF6 ebenfalls zu NFκB oder über IRF3 zur Bildung von IFN-β. Der MyD88 Signalweg erfolgt bei allen TLRs außer TLR3, der TRIF-Signalweg nur bei TLR4 und TLR3 (siehe Abb. 2).

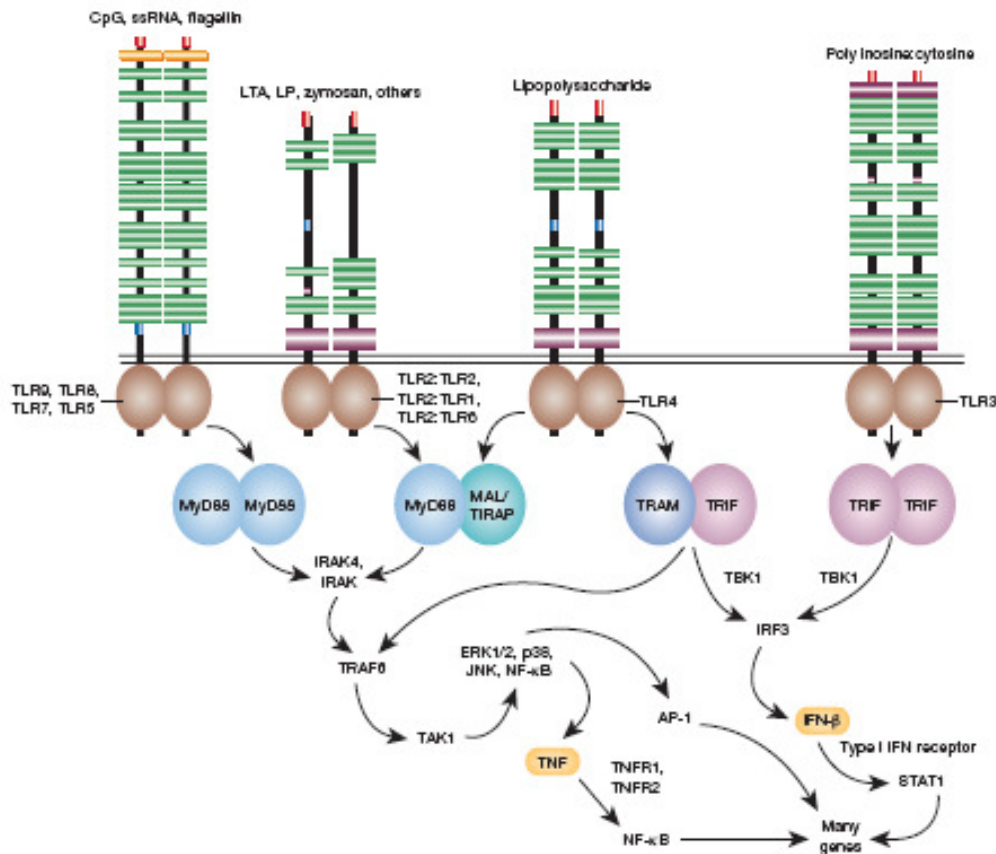


Abb. 2 Wesentliche Beziehungen zwischen TLRs, Adapter-Proteinen, sowie verknüpfte Kinasen und deren Signaling Effekte (Beutler 2004).

Die durch TLRs aktivierten, proinflammatorischen sowie regulatorischen Gene kodieren für zahlreiche Zytokine, Chemokine und antimikrobielle Peptide. Für die Aktivierung und Reifung dendritischer Zellen sind die Rezeptoren der Toll-Like Familie ebenfalls von großer Bedeutung. Die DC-Reifung äußert sich unter anderem in der Hochregulation von kostimulatorischer Aktivität und MHC II Molekülen was somit ein wichtiges Bindeglied zur T-Zell-Aktivierung und somit dem adaptiven Immunsystem darstellt (Schnare, Barton et al. 2001).

Zusammenfassend führt die Aktivierung der TLRs zu Phagozytose, Ausschüttung von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden sowie zur Aktivierung des Komplement Systems und der Gerinnungskaskade. Zudem findet über die Antigen präsentierenden MHC Moleküle eine Aktivierung des erworbenen Immunsystems statt.

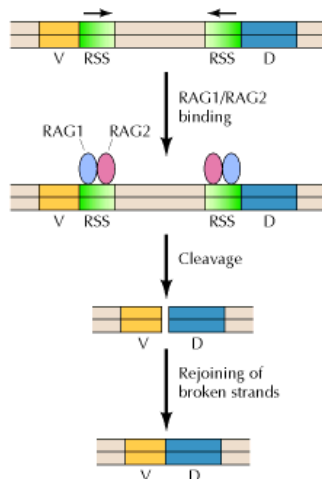
### 1.4 Die Rolle der B-Lymphozyten in der Sepsis

B- und T-Lymphozyten sind Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Das adaptive Immunsystem ist ein antigenspezifischer Abwehrmechanismus und vermittelt das

immunologische Gedächtnis. Um spezifische Pathogene adäquat beseitigen zu können, benötigt es eine Vorlaufzeit von einigen Tagen.

B-Zellen haben ihren Ursprung im Knochenmark, für deren Reifung ist die Umgebung der Stromazellen des Knochenmarks notwendig. Der Name B-Zelle leitet sich von der Bursa fabricius ab, einem in Vögeln vorkommendem Thymus-artigen Organ der B-Zell-Reifung(Ollila and Vihinen 2005). So entwickelt sich hier aus lymphatischen Stammzellen erst die frühe Pro-B-Zelle, anschließend die späte Pro-B-Zelle, die Prä-B-Zelle und mit zunehmender Reifung wandern die unreifen B-Zellen dann in die peripheren lymphatischen Organe wie Milz und Lymphknoten ab. Dort entwickelten sie sich zu reifen B-Zellen. Während dieses Reifungsprozesses kommt es zu einer Reihe wichtiger Modifikationen. Zu nennen wäre hier die Entwicklung der Antikörpervielfalt. Im Normalfall besitzt der Mensch ein Antikörperrepertoire von bis zu  $10^{11}$  unterschiedlichen Antikörpern, die von einer gleichen Zahl reifer B-Zellen produziert werden müssen (Janeway, Travers et al. 2001). Lange war es nicht zu erklären, wie aus einer relativ geringen Anzahl menschlicher Gene eine so große Vielfalt unterschiedlicher Antikörper kodiert werden kann. Heute kann dies über eine Reihe geschickter Rekombinationsprozesse erklärt werden.

Nach der Theorie der somatischen Diversifikation wird eine begrenzte Zahl vererbter Gensequenzen, die für die Immunglobuline kodieren, Veränderungen und Neuarrangierungen unterzogen.



**Abb. 3: V(D)J-Rekombination (mod. nach G. M. Cooper 2000).**

Das kodierende Segment des Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor gens (hier V und D Segment) sind von kurzen „Rekombinanten Signal Sequenzen“ (RSS) flankiert. Diese sind am 5' und am 3'Ende umgekehrt angeordnet. Das RSS wird von lymphozytenspezifischen, rekombinanten Proteinen RAG1 und RAG2 erkannt, die DNA an dieser Stelle zerschnitten. Die Schnittstellen werden dann zu einem neu arrangierten Gensegment zusammengefügt.

So werden die für die variable Region (V-Region, V-Domäne) der Antikörper kodierenden Gensequenzen in einem V(D)J-Rekombination genannten Prozess umgelagert und neu verknüpft. Zuständig hierfür ist hauptsächlich ein Enzymkomplex, der durch die Gene RAG-1 und RAG-2 (RAG = rekombinationsaktivierende Gene) kodiert wird (Abb. 3).

Defekte in diesen Genen verhindert die Ausbildung reifer, Antikörper produzierender B-Zellen. Da die sehr verwandte Reifung der TCRs (T-Zell Rezeptoren) ebenfalls von RAG abhängig ist werden im Falle einer Fehlfunktion ebenfalls keine Reifen T-Zellen gebildet. Je nach Ausprägung des Defekts kommt es zum

Krankheitsbild des Omenn Syndrom oder zu einer fulminanten Immundefizienz – SCID („severe combined immune deficiency“) (Notarangelo, Villa et al. 1999).

Insgesamt vier Mechanismen sind für die Entstehung der Antikörpervielfalt nötig, drei davon betreffen die B-Vorläuferzellen in den zentralen, lymphatischen Organen, der vierte findet in Form von somatischen Hypermutationen ausschließlich in reifen B-Zellen in der Peripherie statt. Durch Punktmutationen in den V-Domänen werden bei letzterer strukturell veränderte B-Zell Rezeptoren auf der äußeren Zellmembran exprimiert. In manchen Fällen führt dies zu einer Steigerung der Affinität der B-Zell-Rezeptoren einer Zelle zum Antigen, sie wird selektiert und reift zur antikörpersezernierenden Zelle aus. Ohne die somatische Hypermutation wäre zwar eine immens große Diversität an Antikörpern gegeben, die hohe Affinität der Antikörper wird jedoch erst mit diesem Mechanismus erreicht.

Nach klassischer Ansicht wird das adaptive Immunsystem erst Tage nach dem Eindringen eines Pathogens in den Körper aktiv. Die komplexen Anpassungs- und Aktivierungsvorgänge verhindern ein schnelles Eingreifen.

In den letzten Jahren hat sich jedoch gezeigt, dass die Rolle der Lymphozyten in der frühen Phase der Sepsis durchaus nicht zu vernachlässigen ist. Arbeiten von Hotchkiss et al. zum Apoptoseverhalten der Lymphozyten in der Sepsis brachten entscheidende Erkenntnisse.

Es konnte gezeigt werden, dass B- und T-Zellen während der Sepsis schnell apoptotisch werden. Bei der Induktion der Apoptose werden Caspasen (Cystein-Aspartyl-Proteasen) aktiviert, die mittels Proteolyse wichtige Strukturproteine der Zellen abbauen und somit zu deren Zerfall führen. Verhindert man den programmierten Zelltod der Lymphozyten durch Gabe von Caspaseinhibitoren (hier Caspase-3 Inhibitoren) bzw. setzt man transgene Mäuse die das antiapoptotische Proteins bcl-2 überexprimieren ein, zeigen die behandelten Tiere ein signifikant besseres Überleben in Sepsis-Experimenten als die unbehandelten Kontrollen. Weitere Analysen zeigen vor allem eine deutliche Reduktion der Bakterienbelastung im Blut der behandelten Mäuse, einen für den Ausgang der Sepsis entscheidenden Parameter. Da die Ergebnisse in der frühen Phase der Sepsis und somit vor dem Einsetzen der klassischen Funktionen der Lymphozyten (Antikörperbildung etc.) registriert werden konnten machen die Autoren vor allem Interaktionsmechanismen zwischen den Lymphozyten und den Zellen der angeborenen Immunantwort verantwortlich (Hotchkiss, Chang et al. 2000).

Wie wichtig B- und T-Zellen für die Erregerabwehr sind, verdeutlicht auch die extreme Infektanfälligkeit bei Patienten mit z.B. AIDS (acquired immune deficiency syndrome) (Rosen and Narasimhan 2006), Omenn Syndrom (RAG defekt) bzw. SCID (Cristina Sotgiu 2006).

## 1.5 Vorarbeiten zu dieser Arbeit

### 1.5.1 Rolle der B-Zelle in der Frühphase von Entzündungsgeschehen

Ausgehend von diesen Befunden sowie unseren Vorarbeiten galt es, die neuen Aspekte zur Rolle der B- und T-Lymphozyten in der Sepsis genauer zu untersuchen.

Zur Durchführung einer Reihe von Sepsis-Überlebens-Experimenten unserer Arbeitsgruppe mit RAG1-defizienten Mäusen, wurden diese im CASP Modell untersucht.

Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Empfindlichkeit der RAG1<sup>-/-</sup> Knockouts zu Tieren aus der WT Kontrollgruppe. Während in der Kontrollgruppe immerhin 60% der Mäuse bis

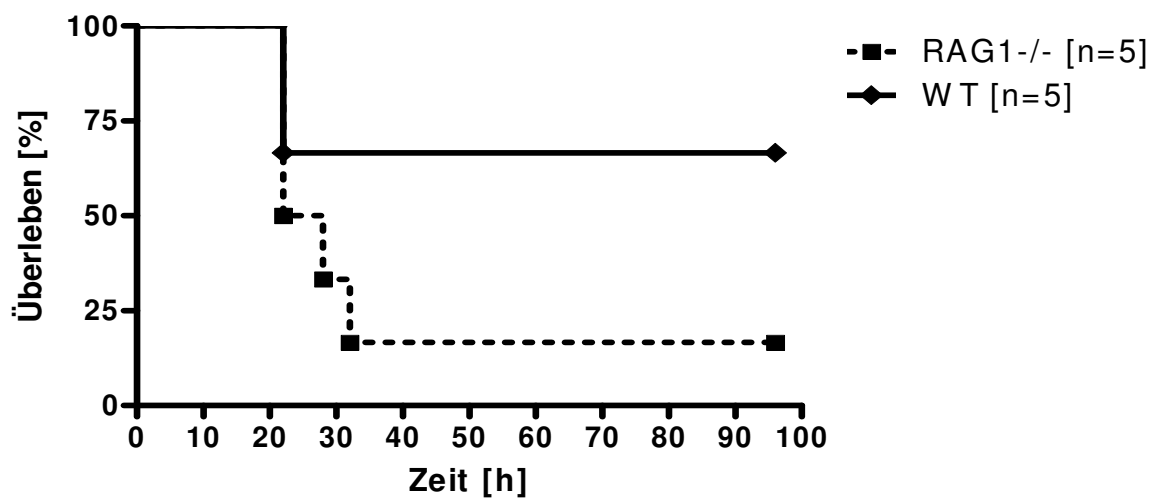


Abb. 4: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier - RAG1<sup>-/-</sup> vs. WT im CASP-Modell. Nach CASP-Operation versterben binnen 30h über 75% der RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse und 40% der Kontrolltiere.

zum Ende des Experiments nach 96h überlebten, starben alle Tiere aus der RAG1<sup>-/-</sup> Gruppe binnen 30h (Abb.4).

Im Rahmen weiterer Analysen entschieden wir uns zu einer genaueren Betrachtung der Immunpathologie B-Zellen in der Sepsis.

### 1.5.2 Ziel der Arbeit

Auch heute noch stellt das Management der Sepsis den behandelnden Arzt vor große Probleme. Selbst mit neusten Therapieansätzen konnte die Letalität nicht unter 30% gesenkt werden (Rivers, McIntyre et al. 2005), so dass das Verständnis der Immunpathophysiologie der Sepsis weiterhin ein wichtiges Ziel bleibt.

Die oben beschriebenen Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe dienten als Grundlage für das Thema der Arbeit. So sollte die Funktion der B-Lymphozyten in der frühen Phase der

peritonealen Sepsis am Mausmodell genauer untersucht werden. Auch die Klärung der Funktion einzelner Subpopulationen der B-Zellen sollte in die Arbeit einfließen.

Hierfür sollten zunächst die regulären Funktionen der Milzzellen mittels FACS analysiert werden. Die Aktivierung der Zellen sollte teils *ex vivo* per LPS, teils *in vivo* per intraperitoneal induziertem LPS-Schock bzw. CASP-OP erfolgen.

Um auch genauere Einblicke in die Zytokinproduktion der aktivierten Zellen auf RNA (Ribonukleinsäure) - sowie Protein-Ebene zu erhalten sollte diese mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) bzw. quantitativer PCR und ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ermittelt werden.

In einem zweiten Schritt sollten die durch die Arbeitsgruppe bereits aufgedeckten Differenzen zwischen RAG1-defizienten Mäusen ohne reife B-/T-Zellen und den WT-Mäusen mit gesunder Immunität nach einer CASP-OP genauer erörtert werden. Dabei gestalteten sich die Experimente hierbei analog zu Schritt1.

In einer dritten Phase galt es die RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse vor CASP Überlebensexperimenten mit aufgereinigten B-Zellen aus WT Mäusen zu rekonstituieren. Es galt zu herauszufinden, ob die Unterschiede zwischen den RAG1<sup>-/-</sup> und den WT Mäusen wie vermutet, hauptsächlich durch die B-Zellen in der Frühphase der Immunantwort zu erklären sind. Jedoch sollte nicht allein die Auswirkung der B-Zellen auf das Überleben der Tiere sondern auch deren Auswirkungen auf die Zytokinproduktion in den einzelnen Organen dargestellt werden. Hierfür sollten erneut CASP-OPs an RAG1<sup>-/-</sup> sowie WT Mäusen durchgeführt werden. Die *ex vivo* Untersuchungen sollten nach 12h erfolgen. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde, dass die Sepsis hier voll ausgeprägt ist.

## 2. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen und Geräte aufgeführt. Dazu gehören Puffer und Stammlösungen, Zelllinien, Antikörper und Tiere. Weiterhin werden Methoden für die Durchführung der Experimente beschrieben.

### 2.1 Bezugsquellennachweis

Chemikalien, die für die Durchführung der Experimente von Bedeutung sind, werden im Folgenden mit der entsprechenden Bezugsquelle aufgeführt.

**Tab. 2 Chemikalien**

BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
DHR (Dihydrorhodamin)	Sigma, Taufkirchen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Seromed, Biochrom, Berlin
HBSS	Sigma, Taufkirchen
Heparin	Sigma, Taufkirchen
LPS Serotyp 0127:B8	Sigma, Taufkirchen
Phenol, Tris-gepuffert	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen

Alle hier nicht aufgeführten Substanzen wurden von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

**Tab. 3 Filter, Filme, Gefäße, Sonstiges**

Auftrennsäule MACS, LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladb.
Sterilfilter 70µm, 100µm, Nylon	Becton Dickinson, USA
(Transwell-Filtersystem	Costar, Beinheim
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Nahtmaterial Ethilon 4/0 u. 7/0	Ethicon, Norderstedt/Glashütte
Zellkulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunclon, Dänemark
	Becton Dickinson, USA
	TPP, Peske, Aindling-Pichl



**Tab. 4 Reagenziensammlung („Kits“)**

Enzym-linked-Immuno-Assay (ELISA) Quantikine Kits (mouse): IL-10, IL-12/IL-23 p40, JE/MCP-1, KC, TNF- $\alpha$	R&D Systems, Wiesbaden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
MACS Microbeads (mouse): CD11b ,CD11c, CD45R/B220, CD90/Thy1.2	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladb.

**Tab. 5 Geräte**

Computer	Sony VGN-FE41S, Sony, Deutschland Acer Travelmate 4000, Acer, USA Apple Macintosh G4/ G5, Apple, USA Maxtdata, Maxdata, Germany
Eukaryontische Zellkultur - Brutschrank	BB6220CU/CO <sub>2</sub> , Kendro Laboratory Products GmbH, München
ELISA- "Reader"	Mithras LB 940, Berthold Tech., Pforzheim
ELISA- "Wascher"	SLT, Tecan SLT, Labinstruments, Crailsheim
Fluoreszenz-Zellsorter	FACSCalibur, Becton Dickinson, USA
Kühlzentrifuge	Rotana 460 R, Hettich, Tuttlingen Beckmann J2-21, Palo Alto, U.S.A. Biofuge 28RS, Heraeus, Hanau Megafuge 2.0 R, Heraeus, Hanau
Mikroskop	ID 03, Zeiss, Deutschland Axiolab, Zeiss, Deutschland
pH-Meter	761 Kalimatic, Knick
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Rotationsrad	Renner, Darmstadt
Schüttler	Innova 4230, Refridgerated Inkubator New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Spannungsquellen	Power Pack P25, Biometra, Göttingen
Sterilbank,	Herasafe Kendro Laboratory Products GmbH, München
Realtime PCR	7300 Real Time PCR System Applied Biosystems
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415 R
Videophotographie	Gel Doc 1.000, Bio-Rad, München
Vortexer	Minishaker MS11, IKA Works Inc., USA
Waagen	Satorius, Göttingen
Wasserbäder	Köttermann Labor Technik
Zellhomogenisator	Ultra Turrax, Janke & Kunkel

**Tab. 6 Tiere**

Mäuse des Inzuchstames C57BL/6	Harlan-Winkelmann, GmbH, Borchon
RAG1 <sup>-/-</sup> Knockout Mäuse C57BL/6	Eigenzucht (Heike Weighardt)
MyD88 <sup>-/-</sup> Knockout Mäuse C57BL/6	Eigenzucht (Heike Weighardt)

## **2.2 Medien und Puffer**

---

Alle hier aufgeführten Medien und Puffer wurden mit ddH<sub>2</sub>O oder *aqua dest.* angesetzt und vor Gebrauch entweder steril filtriert oder autoklaviert.

### **2.2.1 Stammlösungen und Puffer**

#### TAE (10x)-Puffer: Laufpuffer für Agarosegele

400 mM Tris/HCL pH 8,0

10 mM EDTA

20 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O) pH 8,0

#### beads-Puffer: Puffer für MACS-Zelltrennung

500 ml PBS

+ 2,5 g BSA (0,5%)

+ 2 mM EDTA

### **2.2.2 Medien und Reagenzien für die Zellkultur**

#### Medium für Primärzellen und Suspensionszellen

500 ml RPMI

+ 5.5 ml Penicillin /Streptomycin

+ 6 ml L-Glutamin

+ 50 ml FKS

#### Ammoniumchloridlysepuffer (10 x Stocksolution)

89.9 g NH<sub>4</sub>CL

10 g KHCO<sub>3</sub>

370 mg tetraNatrium EDTA

in 1000 ml aqua dest.lösen

pH 7.3 (die Gebrauchslösung wird 1:10 mit *aqua dest.* verdünnt)

#### Medium für adhärente Zellen

500 ml DMEM

+5.5 ml Penicillin /Streptomycin

+ 6 ml L-Glutamin

+ 50 ml FKS

PBS/EDTA Lösung

0.2% EDTA in PBS

Einfriermedium

90% FKS

10% DMSO

Trypanblaulösung

0.2 % in PBS

**2.3 Zelllinien und Antikörper****Tab. 7 Zelllinien**

<i>Zelllinie</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Referenz</i>
WEHI-231	Lymphoblasten – murines B-Zell Lymphom	Immunology 1980;39:57
RAW 264.7	murine adherente Monozyten	Cell 1978;15:261-267

**Tab. 8 Antikörper**

<i>Primärantikörper</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Referenz</i>
CD3	Ratte, IgG2b/k gegen murines CD3 PE-Cy5-, APC-, FITC-markiert	BD PharMingen, USA
CD11c	Hamster, IgG1,λ gegen murines CD11c (Integrin α <sub>x</sub> ) APC-, PE-markiert	BD PharMingen, USA
CD11b	Ratte, IgG2b/k gegen murines Mac-1, CR3, APC-, FITC-markiert	BD PharMingen, USA
CD 16/32	Ratte, IgG2b/k gegen murine FCγIII/II-Rezeptor	BD PharMingen, USA
CD25	Ratte, IgG <sub>1</sub> , λ gegen murines CD25, PE-, FITC-markiert	BD PharMingen, USA
CD45R/B220	Ratte, IgG2b/k gegen murines CD45R/B220 PE-, PE-Cy5-, APC-, FITC-markiert	BD PharMingen, USA
CD69	Hamster, IgG1,λ gegen murines CD69, FITC-, PE-markiert	BD PharMingen, USA
CD80 (B7-1)	Hamster, IgG2/k gegen murines CD80 FITC-markiert	BD PharMingen, USA
CD86 (B7-2)	Ratte, IgG2b/k gegen murines CD86 FITC-markiert	BD PharMingen, USA
CD205	Ratte, IgG2a, gegen murines CD205 FITC-markiert	BMA Biomedicals, CH
F4/80	Ratte, , gegen murines F4/80, FITC-markiert	Serotec, U.K.
GR-1	Ratte, IgG2b/k gegen murines Ly-6G und Ly-6C, APC-markiert	BD PharMingen, USA
Isotypkontrolle	Ratte IgG2a/k	BD PharMingen, USA
Isotypkontrolle	Ratte IgG2b/k	BD PharMingen, USA
<i>Sekundärantikörper/ Seren/Proteine</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Referenz</i>
Streptavidin	FITC-konjugiert gegen Ratte	Dianova, Hamburg
Streptavidin	PE-konjugiert gegen Ratte	Dianova, Hamburg
Goat-α rat	FITC-konjugiert	Dianova, Hamburg
Schafsserum		Sigma
Rattenserum		Sigma

---

## 2.4 Tierexperimentelle Methoden

---

### 2.4.1 Colon Ascendens Stent Peritonitis

Um bei einer C57BL/6 Maus eine Peritonitis zu induzieren wird ein Stent von definierter Größe durch die Wand des Colon ascendens gestochen. Es resultiert eine direkte Verbindung zwischen Darmlumen und Peritonealhöhle. Das CASP Modell wurde von Zantl et al. 1999 detailliert beschrieben.

Vor Operationsbeginn wird der Kunststoffteil eines 16 G Venenverweilkatheters mittels Skalpell in etwa 3mm Entfernung von der Öffnungsseite, kreisförmig so eingeschnitten, dass nur eine kleine Verbindungsstelle stehen bleibt.

Unter Narkose wird das zuvor desinfizierte Abdomen durch einen 1cm langen, mittigen Schnitt in der Linea alba eröffnet und das Colon ascendens aus der Bauchhöhle herausgelegt. Der präparierte Katheter wird durch die antimesenterische Wand in 10mm Entfernung von der Ileozökalklappe, in das Lumen des Colon ascendens vorgeschoben und dort mit zwei Stichen (7/0 Ethilon), fixiert. Danach wird die Kanüle aus dem Stent entfernt und an der präparierten Kerbe durchtrennt. Mittels vorsichtiger Kompression der angrenzenden Darmabschnitte wird ein kleiner Stuhl tropfen durch den Stent gedrückt. Dies dient der Kontrolle der Durchlässigkeit des Stents sowie als initiale Infektdosis.

Vor dem Verschluss der Bauchdecke werden zur Rehydrierung 0,5 ml sterile, physiologische Kochsalzlösung in die Peritonealhöhle injiziert, der Verschluss erfolgt im Bereich der Muskulatur in fortlaufender Nahttechnik, die Haut wird mit Einzelknopfnähten verschlossen (4/0 Ethilon).

### 2.4.2 Intraperitoneale Injektion Lipopolysaccharide (LPS)

Um bei Mäusen einen LPS-Schock auszulösen wurden 8-10 Wochen alte C57BL/6 Mäuse mit 300 $\mu$ g/300 $\mu$ l LPS Lösung in PBS) in die Bauchhöhle injiziert.

### 2.4.3 Rekonstitution von B-Lymphozyten

Für die Rekonstitution von B-Lymphozyten in B-Zell-defiziente RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse, werden etwa 1-2x10<sup>7</sup> B-Lymphozyten benötigt. Als Ausgangsmaterial dienen hier C57Bl/6 Wildtyp Mäuse wobei pro Maus mit etwa 5-6 x10<sup>6</sup> B-Zellen gerechnet werden kann. Die B-Zell-Isolation geschieht wie unter 2.5.4 beschrieben. Um eine etwaige Beeinflussung der gewonnenen B-Zellen durch Microbeads in vivo zu vermeiden, werden die Zellen per negativer Selektion gewonnen.

Die aufgereinigten Zellen werden nun zu Aliquots von  $1-2 \times 10^7$  Zellen in je 300µl PBS aufgenommen und mit einer 0,3ml Insulinspritze (BD Micro-Fine+Demi) i.v. in eine Schwanzvene appliziert. Kontrolltiere erhalten 300µl PBS. Die Operation für CASP - Überlebens- bzw. 12h CASP – Experimente erfolgte in der Regel nach 72h.

## **2.5 Gewinnung von ex vivo Zellen/ Organentnahmen**

---

### **2.5.1 Blutentnahme /Serumgewinnung**

Blut wurde unter Anästhesie nach Eukleation aus den intraorbitalen Arterien mittels BD Microtainer SST (Serum) bzw. LH (Heparinisiertes Vollblut) entnommen.

### **2.5.2 Gewinnung und Verarbeitung der Peritonealflüssigkeit**

12h nach CASP-OP wurde die Bauchwand paramedian bis auf das Peritoneum eröffnet. Mit einer mit 10 ml PBS gefüllten Spritze (BD, 10ml Syringe) und Kanüle (Braun, Sterican, 18G) wurde anschließend die Bauchhöhle lavagiert. Für die Bakteriologie wurden 100µl entnommen. Der Rest wurde in einem 15ml Falcon abzentrifugiert, der Überstand für die Zytokinbestimmung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Das Zell-Pellet wurde in PBS resuspendiert und zur FACS-Analyse bzw. Bestimmung des „oxidativ Burst“ verwendet.

### **2.5.3 Organperfusion**

Um für die Zytokinbestimmung der Organe mittels ELISA möglichst geringe Verunreinigungen der Messwerte durch Zytokine aus dem Blut zu erhalten wurden die Organe in Situ mit PBS perfundiert. Hierfür wurde nach eröffnetem Abdomen und Thorax die linke Herzkammer des geopferten Tieres mit einer feinen Kanüle punktiert und rasch mit 10 ml PBS gespült.

### **2.5.4 Milzentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension**

Die ggf. vorbehandelten Mäuse wurden teils nach Narkose (Diethylether), teils durch zervikale Dislokation getötet.

Die Milz wurde entnommen und unter der Sterilbank mit einem Spritzenkolben (3ml Spritze) durch ein 100µm Sieb (BD) in ein 50ml Falcon Röhrchen gerieben. Dabei wurde die Zellsuspension mit insgesamt 10ml Ammoniumchloridlysepuffer (2.2.2) aus dem Sieb in das Röhrchen gespült.

Nach 5min Inkubation wurde das Röhrchen für 5min, bei 1500 rpm, Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, aufgeschlagen und mit PBS resuspendiert. Die

Zelllösung wurde nun durch ein 70µm Sieb (BD) in ein neues Falcon gefiltert, um Verunreinigungen zu entfernen. Nach dem Ermitteln der Zellzahl der Probe wurde diese zur weiteren Bearbeitung auf Eis gestellt.

### **2.5.5 Lungenentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension**

Nach erfolgter Perfusion der Organe wie in Kapitel (2.5.3) beschrieben wurde ein Teil der Lunge entnommen und in einer Zellkulturschale mit zwei Skalpellern zerkleinert. Collagenase-Lösung (Sigma) wurde in einer Konzentration von 4000U/ml in PBS gelöst. Je 100µl Collagenaselösung wurden mit der zerkleinerten Lunge für 10 min bei RT inkubiert und anschließend in serumfreies Zellkulturmedium (2.2.2) mit weiteren 100µl Collagenase versetzt. Nun erfolgte eine Inkubation für 45 min bei 37°C im Brutschrank.

Anschließend wurde die Suspension per Pipette in ein 15ml Falcon überführt, heftig geschüttelt, abzentrifugiert und mit 1 ml PBS gewaschen. Die Suspension wurde nun durch ein 100µm Sieb (BD) in ein 50ml Falcon Röhrenfiltriert, anschließend mit PBS gewaschen und noch einmal durch ein 70µm Sieb (BD) in ein neues Falcon gefiltert.

## **2.6 Zellbiologische Methoden**

---

### **2.6.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen**

Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C, 7% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Arbeiten mit den Zellen erfolgten zur Vermeidung von Kontaminationen an Sterilbänken. Suspensionszellen wurden je nach Wachstum 3-4-mal pro Woche in frischem Medium verdünnt. Adhärente Zellen wurden spätestens beim Erreichen der Konfluenz von den Petrischalen abgelöst und auf neue Verteilt. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen abzentrifugiert, in 10% DMSO in FKS aufgenommen und in Einfrierröhrchen für 24h bei -80°C eingefroren. Anschließend folgte die Überführung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff.

Zellzahlbestimmungen erfolgten per Neubauer Zählkammer.

### **2.6.2 In-vitro-Stimulation von Milzzellen**

Um die Reaktion separater B-/T-Zellen auf die Stimulation mit LPS, CpG, P<sub>3</sub>Cys sowie MALP-2 beobachten und per FACS bzw. PCR oder ELISA auswerten zu können wurden diese mit folgenden Konzentrationen für 6h in PBS stimuliert:

<b>Tab.9</b>	<b><i>In-vitro</i> Stimulation Milzzellen</b>	
<i>Stimulus</i>	<i>c [PCR] (5x10<sup>6</sup> Zellen in 2ml PBS)</i>	<i>c [ELISA] (5x10<sup>5</sup> Zellen/ 200µl PBS)</i>
LPS	20µl /well (50ng/ml)	2µl /well (50ng/ml)
CpG	80µl /well (1 µM)	8µl /well (1µM)
P <sub>3</sub> Cys	-	2µl /well (50µg/ml)
MALP-2	-	2µl /well (10ng/ml)

Parallel erfolgte immer auch eine Kontrolle ohne Stimulans. Ansätze für ELISAs erfolgten in Triplikaten, die Proben wurden abzentrifugiert, die Überstände direkt bei -20°C eingelagert. Proben für PCR wurden ebenfalls abzentrifugiert, jedoch wurden hier die Überstände verworfen und die Pellets mit 350µl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden) sowie 10µl Mercaptoethanol (Roth) versetzt und wie unter Kapitel (2.5.1) beschrieben weiterverarbeitet.

### **2.6.3 Bestimmung der Bakterienzahl in der Bauchhöhle**

Die Peritonealflüssigkeit wurde wie in Kapitel (2.5.2) gewonnen. Die Flüssigkeit wurde seriell in PBS verdünnt (1/10, 1/100, 1/1000). Zur Bestimmung gram-negativer und gram-positiver Bakterien pro peripheres Organ wurden Nährböden (Blutagar) verwendet. Pro Verdünnungsstufe wurde 10µl auf Agarplatten ausplattiert und diese bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterienkolonien gezählt und die Bakterienzahlen pro Organ ermittelt.

### **2.6.4 FACS – Durchflusszytometrische Analyse von Antigenen auf der Zelloberfläche**

Per FACS-Analyse lassen sich Zellen anhand Größe, Granularität und durch Fluoreszenz gekoppelte Antikörper auch hinsichtlich bestimmter Oberflächenstrukturen charakterisieren. Anhand der Intensität der Fluoreszenz kann dann auf die Anzahl der an der Zelle gebundenen Antikörper geschlossen werden, was wiederum Auskunft über die Anzahl der Oberflächenantigene gibt. Somit kann beispielsweise der Aktivierungsgrad bestimmter Leukozytenpopulationen bestimmt werden.

Pro Färbung wurden  $2 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^5$  Zellen in 100µl Färbepuffer (PBS) resuspendiert und in 96-V-Mikrotiterplatten mit Antikörpern nach Herstellerangaben für 25min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in PBS resuspendiert. Die Analyse erfolgte im BD FACSCalibur.

Bei Färbung mit unmarkierten Primärantikörpern erfolgte noch eine zweite Färbung mit Fluoreszenz markierten Sekundärantikörpern.

### 2.6.5 Analyse von reaktiven Sauerstoffradikalen ("oxidative Burst")

Die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Metaboliten ist neben der Phagozytose ein Effektormechanismus zur Abwehr von Bakterien. Diese Produktion kann in Einzelzellen durch die Verwendung des Farbstoffs Dihydrorhodamin 123 (DHR) mittels FACS Analyse nachgewiesen werden. Dihydrorhodamin ist zellpermeabel und fluoresziert nach der Oxidation durch  $H_2O_2$  oder  $O_2^-$  zu Rhodamin bei 540nm. Die Peritonealflüssigkeit wurde wie unter (2.5.2) beschrieben gewonnen.  $2 \times 10^6$  Zellen in 200 $\mu$ l PBS wurden mit 1 $\mu$ l Gr1-APC Antikörper für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) gewaschen, in 900 $\mu$ l HBSS resuspendiert und mit 100 $\mu$ l Glukose versetzt. Die Probe wurde aufgeteilt, ein Teil diente als Ansatz für den spontanen oxidativen Burst, ein weiterer Ansatz wurde mit 0,75 $\mu$ l DHR versetzt. Die Stimulation erfolgte 20min bei 37°C im Dunkeln. Hiernach wurden sowohl die Kontrolle als auch die stimulierte Probe mit 1,25 $\mu$ l Natriumazid versetzt und unmittelbar im FACS (BD FACSCalibur) analysiert.

### 2.6.6 MACS Zellisolation per magnetischer Microbeads

Um einzelne Leukozytenpopulationen analysieren bzw. rekonstituieren zu können, wandten wir das Zellisolationsverfahren MACS (Miltenyi Biotec) an.

Hierbei handelt es sich um spezifische, an sehr kleine Magneteilchen gekoppelte Antikörper, die sich an bestimmte Antigene, z.B Oberflächenrezeptoren der Zellen anlagern. Wird das inkubierte Zellgemisch nun auf eine stark magnetisierte Säule gegeben lagern sich die magnetisch markierten Zellen in der Säule ab, nicht magnetische Zellen hingegen fließen durch die Säule hindurch. Die Säule kann nun aus dem Magnetfeld entfernt so dass auch die magnetisierten Zellen ebenfalls aus der Säule entfernt und aufgefangen werden können.

Hierfür wurden Zellen ( $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$  Zellen isg.) in 3ml Beads-Puffer (2.2.1) resuspendiert und mit MACS-beads für 25min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert (10 $\mu$ l beads / $1 \times 10^7$  Zellen).

Nach zweimaligem Waschen mit Beads-Puffer wurde das Zellgemisch in 3ml Beads-Puffer resuspendiert und auf die sich im Magnetfeld befindende Säule aufgetragen, alle nicht markierten Zellen passierten ungehindert die Säule und wurden als negativ selektionierte Zellen aufgefangen.

Die positive Selektion wurde nach zweimaligem Durchspülen der Säule mit je 3ml beads-Puffer nun mit dem im Kit beiliegenden Stempel in einen Auffangbehälter entleert.

Die Reinheit der selektionierten Zellen wurde per FACS-Analyse geprüft, wobei in der Regel Ergebnisse von 90-95% Reinheit erzielt werden konnten.



Für die Isolation von B-Lymphozyten wurde eine negative Selektion mit Thy1.2, CD11c und CD11b beschichteten Microbeads verwendet.

Die Isolation der T-Lymphozyten erfolgte in negativer Selektion per B220, CD11c und CD11b beschichteten Microbeads.

Um sehr saubere Trennungen für die RNA-Gewinnung aus B-Lymphozyten zu erhalten wurde an die negative Selektion per Thy1.2, CD11c, CD11b noch eine positive Selektion nach erneuter Inkubation mit B220 Microbeads angeschlossen. Für andere Anwendungen ist dieses Verfahren wegen dem bei der Isolation beobachteten großen Zellverlust jedoch weniger geeignet.

### **2.6.7 CFSE (CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester) Markierung**

Um eine Aussage über die Proliferation bestimmter Zellen unter verschiedenen in-vitro bzw. in-vivo Situationen Auskunft gewinnen zu können, kann man die gewünschten Zellen mit einem intrazellulären Fluoreszenz-Farbstoff (CFSE, Invitrogen) markieren. Bei jeder Zellteilung wird dieser auf von der Mutter auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt, so dass sich die per FACS analysierbare Fluoreszenz nach jeder Generation halbiert.

Hierfür wurden vor allem B-Lymphozyten in Zellkulturmedium aufgenommen und mit je 1µg/ml CFSE (Invitrogen) versetzt. Die Färbung erfolgte für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank, im Anschluss erfolgte ein zweifaches Waschen mit Zellkulturmedium.

Die nun markierten Zellen wurden nun beispielsweise wie in Kapitel (2.6.2) beschrieben stimuliert und anschließend per FACS (BD) analysiert. Jenes Anfärbeverfahren wurde auch zur Erfolgskontrolle bei den Rekonstitutionsversuchen angewandt, um die applizierten Zellen in den Tieren sichtbar zu machen und auch hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens analysieren zu können.

## **2.7 Proteinanalytische Methoden**

---

### **2.7.1 Organverarbeitung für ELISA**

Die zum Zweck der ELISA-Messung entnommenen Proben (2.5.3) werden zu je 100mg abgewogen. Hinzu kommen 100µl eines Protease-Inhibitors (Roche Diagnostics, Mannheim) der zuvor mit je 1ml PBS je Tablette zu einer zehnfach Lösung angesetzt wurde. Die Organprobe und der Protease-Inhibitor werden nun mit 900µl PBS versetzt und für kurze Zeit mit dem Organshredder (Ultrathurax) püriert, im Anschluss zur Beseitigung des anfallenden Schaums gevortext.

Hiernach werden die Proben in Reaktionsgefäße umgefüllt und für ca. 1 Minute in Bad flüssigen Stickstoffs inkubiert. Aus der Kälte werden die Reaktionsgefäße unmittelbar in siedendem Wasser aufgetaut.

Für 20 Minuten erfolgt nun die Zentrifugation der Proben in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) bei 10.000 U/min und 4°C. Die Überstände wurden abgenommen und bei -80°C bis zur Messung per ELISA gelagert.

### **2.7.2 Gesamt-Protein-Assay**

Um das in den ELISAs gemessene Ergebnis auf die gesamte Proteinmenge der Proben beziehen zu können muss diese nach der Methode nach Pierce bestimmt werden. Hierzu wird Bovines-Serum-Albumin (BSA) zu einem Standard von 10mg/ml PBS eingestellt.

Es erfolgt eine Standardverdünnung mit PBS, der erste Standard enthält 10mg BSA /ml PBS, der zweite 5mg BSA/ mlPBS usw. Nun werden je 5µl der Standards (Standardbestimmung doppelt), der Leerproben und der Proben in einer 96 Well Platte vorgelegt und mit 250µl der nach Herstellerangaben angefertigten BCA-Reagens komplettiert. Nach 1 stündiger Inkubationszeit bei 37°C wird die optische Dichte bei 540nm bestimmt. Ausgewertet wird mittels Mithras (Berthold Tech, Pforzheim) bei 550nm ohne Referenz Wellenlänge.

Das Ergebnis stellt den Gesamt-Proteingehalt in mg/ml dar.

### **2.8.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA**

Die quantitative Bestimmung spezifischer Proteine erfolgte mittels „Sandwich“-ELISA. Hierfür wird eine mit für das gesuchte Antigen spezifischen Antikörpern gekoppelte 96 well Platte mit Probe belegt und inkubiert. Das gesuchte Antigen wird von den Antikörpern gebunden und verbleibt auch nach Waschen der Platte an den Antikörpern gebunden. Nun erfolgt die Inkubation der Platte mit einem weiteren, Enzym-gekoppelten Antikörper, dieser muss ebenfalls spezifisch für das gesuchte Antigen sein jedoch an ein anderes Epitop binden. Nach erneutem Auswaschen und einbringen eines farblosen Substrates wird dieses mit Hilfe der gekoppelten Enzyme zu blauer Farbe umgesetzt, anschließend mit Schwefelsäure angesäuert und bei 405 nm bestimmt.

Hierzu wurden ausschließlich ELISA Quantikine Kits (Mouse, R&D Systems) verwendet. Die Durchführung erfolgte strikt nach den Herstellerangaben.

Die Messung und Auswertung erfolgte per Mithras (Berthold Tech, Pforzheim). Die Messwerte wurden mit den Daten aus den Protein-Assays verrechnet um die gesuchte Proteinmenge pro gesamte Proteinmenge der Probe angeben zu können.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Einleitung

---

Noch immer stellt das Krankheitsbild der schweren Sepsis auch in den Industrienationen ein erhebliches Problem hinsichtlich der Behandlung dar. Aktuelle epidemiologische Studien zum septischen Schock auf Intensivstationen zeigen zwar einen geringen Rückgang der Mortalität (Annane, Aegerter et al. 2003) während der letzten Jahre, jedoch ist dies nicht auf neuartige Therapieverfahren zurückzuführen. Die gesamte Sepsismortalität in Krankenhäusern in den USA lag laut einer Kohortenstudie mit 192980 Patienten bis zum Jahre 2001 noch bei 28% (Angus, Linde-Zwirble et al. 2001). Leider ist die Immunpathologie der Sepsis noch immer nicht vollständig verstanden. Um Patienten ein besseres Angebot an Diagnostik und Therapie in der Sepsis ermöglichen zu können, gilt es die komplexen Interaktionen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems genauer zu erforschen. In diesem Rahmen zeigten Versuche mit B- und T-Zell defizienten  $RAG1^{-/-}$  Mäusen überraschend Überlebensdefizite in einem Modell der akuten polymikrobiellen Sepsis, colon ascendens stent peritonitis (CASP). So wurde in CASP-Experimenten beobachtet, dass immundefiziente  $RAG1^{-/-}$  Mäuse binnen 30 Stunden verstarben, Wildtyp Kontrollen hingegen überleben das CASP Modell in etwa 60% der Fälle (Abb. 1.5). Im Weiteren erhärteten erniedrigte IL-12 und IL-10 Spiegel den Verdacht, dass hier das Fehlen der reifen B- und T-Zellen bei den  $RAG1^{-/-}$  Mäusen für eine frühe, noch unbekannt Funktion der B- und oder T-Zellen in der Sepsis spricht.

#### 3.2 Zellaktivierung in der CASP

---

Um die Rolle der B-/T-Lymphozyten in der Sepsis genauer charakterisieren zu können wurde das Ausmaß der Zellaktivierung der Lymphozyten *ex vivo* nach CASP untersucht. Für den Vergleich wurden als Negativkontrolle unbehandelte Mäuse, als Positivkontrolle mit LPS i.p. gespritzte WT-Mäuse (2.4.2) eingesetzt. 18 Stunden nach Induktion der Sepsis wurden die Mäuse geopfert, die Milzen entnommen und daraus eine Zellsuspension hergestellt (2.5.4). Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen für Zellaktivierung typische Oberflächenantigene inkubiert und anschließend im FACS gemessen (2.6.4). Mit dieser Vorgehensweise sollte anhand der für die einzelnen Leukozytenpopulationen spezifischen Aktivierungsmarker für T- und B-Zellen aber auch für Makrophagen und DC der Grad der Zellaktivierung analysiert

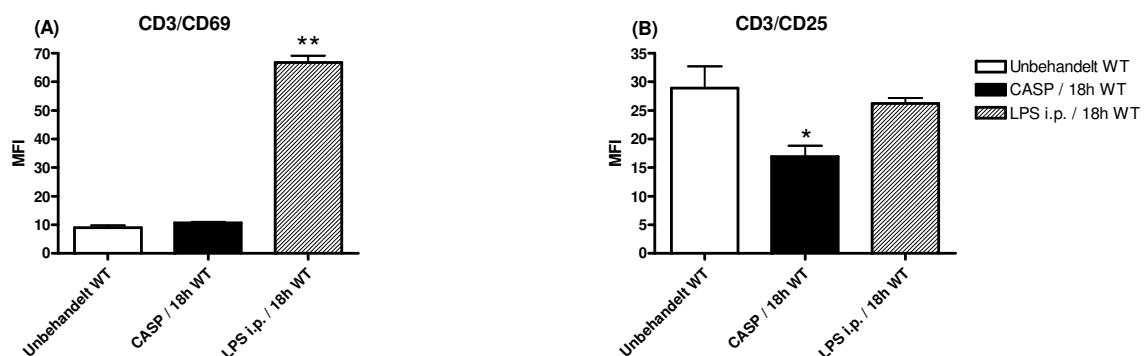
werden. Falls möglich, sollte nun anhand der gewonnenen Erkenntnisse das Augenmerk im Wesentlichen auf die für die oben beschriebene Beobachtung verantwortliche Zellpopulation gerichtet werden. Um eventuelle Unterschiede zwischen WT und RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen ermitteln zu können, wurde der Aktivierungsgrad verschiedenster Zellpopulationen durchflusszytometrisch untersucht.

### 3.2.1 Analyse der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf CD3 positiven T-Zellen

Zur Charakterisierung von T-Zellen wurde die CD3-Expression gemessen.

Das hier bestimmte Oberflächenmolekül CD69 wird auch als AIM (activation inducer molecule) bezeichnet und wird unter anderem auf T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen sowie auf basophilen und neutrophilen Granulozyten exprimiert. Es ist in frühen Abläufen der Lymphozyten-, Monozyten- sowie Thrombozytenaktivierung beteiligt (Castellanos, Munoz et al. 1997).

Wie in Abb.5 zu sehen war die MFI (MFI= mittlere Fluoreszenz Intensität) für das frühe Aktivierungsantigen CD69 auf CD3 positiven T-Zellen unbehandelter Mäuse gering. Auch die einer CASP unterzogenen Mäuse zeigten eine geringe CD69 Expression auf den CD3 positiven T-Zellen, was auf ein geringes Maß der Aktivierung hinweisen könnte. Es konnte kein signifikanter Unterschied zu der Negativkontrolle gemessen werden. LPS behandelte Mäuse hingegen zeigten signifikant mehr CD69 an ihrer Zelloberfläche. Dies spiegelt die im FACS gemessene, sechsmal stärkere MFI, der aus den LPS behandelten Mäusen gewonnenen Zellen im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollen bzw. CASP Tieren wieder.



**Abb.5: FACS Analyse - Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 18h nach Peritonitisinduktion auf CD3<sup>+</sup>-T-Zellen**

**A:** Geringe CD69 Expression der CD3<sup>+</sup> Zellen von naiven und septischen Mäusen.

(\*p<0,05 LPS WT vs. naiv WT)

**B:** Signifikant weniger CD25 auf CD3 Zellen septischer Mäuse.

(\*p<0,05 CASP WT vs. naiv WT)

Ein weiterer wichtiger Aktivierungsmarker für T-Zellen stellt der IL-2R (CD25) dar (Theze, Alzari et al. 1996), der zudem auf den regulatorischen T-Zellen (Treg) ausgeprägt ist. Ligation des IL-2R führt zur antigenunabhängigen Aktivierung der T-Zellen und zur T-Zell-Proliferation.

CD3<sup>+</sup> Zellen unbehandelter Mäuse besitzen eine ausgeprägte Expression von CD25 auf ihrer Zelloberfläche. Bei CD3<sup>+</sup> Zellen der CASP-operierten Tieren ist hingegen eine signifikante Reduktion der gemessenen Fluoreszenz im FACS zu registrieren, das Maß der Zellaktivierung der CD3<sup>+</sup> Zellen septischer Tiere ist hier reduziert und oder das Vorkommen von Treg.

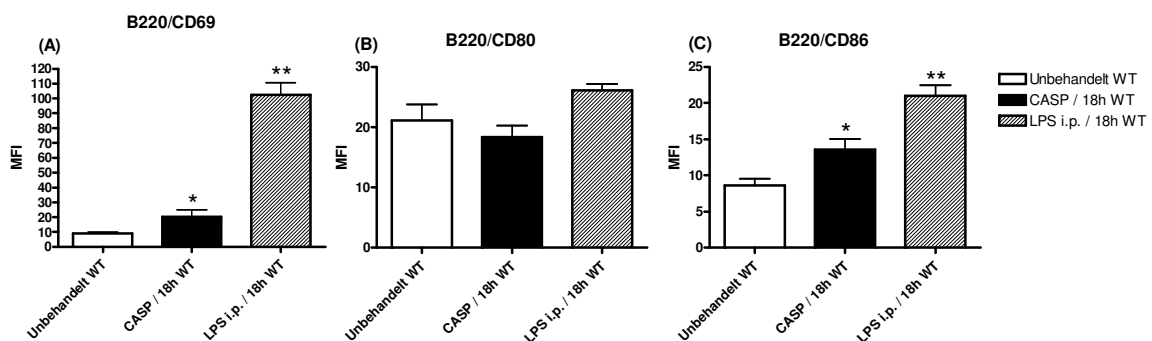
Im Vergleich dazu zeigt die Behandlung von Mäusen mit LPS i.p. keine signifikante Änderung der CD25 Expression auf den CD3 Zellen.

Diese Daten zeigen, dass T-Zellen im gemessenen Zeitraum nicht mit Hochregulation von Aktivierungsparametern auf die polymikrobielle Sepsis, wohl aber auf LPS reagieren.

### 3.2.2 Analyse der Aktivierungsmarker CD69, CD80 und CD86 auf B220 positiven B-Zellen

Im Weiteren wurden B-Zellen untersucht, diese lassen sich durch B220 charakterisieren (Abb.6).

B-Zellen unbehandelter Mäuse besitzen nur wenig CD69 auf ihrer Oberfläche. Bei septischen Tieren lässt sich die Zahl der CD69 Rezeptoren signifikant auf das doppelte des Ausgangswertes steigern. Eine Stimulation mit LPS führt ebenso zu einer signifikanten CD69 Erhöhung, hier jedoch auf das zehnfache des Ausgangswertes.



**Abb.6:** FACS Analyse - Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD80 und CD86 18h nach Peritonitisinduktion auf B220<sup>+</sup>-B-Zellen naiver Tiere (weiße offene Balken), septischer Tiere (schwarze Balken), sowie LPS-stimulierter Tiere (graue Balken). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Die Ergebnisse stammen aus 5 unabhängigen Experimenten. (\* p<0,05 naive WT vs. CASP WT, \*\* p<0,05 naive vs. LPS)

**A:** CD69 Signifikante CD69 Steigerung in septischen Mäusen.

**B:** CD80 Keine signifikante Änderung in der Sepsis.

**C:** CD86 Signifikante CD86 Steigerung in septischen Mäusen.

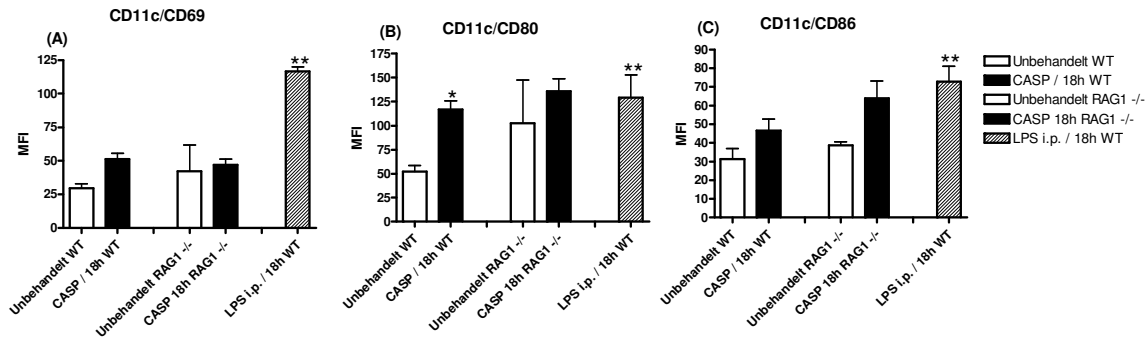
Neben dem klassischen B-Zell-Rezeptor gibt es eine Reihe kostimulatorischer Rezeptoren zur Steuerung der Immunantwort. Hierunter fällt auch die B7 Familie, bestehend aus B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) sowie ICOS-L, PD-L1, PD-L2, B7-H3 und B7-H4 (Collins, Ling et al. 2005), die ebenfalls Auskunft über den Grad der Zellaktivierung geben. Sie sorgen für eine effiziente Immunantwort indem sie, zusätzlich zum B-Zell-Rezeptor, Signale vermitteln. B220<sup>+</sup> Zellen unbehandelter Mäuse zeigen eine mäßig starke Fluoreszenz für CD80. Sepsisinduktion durch CASP hat keine signifikanten Änderungen zur Folge, lediglich eine leicht verminderte CD80 Expression ist zu verzeichnen. Auch die Zellen der LPS behandelten Tiere weisen keine signifikante Änderung für B7-1 auf, zeigen aber im Unterschied zu den CASP Mäusen einen Anstieg der B7-1 Expression.

B-Zellen unbehandelter WT-Mäuse besitzen nur relativ wenig CD86 an ihrer Oberfläche. Nach CASP kann man einen signifikanten Anstieg der CD86 Antigene auf der Oberfläche der B220<sup>+</sup> Zellen beobachten. Die MFI steigt von 8 auf 14 an. Durch die LPS-Behandlung erhöht sich die CD86 Expression der B-Zellen, so dass sich mit einer MFI von 20 ein, zu den Septischen als auch zu den Kontrolltieren, signifikanter Unterschied ergibt.

### **3.2.3 Analyse der Aktivierungsmarker CD69, CD80 und CD86 auf CD11c positiven DC**

Zusätzlich wurde die Untersuchung der Zell-Aktivierung nach CASP für Dendritische Zellen (DC) und Makrophagen auch an RAG<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt. Aufgrund des Fehlens der B- und T-Lymphozyten in den RAG defizienten Mäusen konnte dies in den vorangegangenen Experimenten für B- und T-Lymphozyten nicht durchgeführt werden.

Ausgehend von der relativ niedrigen Intensität für CD69 bei den CD11c<sup>+</sup> Dendritische Zellen unbehandelten WT-Mäusen (Abb.7) zeigt sich in der CASP eine Verdopplung der MFI, das deutlich zeigt, dass DC während Sepsis aktiviert werden. RAG<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen einen etwas höheren, jedoch recht inhomogenen Wert für die unbehandelten Tiere, auch hier präsentiert sich, kein Anstieg der CD69 Fluoreszenz. Mit LPS injizierte WT-Mäuse dienen hier wieder der Positivkontrolle. Sie zeigen einen signifikanten Anstieg um das vierfache im Vergleich zu der unbehandelten WT-Gruppe.



**Abb. 7: FACS Analyse - Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD80 und CD86 18h nach Peritonitisinduktion auf CD11c<sup>+</sup>-DC naiver Tiere (weisse offene Balken), septischer Tiere (schwarze Balken), sowie LPS-stimulierter Tiere (graue Balken). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Die Ergebnisse stammen aus 5 unabhängigen Experimenten. (\* p<0,05 naive WT vs CASP WT, \*\* p<0,05 naive vs LPS, § p<0,05 naive RAG1<sup>-/-</sup> vs CASP RAG1<sup>-/-</sup>)**

**A:** CD69 Stärkere CD69 Expression bei septischen als bei naiven WT-Mäusen. RAG1<sup>-/-</sup> Tiere zeigen Andeutung zu höheren CD69 Werten nach CASP.

**B:** CD80 Signifikant höhere CD80 Expression auf CD11c<sup>+</sup> WT Zellen nach CASP. Keine signifikante CD80 Änderung bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen in der Sepsis.

**C:** CD86 Trend zu gesteigerter CD86 Expression in der Sepsis bei WT und RAG Mäusen, keine Signifikanz.

Naive DC exprimieren mäßig viel CD80. Nach CASP zeigen sich mehr als doppelt so hohe Werte, es ist ein signifikanter Anstieg der CD80 Expression zu verzeichnen. Die RAG1<sup>-/-</sup> Tiere zeigen einen ähnlichen Trend, jedoch besitzen die Werte der unbehandelten RAG-Gruppe eine höhere Varianz, so dass hier keine statistische Signifikanz erzielt wird. Zwischen der Negativ- und der LPS behandelten Positivkontrolle zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg auf über das Doppelte.

Auch in DC ist das co-stimulatorische Antigen CD86 aus der B7 Familie ein Marker für den Grad der Zellaktivierung. DC unbehandelter WT-Tiere zeigen in der FACS Messung MFI Werte von 30, bei Zellen nach CASP-OP liegen die Werte hingegen bei 45, somit kann hier von einem leichten Anstieg gesprochen werden. Naive RAG1<sup>-/-</sup> Tiere zeigen höhere CD86 Expressionswerte als naive WT-Tiere, nach CASP ist ein nicht signifikanter Anstieg der MFI von 40 auf 60 festzustellen.

Im Vergleich zu Zellen naiver WT-Tiere ist bei den LPS behandelten Mäusen eine signifikante 2,3-fache CD86 Expressionsstärke zu verzeichnen.

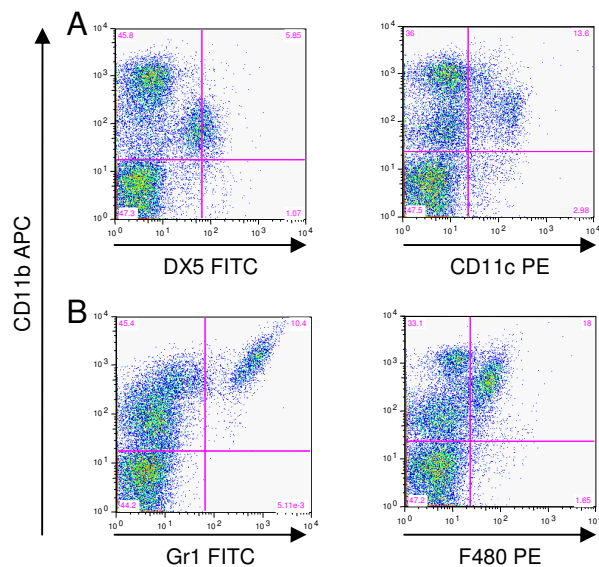
Somit zeigt sich, dass vor allem septische WT-Mäuse einen Anstieg der Expression der untersuchten Aktivierungsmarker aufweisen. Bei den RAG1<sup>-/-</sup> Tieren kann zumindest für CD86 eine Tendenz zu stärkerer Aktivierung in der Sepsis gezeigt werden. Stimuliert man die Tiere mit LPS i.p. lässt sich für alle untersuchten Aktivierungsmarker eine signifikante Erhöhung der Expressionslevel nachweisen.

### 3.2.4 Analyse der Aktivierungsmarker CD69, CD80 und CD86 auf CD11b positiven Zellen

Die Population der CD11b positiven Zellen besteht aus verschiedenen Subpopulationen, die sich in der FACS-Analyse klar voneinander unterscheiden lassen. Mit geeigneten Antikörpern kann man diese im FACS einzelnen Zellpopulationen zuordnen (Abb.8).

Aufgrund der Fluoreszenzintensität haben wir die CD11b positiven Populationen in CD11b „low“ und CD11b „high“ benannt. Die CD11b „low“ Population setzt sich hauptsächlich aus Natürlichen Killerzellen (NK), DC und Marginalzonen-Makrophagen zusammen.

In der CD11b „high“ Population finden sich F4/80 Positive Zellen der roten Pulpa der Milz, sowie GR1+ Granulozyten.



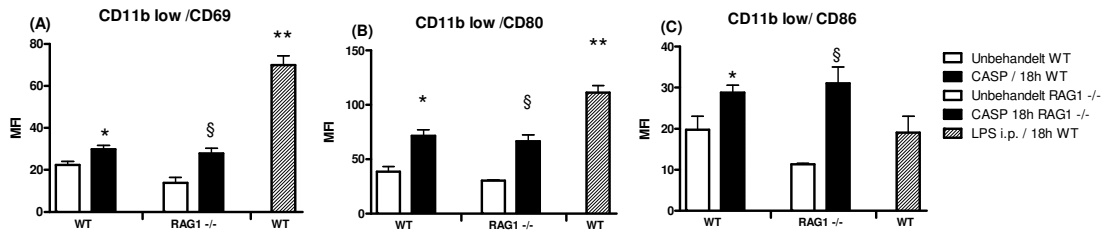
**Abb. 8 Differenzierung der CD11b<sup>+</sup> Zell-Subpopulationen in der Durchflusszytometrie mit dreifach Färbungen (APC-FITC-PE)**

**A): CD 11b APC - DX5 FITC - CD11c PE**  
 CD11b niedrig positive Population:  
 Gr1<sup>+</sup> = Granulozyten  
 DX5<sup>+</sup> = NK

**B): CD 11b APC - Gr1 FITC - F480 PE**  
 CD11b hoch positive Population:  
 F480<sup>+</sup> = Zellen der roten Pulpa, Milz  
 Marco = Makrophagen

Im Weiteren wurde der Aktivierungsgrad der CD11b low und der CD11b high Population nach CASP-Induktion untersucht. Die Expression von CD69 auf CD11b „low“ positiven Zellen der CASP WT-Mäuse ist signifikant stärker als die unbehandelte Negativkontrolle (Abb.9-A). Auch septische RAG1<sup>-/-</sup> Tiere zeigen ein analoges Bild mit signifikant höheren Expressionsraten für CD69 bei septischen, im Vergleich zu naiven Tieren. Jedoch sind die Werte für die RAG1<sup>-/-</sup> Tiere geringfügig niedriger als für WT-Mäuse. Die LPS Positivkontrolle zeigt einen MFI von 60, dies bedeutet, dass die Induktion von CD69 hier statistisch hoch signifikant nachweisbar ist (p<0,0001).





**Abb.9: FACS Analyse - Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD80 und CD86 18h nach Peritonitisinduktion auf CD11b<sup>+</sup> „low“ Zellen naiver Tiere (weisse offene Balken), septischer Tiere (schwarze Balken), sowie LPS-stimulierter Tiere (graue Balken). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Die Ergebnisse stammen aus 5 unabhängigen Experimenten. (\* p<0,05 naive WT vs CASP WT, \*\* p<0,0001 naive vs LPS, § p<0,05 naive RAG1<sup>-/-</sup> vs CASP RAG1<sup>-/-</sup>)**

**A:** CD69 Signifikant höhere CD69 Expression in der Sepsis sowohl bei WT als auch bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen.

**B:** CD80 Signifikant höhere CD80 Expression in der Sepsis sowohl bei WT als auch bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen

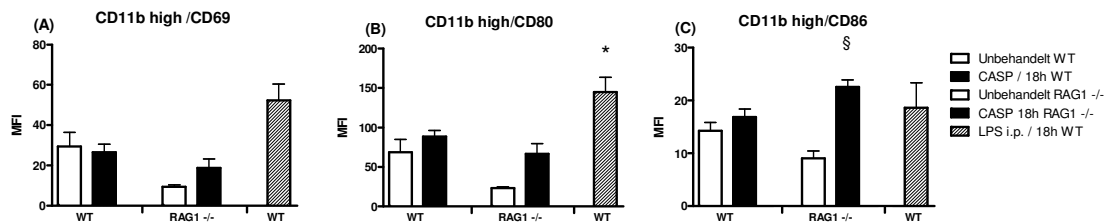
**C:** CD86 Signifikant höhere CD86 Expression in der Sepsis sowohl bei WT als auch bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. LPS i.p. führt zu keiner CD86 Aktivierung

Die Induktionsrate von CD80 auf CD11b „low“ Zellen ähnelt den für CD69 nachgewiesenen Werten (Abb.9-B). Auch hier zeigt sich für septische WT-Mäuse ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Auch in septische RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen konnte dies gezeigt werden, die Expressionslevel waren ebenfalls leicht niedriger als in naiven Tieren. Die Zellen der LPS-Positivkontrolle weisen auch hier die höchste Induktionsrate auf, der Unterschied zur WT-Negativkontrolle ist hoch signifikant.

WT-Mäuse zeigen nach CASP signifikant höhere CD86 Expression auf der Zelloberfläche im Vergleich zu naiven WT-Tieren (Abb.9-C). Für unbehandelte RAG1<sup>-/-</sup> Tiere ist die CD86 Expression auf CD11b „low“ Zellen niedriger als für naive WT-Tiere. Die CASP operierten RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse weisen jedoch nahezu dieselbe MFI wie die CASP WT-Tiere auf, so dass hier durch Sepsisinduktion eine stärkere Aktivierungsrate nachzuweisen ist, da die Expression der naiven RAG1<sup>-/-</sup> DC, NK und Marginalzonen Makrophagen niedriger ist als die der WT-Zellen. Die LPS Injektion hingegen führt nicht zum Anstieg von CD86, im Vergleich zur unbehandelten WT.

Zusammengefasst lässt sich für die drei untersuchten Aktivierungsmarker sowohl in der WT- als auch in der RAG1<sup>-/-</sup> Population ein signifikanter Anstieg der Expression nach CASP registrieren. LPS i.p. behandelte Tiere zeigen eine hochsignifikant stärkere Expression von CD69 und CD80 als unbehandelte Tiere, für CD86 lässt sich diese Beobachtung nicht feststellen.

Die Expression von CD69 auf CD11b „high“ Zellen der WT-Tiere weist keinen Unterschied zu den septischen Tieren auf (Abb.10-A). Die CD69 Expression der RAG-1<sup>-/-</sup> Tiere ist jedoch etwas niedriger und wird während der Sepsis leicht hoch reguliert. Nach LPS-Behandlung wird CD69 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stark hoch reguliert, auch hier ergibt sich jedoch keine Signifikanz (p=0,11).



**Abb.10: FACS Analyse - Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD80 und CD86 18h nach Peritonitisinduktion auf CD11b<sup>+</sup> „high“ Zellen naiver Tiere (weisse offene Balken), septischer Tiere (schwarze Balken), sowie LPS-stimulierter Tiere (graue Balken). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Die Ergebnisse stammen aus 5 unabhängigen Experimenten. (\* p<0,05 naiv WT vs CASP WT, \*\* p<0,001 naiv vs LPS, § p<0,05 naiv RAG1<sup>-/-</sup> vs. CASP RAG1<sup>-/-</sup>)**

**A:** CD69 Tendenz zu höherer CD69 Expression bei RAG1<sup>-/-</sup> in der Sepsis.

**B:** CD80 Höhere CD80 Expression in der Sepsis sowohl bei WT als auch bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen, nicht signifikant

**C:** CD86 Signifikante CD86 Aktivierung durch Sepsis bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen

Für die CD11b „high“ positiven, septischen Tiere konnte ein geringer Anstieg der CD80 Expression im Vergleich zu den naiven WT-Tieren nachgewiesen werden (Abb.10-B). Unbehandelte RAG-1<sup>-/-</sup> Tiere zeigen auch hier eine geringere Expression von CD80 im Vergleich zu WT-Tieren, aber auch hier ist bei CASP ein Anstieg der B7-1 Expression zu verzeichnen. LPS Gabe führt zur Stimulation von CD11b „high“ positiven Zellen, der MFI für CD80 steigt auf das Doppelte an, diese Hochregulation signifikant (p=0,0302).

Auch CD86 wird während der Sepsis leicht hoch reguliert (Abb.10-C). Auch hier ist der Wert der unbehandelten RAG1<sup>-/-</sup> Tiere niedriger als der unbehandelten WT-Mäuse. Nach CASP zeigen die RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zur unbehandelten RAG1<sup>-/-</sup> Population einen signifikanten Anstieg auf über das Doppelte. Somit scheinen CD11b "high" Zellen septischer RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant stärker aktiviert zu sein als jene Zellen der septischen WT-Mäuse. Wie schon in der CD11b „low“ Population zu beobachten, lässt sich auch hier an der CD11b „high“ Population der WT-Maus durch LPS Injektion keine CD86 Induktion nachweisen.

Die untersuchten Aktivierungsmarker auf CD11b „high“ Zellen werden bei WT-Tieren durch die Sepsis nicht signifikant reguliert.

Septische RAG1<sup>-/-</sup> Tiere weisen hier jedoch leicht erhöhte CD69 und CD80 Expressionsspiegel, sowie signifikant höhere CD86-Spiegel auf als naive RAG1<sup>-/-</sup> Tiere.

### 3.3 TLR-Stimulation von B-Zellen

---

Unter 3.2 konnten wir zeigen, dass B-Zellen in der Frühphase der peritonealen Sepsis mit einer Hochregulation der Aktivierungsmarker CD69 und CD86 reagieren. Um die in den Vorversuchen gezeigten Effekte hinsichtlich der stark gestiegenen Mortalität der RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse im CASP Modell der Sepsis besser erklären zu können, wollten wir herausfinden, ob B-Zellen direkt auf TLR-Liganden reagieren können, wie es für Zellen der angeborenen Immunität beschrieben ist. Um dies herauszufinden wurden B-Zellen *ex vivo* stimuliert. Hierfür wurden die aufgereinigten B-Zellen wie unter 2.6.2 beschrieben für 12h mit LPS, Pam3Cys, CpG-ODN und MALP-2 stimuliert. Als Kontrolle diente Zellkulturmedium allein. Um die direkte Rolle von TLR-signaling auf die Zytokinproduktion von B-Zellen beweisen zu können, wurden ebenfalls B-Zellen von MyD88<sup>-/-</sup> Mäusen verwendet (Adachi, Kawai et al. 1998). Das zentrale Adaptorprotein MyD88 ist an der Signaltransduktion aller TLRs, bis auf TLR3 beteiligt (Abb.1).

#### 3.3.1 Analyse der Zytokin-/ Chemokinproduktion der B-Zellen von WT-Mäusen 12h nach TLR-Stimulation

Die Zytokinproduktion der mit Zellkulturmedium behandelten Negativkontrollen ist für alle vier gemessenen Zytokine sehr gering (Abb.11).

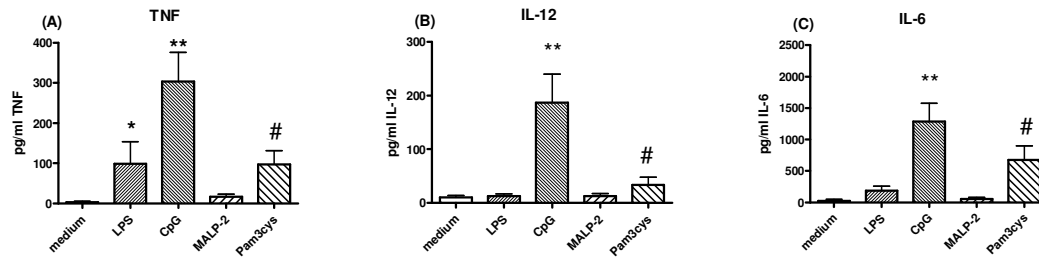
Nach 12h Stimulation mit LPS *ex-vivo* stieg die Zytokinproduktion von TNF- $\alpha$  auf 100 pg/ml und für IL-6 auf 200 pg/ml, die Produktion von IL-12 und IFN- $\gamma$  zeigte jedoch keinen großen Anstieg.

Die TLR-Aktivierung der B-Zellen mit CpG-ODN führte zum stärksten Anstieg der Zytokinproduktion, TNF- $\alpha$  stieg auf 300 pg/ml, IL-12 auf 200 pg/ml, IL-6 auf 1300 pg/ml.

Bei Stimulation mit MALP-2 zeigte sich eine geringe Antwort, für TNF- $\alpha$  stieg der Wert auf 20 pg/ml, IL-12, IL-6 und IFN- $\gamma$  hingegen zeigten kaum einen Anstieg zur Negativkontrolle.

Stimuliert man die B-Zellen mit Pam3Cys zeigte sich für alle drei gemessenen Zytokine ein Produktionsanstieg, die TNF- $\alpha$  Produktion der Zellen betrug 100 pg/ml, die IL-12 Produktion 40 pg/ml und IL-6 stieg auf 700 pg/ml.

Somit ließ sich für alle drei Stimulationsagenzien eine Induktion der Zytokinproduktion an B-Zellen *ex-vivo* registrieren.



**Abb.11 Spiegel der Zytokine TNF, IL-12 und IL-6 von *ex-vivo* WT-B-Zellen nach 12h Stimulation mit TLR-Liganden. (\* p=0,05 Medium vs. LPS, \*\* p=0,05 Medium vs. CpG-ODN, § p=0,05 Medium vs. MALP-2, # p=0,05 Medium vs. Pam3Cys)**

**A:** Die TNF- $\alpha$  Produktion lässt sich mit den vier TLR-Liganden erhöhen, der stärkste Aktivator ist CpG-ODN

**B:** IL-12 Produktion steigt mit CpG und Pam3Cys

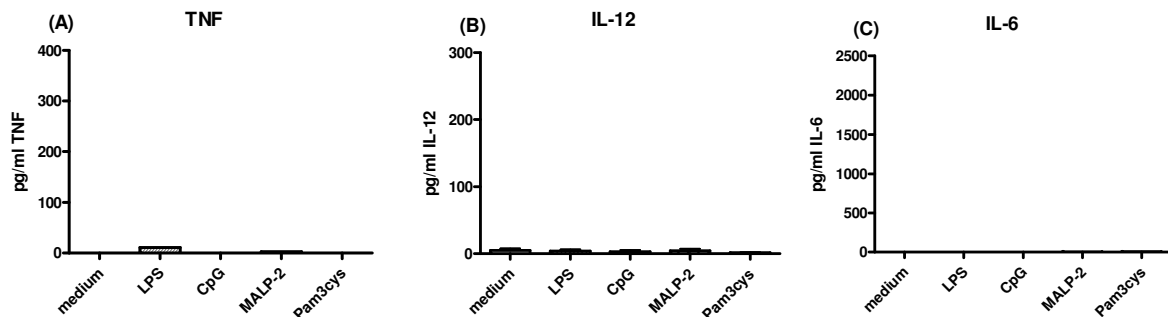
**C:** IL-6 Produktion lässt sich durch LPS, CpG und Pam3Cys erhöhen

### 3.3.2 Analyse der Zytokin-/ Chemokinproduktion der B-Zellen von *MyD88*<sup>-/-</sup> Mäusen 12h nach TLR-Stimulation

Um die in 3.3.1 gezeigten Effekte sicher der Aktivierung über die TLR-Kaskade zuschreiben zu können haben wir zur Kontrolle ebenfalls B-Zellen von *Myd88*<sup>-/-</sup> Mäusen mit den TLR-Stimuli inkubiert.

Dabei zeigte sich nur bei Stimulation mit LPS ein minimaler Anstieg der TNF- $\alpha$  Produktion, die anderen TLR-Liganden führen nicht zur Produktion der gemessenen Zytokine (Abb.12).

Es konnte also gezeigt werden, dass sich B-Zellen *ex-vivo* durch TLR-Liganden stimulieren lassen und darauf mit erhöhter Zytokinproduktion reagieren. Der stärkste Reiz ist CpG-ODN. B-Zellen der *MyD88*<sup>-/-</sup> Mäuse hingegen lassen sich durch die hier gegebenen Agenzien nicht stimulieren mit Ausnahme von LPS, das zu einer leichten Erhöhung der TNF-Produktion führte.



**Abb.12 Spiegel der Zytokine TNF, IL-12 und IL-6 und IFN-g von *ex-vivo* *MyD88*<sup>-/-</sup>-B-Zellen nach 12h Stimulation mit TLR-Liganden. (\* p=0,05 Medium vs. LPS, \*\* p=0,05 Medium vs. CpG-ODN, § p=0,05 Medium vs. MALP-2, # p=0,05 Medium vs. Pam3Cys)**

Nur durch LPS lässt sich die TNF-Produktion der *MyD88*<sup>-/-</sup> B-Zellen erhöhen.

### 3.4 Zytokin-/Chemokinanalyse in der CASP RAG1<sup>-/-</sup> vs. WT

---

Der Aktivierungsgrad einer Zelle alleine gibt sicher keine allumfassende Auskunft über den Immunstatus der zu beobachtenden Maus. Die Zellen des Immunsystems wie B- und T-Lymphozyten kommunizieren und interagieren in den einzelnen Geweben mit Hilfe der Zytokine und Chemokine. Diese sind für ein weites Spektrum an Aufgaben zuständig, beispielsweise für die Entwicklung und Organisation der Lymphgewebe. Aber auch während entzündlicher Vorgänge und während bakterieller Infektion wie Sepsis werden Zyto- und Chemokine produziert um die Immunreaktion zu initiieren und aufrecht zu erhalten. Da in den bisherigen Ergebnissen gezeigt werden konnte, dass RAG1<sup>-/-</sup> Tiere eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Sepsis aufweisen, sollte durch Analyse der Zytokin- und Chemokinproduktion systemisch und in peripheren Organen nachgewiesen werden, inwiefern das Fehlen von B- und oder T-Zellen Einfluss auf die Entzündungsreaktion während Sepsis nimmt.

Ziel des Experimentes war es, die Unterschiede der Zytokin-/ Chemokinproduktion zwischen C57/BL6 WT und RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen sechs Stunden nach CAPS-OP zu analysieren.

Hierfür wurden die Mäuse einer CASP-OP unterzogen (2.4.1) und nach sechs Stunden geopfert. Die Organe wurden nach Perfusion (2.5.3) entnommen und wie in (2.7.1) beschrieben homogenisiert.

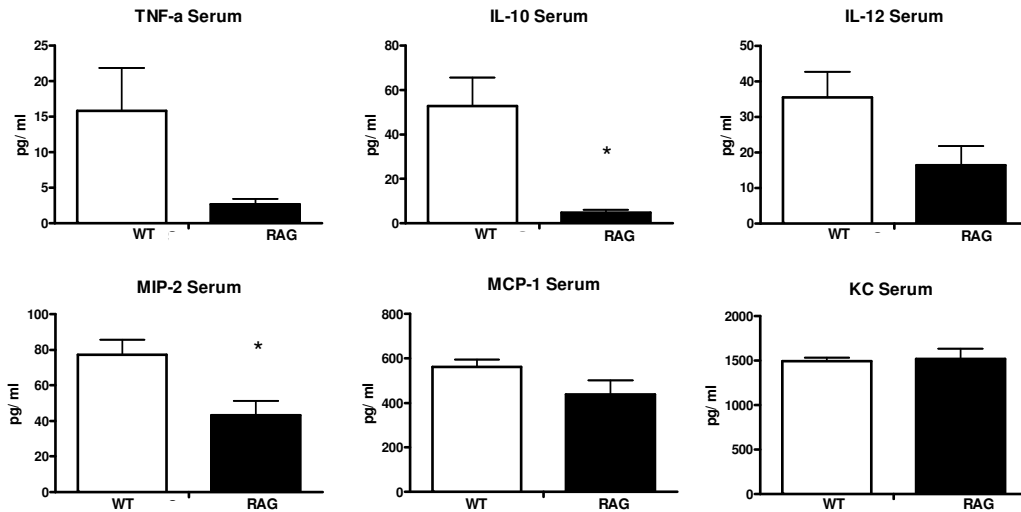
Die Werte wurden mittels Gesamt-Protein-Assays nach Pierce (2.7.2) normalisiert.

#### 3.4.1 Systemische Zytokin-/ Chemokinbestimmung:

Um das Ausmaß der Entzündungsreaktion systemisch zu untersuchen wurde die Produktion wichtiger Immunmediatoren der Sepsis untersucht. Sepsisinduktion führt rasch zu einer massiven Produktion von Zyto- und Chemokinen. 6-12h nach CASP-Induktion ist das Vollbild der Sepsis erreicht (Feterowski, Novotny et al. 2005), so dass zu diesem Zeitpunkt die Mediatorkonzentration im Serum bestimmt wurden (Abb.13).

Es konnte in septischen RAG-1<sup>-/-</sup> Tieren eine signifikant verringerte IL-10 Produktion nachgewiesen werden ( $p=0,0102$ ), auch die TNF- $\alpha$  sowie die IL-12 Produktion waren in den RAG1<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu WT-Tieren verringert.

Die Expression des Chemokins MIP-2 wies signifikant niedrigere Werte in der RAG-Gruppe als in der WT-Gruppe auf, MCP-1 hingegen zeigte nur eine leichte Tendenz in die gleiche Richtung, für KC waren keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu finden.



**Abb.13 Systemische Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10 und CXCL1 im Serum 12h nach Peritonitisinduktion.**

(\*  $p < 0,05$  WT vs RAG-1<sup>-/-</sup>)

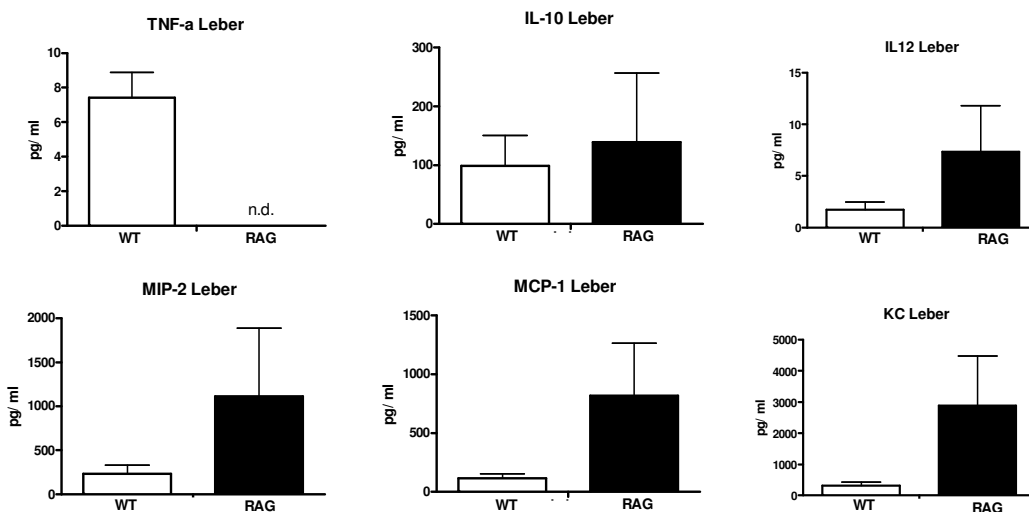
Signifikant erniedrigte IL-10 u. MIP-2 Produktion in RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen.

Tendenz zu erniedrigter TNF- $\alpha$ , IL-12 u. MCP-1 Produktion in RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen.

### 3.4.2 Zytokin-/ Chemokinbestimmung im Lebergewebe:

Die Leber stellt eines der schnell reagierenden Gewebe während der Sepsis dar.

Die Analyse des Lebergewebes hinsichtlich der Zyto-/ Chemokinproduktion zeigte, dass eine leicht erhöhte Produktion von IL-10 und IL-12 in RAG-1<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu WT-Tieren zu beobachten ist (Abb.14). Die TNF- $\alpha$ -Produktion der RAG1<sup>-/-</sup> Tiere lag unter der Nachweisgrenze des ELISAs. Bei den Chemokinen MIP-2, MCP-1 und KC zeigte sich ebenfalls eine leicht erhöhte Produktion im Vergleich zu WT-Tieren. Allerdings sind die Ergebnisse statistisch nicht signifikant.



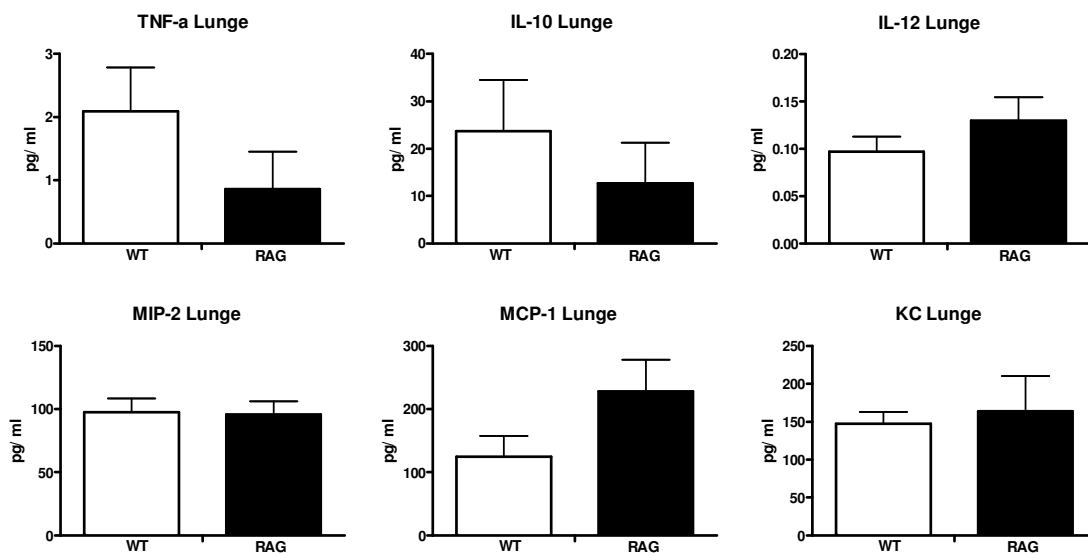
**Abb.14 Lokale Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10 und CXCL1 in der Leber 12h nach Peritonitisinduktion.**

Tendenzen für höhere Messwerte in RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen sind nicht signifikant.

(n.d. - TNF- $\alpha$  für RAG1<sup>-/-</sup> unter der Nachweisgrenze.)

### 3.4.3 Zytokin-/ Chemokinbestimmung im Lungengewebe:

In der Lunge beobachtete man bei den Zytokinen TNF- $\alpha$  und IL-10 einen leichten Abfall der Zytokinproduktion in der RAG-Gruppe im Vergleich zu der Gruppe der WT-Mäuse (Abb.15). Die detektierten Mengen an IL-12 lagen an der Nachweisgrenze und | deshalb nicht beurteilt werden. Die Produktion von MIP-2 war für beide Gruppen ähnlich, dahingegen waren MCP-1 und KC in RAG-defizienten Tieren im Vergleich zu WT-Tieren leicht erhöht.



**Abb.15 Lokale Spiegel der Zyto- und Chemokine TNF, IL-12, IL-10 und CXCL1 in der Lunge 12h nach Peritonitisinduktion.**

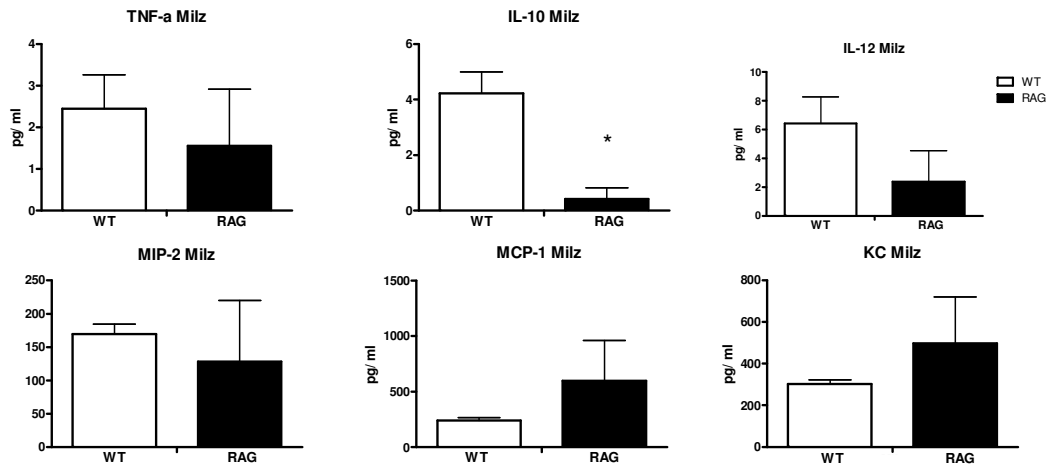
Niedrigere Werte in der RAG1<sup>-/-</sup> Gruppe für TNF- $\alpha$  und IL-10.

Tendenz für höhere Werte der RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse bei MCP-1 und KC, nicht signifikant.

### 3.4.4 Zytokin-/ Chemokinbestimmung im Milzgewebe:

Bei der Analyse der Milz würde man zwischen den WT und den RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen Unterschiede hinsichtlich der Zyto- und Chemokinproduktion erwarten (Abb.16). Schließlich fehlen bei den RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen reife B- und T-Zellen, die unter anderem für die Produktion von Mediatoren verantwortlich sein könnten.

Die Analyse der TNF-Produktion in der Milz der beiden Gruppen zeigte keinen Unterschied, zumal die Messwerte an der Nachweisgrenze liegen. Die Produktion von IL-10 hingegen war in den RAG-1<sup>-/-</sup> Tieren signifikant ( $P=0,0113$ ) verringert im Vergleich zu WT-Tieren. Die Produktion von IL-12 und MIP-2 ist ebenfalls reduziert, allerdings ist der Unterschied hier ( $P_{IL-12}=0,2034$ ) nicht signifikant. Die beiden Chemokine MCP-1 und KC waren in RAG-1-defizienten Tieren leicht erhöht im Vergleich zu WT-Tieren.



**Abb.16 Lokale Spiegel der Zyto- und Chemokine TNF, IL-12, IL-10 und CXCL1 in der Milz 12h nach Peritonitisinduktion.**

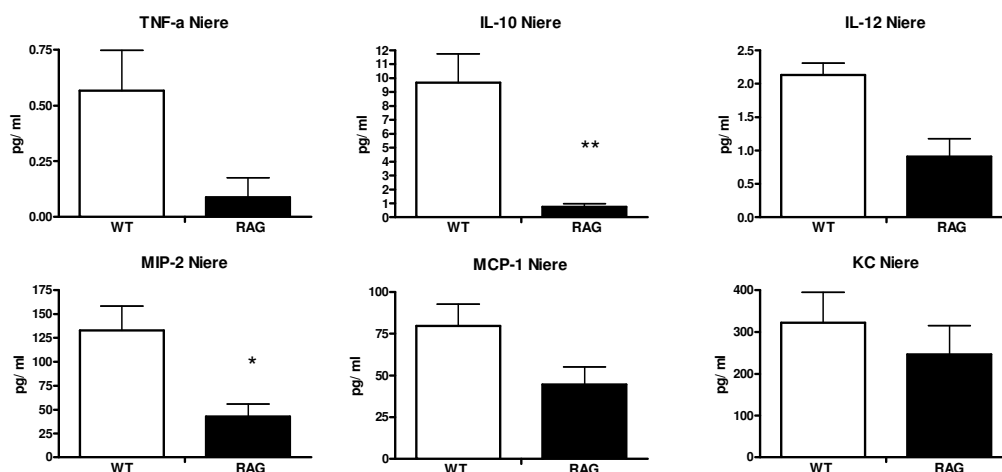
(\*  $p < 0,05$  WT vs RAG-1<sup>-/-</sup>)

Signifikant niedrigere IL-10 und nicht signifikant niedrigere IL-12 u. MIP-2 Produktion bei den RAG1<sup>-/-</sup> Tieren. Tendenz zu höherer Chemokinproduktion in RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen für MCP-1 und KC.

### 3.4.5 Zytokin-/ Chemokinbestimmung im Nierengewebe:

Die Bestimmung der Zytokine im Nierengewebe zeigte ebenfalls eine verringerte Produktion wichtiger Sepsismediatoren in RAG-1-defizienten Tieren im Vergleich zu WT-Tieren (Abb.17). Der Unterschied für IL-10 war ( $P=0,0051$ ) hoch signifikant, für TNF- $\alpha$  und IL-12 hingegen war nur eine Tendenz zu beobachten. Zudem liegen die Werte der letztgenannten Zytokine an der Nachweisgrenze, eine Beurteilung ist so schwierig durchführbar.

Auch die Chemokine MIP-2 und MCP-1 sind in RAG-defizienten Tieren weniger stark exprimiert als in WT-Tieren, die Produktion von KC hingegen ist nicht verändert.



**Abb.17 Lokale Spiegel der Zyto- und Chemokine TNF, IL-12, IL-10 und CXCL1 in der Niere 12h nach Peritonitisinduktion**

(\*  $p < 0,05$  WT vs RAG-1<sup>-/-</sup>, \*\*  $p < 0,05$  WT vs RAG-1<sup>-/-</sup>)

WT-Mäuse hochsignifikant gesteigerte IL-10, signifikant gesteigerte MIP-2 sowie Tendenz zu gesteigerter Produktion für MCP-1 u. KC im Vergleich zu RAG1<sup>-/-</sup>

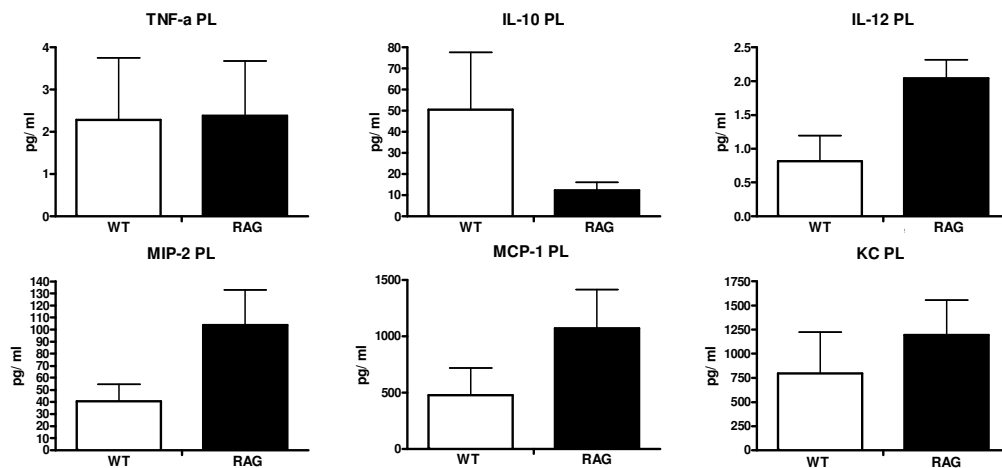
Messwert für TNF- $\alpha$  u. IL-12 am Messminimum.



### 3.4.6 Zytokin-/ Chemokinbestimmung in der Peritonealflüssigkeit:

Im Weiteren wurde die Zyto-und Chemokinproduktion in der Bauchhöhle, direkt am Entzündungsort untersucht. Sepsis führt zu einem Einstrom von Effektorzellen in die Bauchhöhle, die durch Sepsis induziert Zytokine und Chemokine reguliert wird (Kurihara, Warr et al. 1997; Feterowski, Mack et al. 2004). Die Bestimmung von TNF- $\alpha$  in den Peritonealflüssigkeitproben konnte keinen Unterschied zwischen den WT- und den RAG-1-defizienten Mäusen aufzeigen (Abb.18). Zwar konnte eine reduzierte Produktion von IL-10 und ein leichter Anstieg der IL-12 Produktion nachgewiesen werden, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Die Chemokine MIP-2, MCP-1 und KC wurden in den RAG1<sup>-/-</sup> Tieren etwas stärker exprimiert als in WT-Tieren, jedoch sind die Messergebnisse statistisch nicht signifikant.



**Abb.18 Lokale Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10 und CXCL1 in der Peritonealflüssigkeit 12h nach Peritonitisinduktion**

Tendenz alternierende IL-10 Produktion sowie gesteigerte IL-12, MIP-2, MCP-1 u. KC Produktion für RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse. Ergebnisse nicht signifikant.

Diese Daten zeigen, dass in RAG-1<sup>-/-</sup> Tieren 6h nach CASP die systemische Produktion von IL-10, IL12, TNF- $\alpha$  und MIP2 stark reduziert war.

Dies konnte ebenfalls in den peripheren Organen Milz und Niere gezeigt werden, im Fall der Milz ist die Rolle der B- und T-Zellen Aufgrund der histologischen Beschaffenheit des Organs von großer Bedeutung.

Leber und Lunge hingegen zeigen hinsichtlich der Zytokinproduktion in der Sepsis keine großen Unterschiede zwischen WT und RAG1 defizienten Mäusen.

Fast durchgängig zeigen sich Veränderungen für IL-10 und IL-12, die Chemokine waren im Gegensatz zu Zytokinen bei den RAG1<sup>-/-</sup> Tieren eher erhöht, MIP2 stellt hier eine Ausnahme dar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Fehlen reifer T- und B-Zellen zu veränderter Mediatorproduktion während Sepsis führt und das dies zur verstärkten Suszeptibilität gegenüber Sepsis beitragen kann.

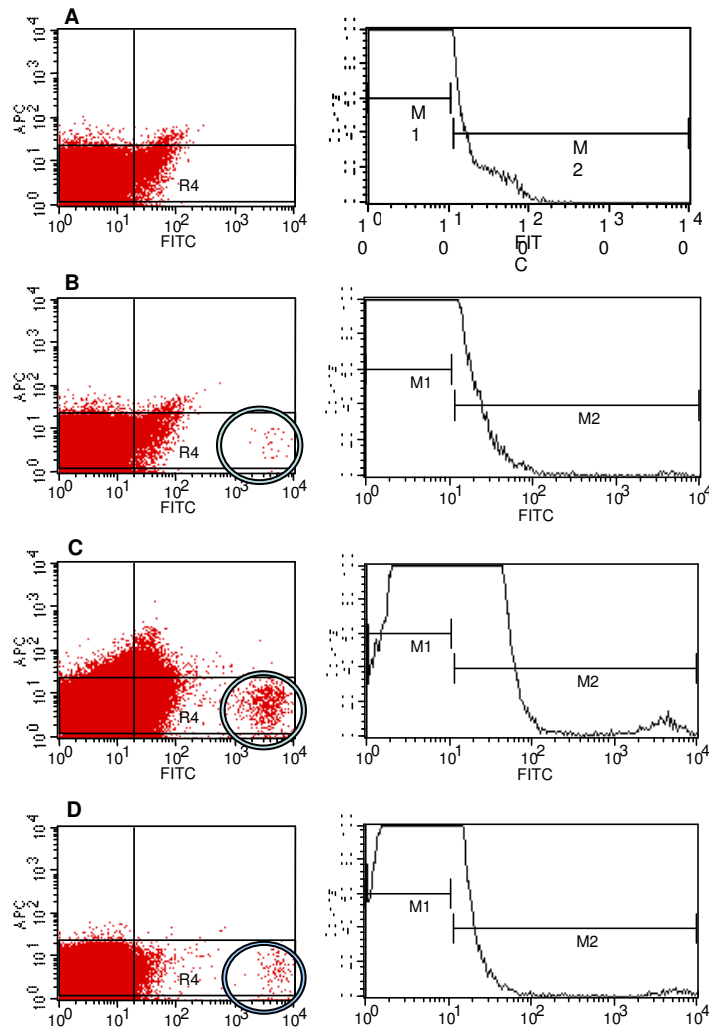
### 3.5 Rekonstitutionsvorversuch

Bisher konnte gezeigt werden, dass B-Zellen während der Sepsis aktiviert werden, ebenso konnten wir zeigen, dass B-Zellen *in vitro* direkt nach TLR Stimulation mit Zytokinproduktion reagieren. Aus diesem Grund wollten wir überprüfen, ob B-Zellen *in vivo* während Sepsis eine Rolle spielen. Um die Rolle der B-Zellen weiter zu untersuchen wollten wir überprüfen, ob durch die Rekonstitution von B-Zellen aus WT-Mäusen in die RAG1<sup>-/-</sup> Tiere die in den vorangegangenen Experimenten beobachteten Defizite ausgeglichen würden. Dazu wurde eine Versuchsanordnung aufgestellt, in der die notwendige Menge der zu rekonstituierenden B-Zellen sowie deren Verbleib in der Maus analysiert werden sollte. Hierfür wurden B-Zellen zweimal per MACS aufgereinigt (Tab. 10), um die Reinheit der B-Zellen weiter zu verbessern, und mit dem intrazellulären fluoreszierenden Farbstoff CFSE markiert.

Tab. 10 B-Zell-Aufreinigung	% B-Zellen
Kontrolle, unbehandelt	49,6 %
B-Zell-Isolation	83,7 %

Diese wurden dann in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen  $1 \times 10^6$  und  $1,5 \times 10^7$  B-Zellen in die Schwanzvene von WT- und RAG-1<sup>-/-</sup> Mäusen injiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Mäuse geopfert und die Menge an CFSE markierten Zellen der unterschiedlichen Gewebeproben wurden im FACS analysiert. (Abb.19).

Sowohl in C57/BL6 WT- Mäusen als auch in RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen konnten wir nach Injektion von  $1,5 \times 10^7$  B-Zellen drei Tage vor Organentnahme, CFSE positive Zellen in Milz, Peritonealflüssigkeit und Blut wiederfinden. Der Anteil der Hochpositiven Zellen im FITC Kanal betrug in der Milz der WT-Maus 4,78%, in der Milz der RAG1<sup>-/-</sup> Maus 27,9% und im Blut der RAG1<sup>-/-</sup> 7,5%. Unsere Ergebnisse decken sich mit den in der Literatur zum Thema B-Zell-Rekonstitution gefundenen Angaben (Shelley, Murphy et al. 2003). Somit wurden die folgenden Experimente mit dieser Versuchsanordnung durchgeführt.



**Abb.19: Rekonstitutionsnachweis im FACS:** rekonstituierte B-Zellen erscheinen im FITC-Kanal hochpositiv, zur Differenzierung wurde mit B220 gegengefärbt:

**A:** unbehandelte WT - Kontrolle, keine hochpositiven Zellen im FITC-Kanal

**B:** mit  $1,5 \times 10^7$  B-Zellen i.v. rekonstituierte WT-Maus, hochpositive Zellen im FITC-Kanal

**C:** mit  $1,5 \times 10^7$  B-Zelle rekonstituierte RAG<sup>-/-</sup> Maus, hochpositive Zellen im FITC-Kanal

**D:** mit  $1,5 \times 10^7$  B-Zellen i.v. rekonstituierte Maus, hochpositive Zellen im FITC-Kanal

### 3.6 Überlebensexperiment B-Zell-Rekonstitution in RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse

Um genau zu überprüfen, ob B-Zellen *in vivo* während Sepsis eine Rolle spielen haben wir RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse, die keine reifen B-Zellen besitzen, mit B-Zellen nach obiger Versuchsanordnung rekonstituiert und die so behandelten Mäuse hinsichtlich ihrer Mortalität im CASP-Modell beurteilt.

Hierfür wurden analog zu den Vorversuchen in 3.5  $1,5 \times 10^7$  WT-B-Zellen in RAG-1<sup>-/-</sup> substituiert und die Mäuse einer CASP-OP unterzogen. RAG-1<sup>-/-</sup>Mäuse, denen das identische Volumen PBS injiziert wurden, dienten als Kontrolle. Die Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten mit je drei B-Zell-rekonstituierten und drei Kontroll-Mäusen durchgeführt (Abb.20):

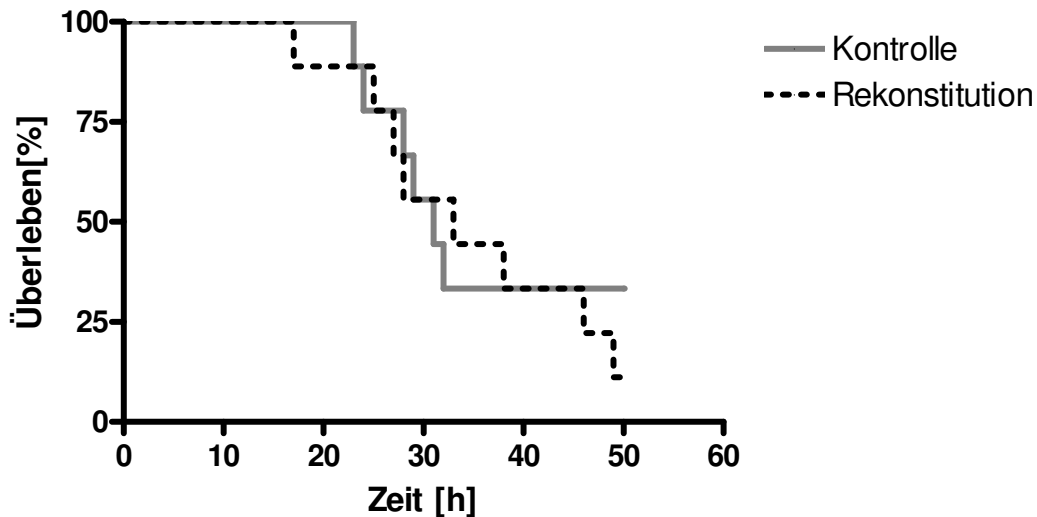


Abb.20: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier - mit  $1,5 \times 10^7$  B-Zellen rekonstituierte  $RAG1^{-/-}$  Mäuse vs. naive Tiere.  
Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

In den ersten 17h nach Operation waren alle Tiere am Leben, klinisch zeigte sich v.a. in der Kontrollgruppe ein ausgeprägteres Krankheitsbild als bei der rekonstituierten Gruppe. Dieses ist durch eine schockartige Klinik wie Schwäche, Tremor, Zyanose und belegte Augen gekennzeichnet.

Am Ende des Versuchs zur Stunde 50 waren noch eine rekonstituierte und drei Kontrollmäuse am Leben. Die Überlebenskurven zeigten keinen signifikanten Unterschied, obwohl die Klinik ein leicht verbessertes Krankheitsbild in den mit B-Zellen rekonstituierten Tieren zeigte.

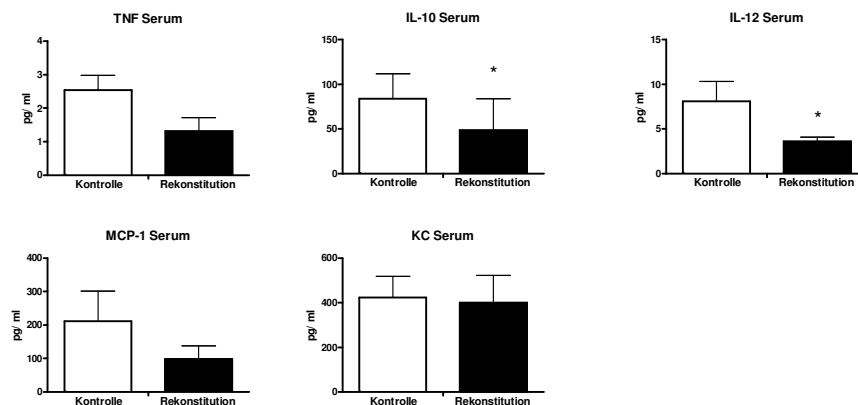
### 3.7 Zytokin-/ Chemokinbestimmung B-Zell-Rekonstitution in $RAG1^{-/-}$ Mäusen

Im Anschluss an die Überlebensexperimente mit den rekonstituierten Mäusen war es unser Ziel, die klinischen Beobachtungen auf Ebene der Zyto- und Chemokine zu bestätigen. Hierfür wurden alle Tiere 12h nach CASP geopfert und der Analyse per ELISA unterzogen (2.7). Die Analyse der  $RAG1^{-/-}$  Tiere zeigte, dass vor allem die Zytokine IL-10, TNF- $\alpha$  und IL-12 supprimiert waren. Tragen B-Zellen zur effizienten Produktion von Zytokinen während Sepsis bei, sollten die rekonstituierten Tiere wieder ähnlich wie Wildtypiere reagieren. Untersucht wurden Gewebeproben aus Serum, Leber, Lunge, Milz, Niere, sowie der Peritonealflüssigkeit, die verwendeten ELISA-Antikörper waren gegen TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12, MCP-1 und KC gerichtet.

### 3.7.1 Systemische Zytokinbestimmung im Serum:

Die systemische Produktion der Zytokine TNF- $\alpha$  ( $p=0,0738$ ), IL-10 ( $p=0,0423$ ) und IL-12 ( $p=0,04821$ ) der rekonstituierten Mäuse war gegenüber der der Kontrollgruppe verringert.

Auch für MCP-1 war die Produktion bei den rekonstituierten Tieren geringer, das Ergebnis ist nicht signifikant. Die KC-Produktion hingegen zeigte keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen.



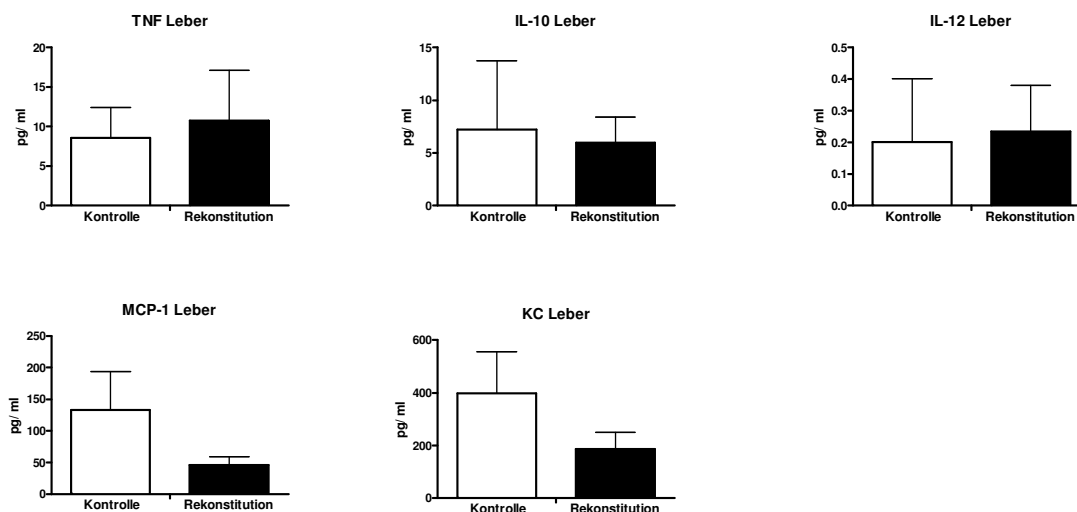
**Abb.20** Systemische Spiegel der Zyto- und Chemokine TNF, IL-12, IL-10, MCP-1 und KC im Serum 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. Vorbehandlung 72h vor CASP mit  $1,5 \times 10^7$  B-Zellen. Kontrollgruppe nur CASP.

(\*  $p < 0,05$  Kontrolle vs. Rekonstitution)

IL-10 und IL-12 niedrigere Konzentration bei rekonstituierten Mäusen.

### 3.7.2 Zytokinbestimmung im Lebergewebe:

Die Produktion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-12 wies zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf. Für MCP-1 und KC war allenfalls eine Tendenz hin zu eher niedrigeren Werten in den rekonstituierten Tieren zu beobachten (Abb. 3.7.2).

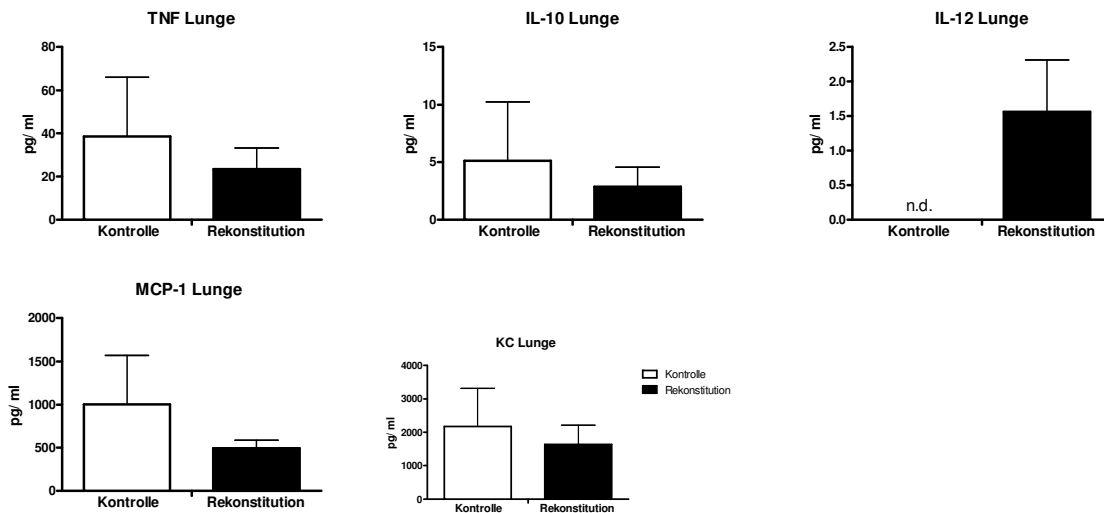


**Abb.22** Lokaler Spiegel der Zyto- und Chemokine TNF, IL-12, IL-10, MCP-1 und KC in der Leber 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. Vorbehandlung 72h vor CASP mit  $1,5 \times 10^7$  B-Zellen. Kontrollgruppe nur CASP.

Keine signifikanten Unterschiede.

### 3.7.3 Zytokinbestimmung im Lungengewebe:

Im Lungengewebe wurde für die rekonstituierten Mäuse im Vergleich zu den unbehandelten Tieren eine weniger starke Zytokinproduktion für TNF- $\alpha$ , IL-10, MCP-1 und KC nachgewiesen, die Differenz war jedoch nicht signifikant. IL-12 konnte praktisch nicht nachgewiesen werden, die Kontrollgruppe weist keinen und die Rekonstitutionsgruppe einen knapp an der Nachweisgrenze liegenden Wert auf.

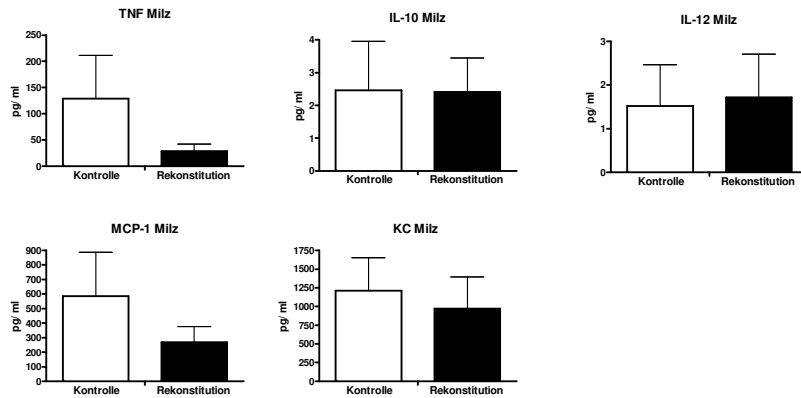


**Abb.23** Lokaler Spiegel der Zyto- und Chemokine TNF, IL-12, IL-10, MCP-1 und KC in der Lunge 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. Vorbehandlung 72h vor CASP mit  $1,5 \times 10^7$  B-Zellen. Kontrollgruppe nur CASP.

Reduzierte Zytokinproduktion der rekonstituierten Mäuse.  
Messwert für IL-12 unter der Nachweisgrenze.

### 3.7.4 Zytokinbestimmung im Milzgewebe:

Bei der Analyse der Zytokinproduktion im Milzgewebe mittels ELISA konnten wir niedrigere TNF- $\alpha$  Werte bei den rekonstituierten Tieren im Vergleich zu den Unbehandelten ermitteln, der Unterschied ist nicht signifikant. Die Zytokine IL-10 und IL-12 lagen beide an der Nachweisgrenze und wiesen keinen Unterschied in den beiden Gruppen auf. Die MCP-1-Produktion war in den behandelten Tiere niedriger als den unbehandelten, jedoch sind die Unterschiede ebenfalls nicht signifikant ( $P=0,2808$ )



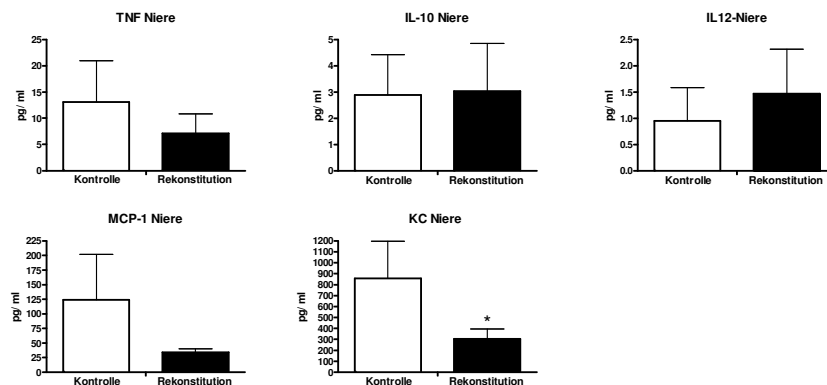
**Abb.24** Lokaler Spiegel der Zyto- und Chemokine TNF, IL-12, IL-10, MCP-1 und KC in der Milz 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. Vorbehandlung 72h vor CASP mit 1,5x10<sup>7</sup> B-Zellen. Kontrollgruppe nur CASP.

TNF- $\alpha$  für rekonstituierte Tiere erniedrigt, nicht signifikant.  
IL-10 und IL-12 an der Nachweisgrenze.

### 3.7.5 Zytokinbestimmung im Nierengewebe:

Auch im Nierengewebe war die TNF- $\alpha$  Produktion bei den rekonstituierten Mäusen geringer als bei Kontrolltieren. Die Zytokine IL-10 und IL-12 konnten wir hier nicht verlässlich bestimmen, die Werte liegen dicht an der unteren Nachweisgrenze.

MCP-1 und KC wiesen ebenfalls leicht erniedrigte Konzentrationen in der Niere der rekonstituierten Tiere auf, für KC liegt der p-Wert des T-Tests mit p=0,098 jedoch nur knapp oberhalb der Signifikanz.

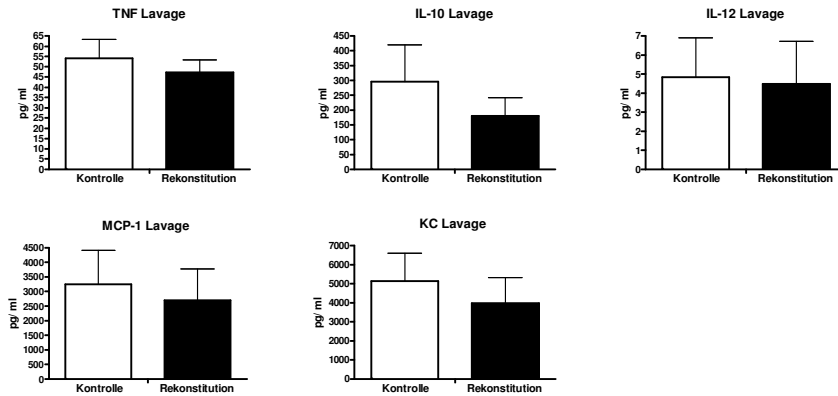


**Abb.25** Lokaler Spiegel der Zyto- und Chemokine TNF, IL-12, IL-10, MCP-1 und KC in der Niere 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. Vorbehandlung 72h vor CASP mit 1,5x10<sup>7</sup> B-Zellen. Kontrollgruppe nur CASP.

KC zeigt signifikant erniedrigte Konzentration bei Rekonstitution.

### 3.7.6 Zytokinbestimmung in der Peritonealflüssigkeit:

In der Peritonealflüssigkeit war kaum ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu sehen. Einzig für die IL-10 Bestimmungen konnte man etwas niedrigere Werte für die rekonstituierten Tiere nachweisen, auch hier war die Differenz jedoch nicht signifikant.



**Abb.26** Lokaler Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10, MCP-1 und KC in der PL 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. Vorbehandlung 72h vor CASP mit 1,5x10<sup>7</sup> B-Zellen. Kontrollgruppe nur CASP.

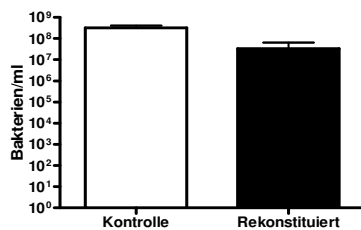
Kein signifikanter Unterschied in den Gruppen.

### 3.8 Bakterienlast der Peritonealflüssigkeit 12h nach CASP

Um den Effekt der bakteriellen Abwehr direkt am Focus der Sepsis beurteilen zu können wurden die Bauchhöhle gespült und die erhaltene Flüssigkeit in unterschiedlichen Konzentrationen auf Blutagarplatten ausplattiert und für 20h bei 37 °C inkubiert (2.6.3) um CFU (Colony Forming Units) zu bestimmen.

Hier konnten wir zeigen, dass die mit B-Zellen vorbehandelten Mäuse eine geringere bakterielle Belastung der Bauchhöhle aufweisen als die unbehandelten Kontrollen (Abb.27).

Auch hier waren keine signifikanten Ergebnisse zu erzielen.



**Abb. 27** Bakterienlast der Peritoneallavage 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen 20h auf Blutagar inkubiert. Vorbehandlung 72h vor CASP mit 1,5x10<sup>7</sup> B-Zellen. Kontrollgruppe nur CASP.

Kein signifikanter Unterschied.

Diese Daten zeigen, dass trotz der Andeutungen zu klinischer Besserung der mit B-Zellen rekonstituierter RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse in der Sepsis sich für diese keine Überlebensvorteile gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren ergeben haben. Auch die Auswertung der Zytokin-/Chemokinanalysen 12h nach CASP und Rekonstitution von 1,5x10<sup>7</sup> B-Zellen zeigte, dass die in Kapitel 3.4 gezeigten Unterschiede hinsichtlich der Zytokinproduktion



zwischen WT und RAG1-defizienten Mäusen in der Sepsis nicht aufgehoben werden konnten.

Die Analyse der systemischen Zytokinproduktion (Abb.21) zeigte eine signifikante Reduktion von IL-12 und IL-10 bei den rekonstituierten Mäusen nach CASP, auch die unmittelbar vom Fehlen der reifen B- und T-Zellen Betroffenen Organe Milz (Abb.24) und Niere (Abb.25) zeigten eine Tendenz für eine reduzierte Zytokinproduktion nach Rekonstitution.

Die Produktion der hier analysierten Proteine war in den restlichen Organen durch die B-Zell-Rekonstitution nicht verändert.

Die bakterielle Besiedlung der Bauchhöhle der rekonstituierten Mäuse war leicht reduziert im Vergleich zu nicht rekonstituierten Tieren aber ebenfalls nicht signifikant niedriger als die naive RAG1<sup>-/-</sup> Maus in der Sepsis.

Somit hat die alleinige Rekonstitution von aufgereinigten B-Zellen nicht zur Wiederherstellung des Ausgangsphänotyps geführt.

#### 4. Diskussion

Im Rahmen unserer Arbeit sind wir der Frage nach der Rolle des adaptiven Immunsystems in der Immunpathologie der polymikrobiellen Sepsis nachgegangen.

Begonnen haben unsere Arbeiten mit dem Befund der signifikant erhöhten Mortalität von RAG1-defizienten Mäusen in CASP-Experimenten bereits während der ersten 24h nach Infektion. Diese Beobachtung warf die Frage nach dem Grund für die hohe Mortalität der Tiere auf, da in RAG1-defizienten Tieren die Zellen der adaptiven Immunität in Form reifer B- und T-Zellen fehlen, jedoch das in der Frühphase der Sepsis entscheidende, angeborene Immunsystem nicht beeinträchtigt sein sollte. Nach dem gängigem Konzept benötigt das erworbene Immunsystem etwa 72h für eine adäquate Immunreaktion auf eine Infektion, so war es für uns erstaunlich, dass sich das Fehlen der B- und T-Zellen schon binnen 24h in der Sepsis auf das Überleben der Tiere ausgewirkt hat.

Die überraschend hohe Suszeptibilität der RAG1<sup>-/-</sup> Tiere in der Sepsis ließ uns auf noch unbekannte Funktionen der B- oder T-Lymphozyten in den ersten Stunden nach einer Infektion schließen. Schon die Arbeitsgruppe um Hotchkiss et al. hat im Zusammenhang mit der Funktion von Caspase-Inhibitoren auf die wichtige Rolle der Lymphozyten während der Sepsis verwiesen und ebenfalls eine 100% Mortalität in Sepsis Experimenten mit RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen nachweisen können (Hotchkiss, Chang et al. 2000). Die Autoren beschreiben eine gesteigerte Überlebensrate bei septischen Tieren nach Gabe von Caspase-Inhibitoren, diese Effekte konnten sie in RAG1-defizienten Mäusen jedoch nicht nachweisen, somit schrieben sie den protektiven Effekt auf die durch Caspase-Inhibitoren gehemmten Lymphozytenapoptose zu.

In unseren Arbeiten wollten wir die direkte, proinflammatorische Funktion der B- und T-Lymphozyten eruieren und, wenn möglich, die für die frühen Abwehreffekte zuständige Zellpopulation identifizieren.

Um herauszufinden, welche Zellpopulationen früh nach Sepsisinduktion aktiviert werden, maßen wir zunächst die Expression verschiedenster Aktivierungsmarker. Dies erfolgte nach CASP bzw. Injektion von LPS i.p. zur Positivkontrolle an *ex vivo* isolierten Milzzellen.

Dabei untersuchten wir die einzelnen Zellpopulationen aus septischen und Kontroll-Milzen auf die Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69, CD80 und CD86 (3.2).

Die stärkste Aktivierung der Zellen erreichten wir, wie erwartet, durch den TLR4-Stimulus LPS, der bis auf wenige Ausnahmen zu einem signifikanten Anstieg der Aktivierungsmarker führte.

Aber auch durch den weitaus Reiz der CASP, der aufgrund seiner realistischen Simulation des Krankheitsbilds Sepsis viel eher zur Evaluation der Rolle der Lymphozyten in der Sepsis geeignet ist (Maier, Traeger et al. 2004), konnte uns Hinweise auf das Immungeschehen in der Frühphase der Peritonitis liefern. So reagierten die klassischen Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und dendritische Zellen (DC) mit einer signifikanten Hochregulation der untersuchten Aktivierungsmarker CD69, CD80 und CD86.

Emmanuilidis et al. wiesen auf die die kritische Rolle von Makrophagen am Beispiel der Kupffer-Zellen der Leber während der Sepsis hin (Emmanuilidis, Weighardt et al. 2001). Es wurde vor allem auf die sepsisregulierende Rolle der IL-10 produzierenden Kupffer Zellen hingewiesen. Durch i.v. Injektion von Clodronate-Liposomen, die zur Apoptose spezifischer Makrophagenpopulationen, vor allem den Kupffer-Zellen der Leber und der Marginalzonenmakrophagen (MZM) der Milz führen, ist die Überlebensrate nach CASP von 50% auf unter 10% gesunken. Der durch das Fehlen der Kupffer-Zellen bedingte Anstieg der Mortalität in der Sepsis verdeutlicht die wichtige Rolle dieser Zellpopulation für generalisierte Immungeschehen.

Ebenfalls von großer Bedeutung während der Sepsis sind dendritische Zellen (Flohe, Agrawal et al. 2006). Es konnte gezeigt werden dass die Aktivierungsmarker CD40 und CD86 auf DCs der Milz in den ersten 15h nach Sepsisinduktion hochreguliert werden, 36h nach Sepsisinduktion konnte eine Hochregulation von MHC-I- und MHC-II-Molekülen, jedoch keine Aufregulation von CD80 gezeigt werden. Dies steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen. Wir konnten 12h nach CASP eine signifikante Hochregulation von CD80 auf CD11c<sup>+</sup> Zellen der Milz erkennen und ebenso ein Anstieg von CD69 und CD86.

Eine Hochregulation der Expression von CD80 konnte von den Autoren nur auf DCs aus den Lymphknoten gezeigt werden.

Für eine Erklärung der Gegensätze lässt sich die Verwendung unterschiedlicher Mausstämme, wie auch die unterschiedliche Art der Sepsisinduktion heranziehen. Hierzu ist anzumerken, dass Flohe et al. das Modell der CLP (1.2), nicht aber das eher dem Krankheitsbild einer fulminanten Sepsis entsprechenden Modell der CASP, angewandt haben. Die CLP entspricht laut einer Studie von Maier et al. (Maier, Traeger et al. 2004) dem

Krankheitsbild eines intraabdominellen Abszesses und somit mit einem lokal begrenzten Geschehen. Andererseits ist es nicht verwunderlich, wenn unterschiedliche Expressionslevel von Aktivierungsantigenen in verschiedenen Organen nachzuweisen sind. Beispielsweise finden sich in Lymphknoten und Milz unterschiedliche DC Subpopulationen, die sich unter anderem in ihrer Fähigkeit zur T-Zell Rekrutierung unterscheiden. So konnte in Arbeiten für DCs der Milz ein Fehlen der Expression, des für die T-Zell Rekrutierung wichtigen CCL17 (auch: thymus and activation-regulated chemokine = TARC) nachgewiesen werden (Alferink, Lieberam et al. 2003), so dass für die einzelnen Gewebetypen hinsichtlich der DCs durchaus Unterschiede im Phänotyp erwartet werden dürfen.

Weitere Arbeiten (Scumpia, McAuliffe et al. 2005) haben sich mit der funktionellen Rolle der DCs in der Sepsis befasst. Mäuse, die den humanen Diphtherietoxinrezeptor unter der Kontrolle des CD11c Promotors exprimieren (Jung, Unutmaz et al. 2002), so dass durch Diphtherietoxingabe etwa 90% aller DCs depletiert werden konnten, zeigten nach Depletion erhöhte Mortalität auf. Anschließende Rekonstitution mit murinen DCs hatte protektive Wirkung und zeigt so deren großen Einfluss auf die Immunabwehr in der Sepsis. In CD11c-DTR Tieren stieg die Mortalität in Überlebensexperimenten von 40% auf 90%, verglichen zu WT, an. Nach Rekonstitution von  $1 \times 10^7$  aus Knochenmark von Mäusen generierten DCs konnte die Mortalität wieder auf über 40% gesenkt werden. Auch diese Arbeit zeigt eindrucksvoll die bedeutende Rolle der Zellen des angeborenen Immunsystems in der Sepsis und deckt sich mit unseren Daten insofern, dass DC eine wichtige Rolle für die Immunantwort während Sepsis spielen.

Des Weiteren scheint es, wie unsere Überlebensexperimente und die Arbeiten von Hotchkiss et al (Hotchkiss, Chang et al. 2000) vermuten lassen, dass Lymphozyten ebenfalls eine essentielle Rolle in der Frühphase der Sepsis besitzen. Jedoch lassen unsere Daten zur Zellaktivierung vor allem auf eine frühe Funktion der B-Lymphozyten schließen. So zeigen die T-Zellen keine Hochregulation der untersuchten Aktivierungsmarker in der Sepsis, B-Zellen hingegen antworten auf den Sepsis-Reiz mit der Hochregulation von CD69 und CD86, allerdings nicht mit einer Regulation von CD80, im Gegensatz zu den Zellen des angeborenen Immunsystems. Möglicherweise handelt es sich hier um zellspezifische Unterschiede zwischen B-Zellen gegenüber DCs und Makrophagen, die in der unterschiedlichen Funktion der B-Zellen im Vergleich zu DCs und Makrophagen begründet sein könnte.

Im Weiteren richtete sich unser Hauptaugenmerk auf die genaue Rolle der B-Zellen hinsichtlich ihrer Funktion in der Frühphase der Sepsis.

Um der Frage nach der direkten oder indirekten Aktivierung der B-Zellen nachzugehen, untersuchten wir deren Fähigkeit, *ex vivo* auf TLR-Reize mit der Produktion von Zytokinen zu antworten. In der Literatur gibt es diverse Belege hierfür (Bernasconi, Onai et al. 2003; Claudia R. Ruprecht 2006) (Bekeredjian-Ding, Inamura et al. 2007). Interessant ist hier der Unterschied zwischen murinen und humanen B-Zellen. In humanen B-Zellen wirken TLRs als essentielle Korezeptoren für den B-Zell-Rezeptor (BCR) zur Aktivierung der naiven B-Zellen, eine B-Zell-Stimulation allein durch TLRs ist demnach beim Menschen nicht möglich (Claudia R. Ruprecht 2006). Ob die Ergebnisse dieser Arbeit in unterschiedlichen Experimentalsystemen reproduzierbar sind wird sich zeigen, für murine B-Zellen scheint dies auf jeden Fall nicht zu gelten. Diese können auch über einen singulären TLR Reiz aktiviert werden. In der Literatur gibt es Hinweise, dass insbesondere durch CpG-ODN vermittelte TLR9 Aktivierung zur Induktion des Transkriptionsfaktors T-bet und zur Produktion von IL-12 führt (Liu, Ohnishi et al. 2003). Klinische Anwendung findet die Möglichkeit der Aktivierung von B-Zellen durch TLR unter anderem in der Erforschung und zukünftigen Therapie des Systemischen Lupus Erythematosus (SLE). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die B-Zell-Aktivierung bei Autoimmunprozessen wie SLE durch Immunkomplexe, die TLR7 und auch TLR9 aktivieren, erfolgt. Dies zeigt Ansätze für neue Therapien durch Unterbrechung der jeweiligen TLR-Kaskaden auf (Savarese, Chae et al. 2006).

In unseren Experimenten stimulierten wir aufgereinigte B-Zellen aus naiven WT Mäusen mit LPS, Pam3Cys, CpG und MALP-2 (Uematsu and Akira 2006) und maßen deren Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6 sowie IFN- $\gamma$ .

Um sicherzugehen, dass etwaige gemessene Änderungen der Zytokinproduktion nach Stimulation auch wirklich auf eine Antwort des TLR- Systems zurückzuführen sind, wurden die Versuche ebenfalls an Zellen aus MyD88<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt, die aufgrund des Fehlens des Adapterproteins MyD88 keine vollständige TLR- Kaskade besitzen und nicht auf TLR- Stimuli reagieren können (Adachi, Kawai et al. 1998) (Kawai, Adachi et al. 1999).

Hier konnte gezeigt werden, dass B-Zellen in der Lage sind, auf MyD88-abhängige TLR-Stimuli zu reagieren, was eine Erklärung für den Phänotyp der B-Zell defizienten RAG1<sup>-/-</sup> Tiere während akuter Sepsis liefern könnte.

Auffällig ist die relativ schwache Reaktion der B-Zellen auf LPS, vor allem im Vergleich zu CpG-ODN. So wird die IL-12 Produktion der B-Zellen einzig durch CpG Stimulation erhöht. Diese Beobachtung ist für DCs und Makrophagen nicht nachzuweisen. Diese zeigen auch

durch Stimulation mit TLR4 Liganden einen Anstieg der IL-12 Produktion (Heike Weighardt 2004). B-Zellen exprimieren neben TLR4 auch RP105. RP105 (CD180) gehört zur TLR-Familie, besitzt aber keine TIR Domäne. Ursprünglich konnte seine Expression nur auf B-Zellen nachgewiesen werden, aber auch die Expression auf Makrophagen konnte gezeigt werden (Ogata, Su et al. 2000), RP105 kann durch LPS aktiviert werden. Kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass RP105 in B-Zellen als Negativregulator von TLR4 induziertem Signaling wirkt. (Divanovic, Trompette et al. 2005). Die geringe Reaktion der B-Zellen auf LPS könnte also durch Negativ-Regulation durch RP105 bedingt sein.

Diese Daten, die zeigen, dass B-Zellen schon binnen 24h nach Sepsisinduktion mit Hochregulation von Aktivierungsmarkern, sowie *ex vivo* auf TLR-Stimuli reagieren können veranlasste uns zu der Frage, ob die Zytokinproduktion der RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse während Sepsis im Vergleich zu septischen WT Mäusen verändert war.

Dafür wurden jeweils die in der Sepsis akut betroffenen Organe Leber, Lunge, Milz und Niere (Annane, Aegerter et al. 2003; Karlsson, Varpula et al. 2007) als auch Peritoneallavageflüssigkeit, sowie Serum im ELISA auf die Produktion der sepsisrelevanten Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 (Finnerty, Herndon et al. 2007), MIP-2, MCP-1 (Matsukawa, Hogaboam et al. 1999) und KC (murines IL-8) untersucht.

Systemisch konnte eine reduzierte Produktion von IL-10, IL12, TNF- $\alpha$  und MIP2 bei den RAG1<sup>-/-</sup> Tieren nachgewiesen werden. Diese in der Sepsis wichtigen Zyto- und Chemokine können prinzipiell von B-Zellen produziert werden und haben zum Beispiel die Aktivierung von Immunzellen zur Folge. Durch das Fehlen ist dies und damit die akute Erregerabwehr eingeschränkt.

In Lunge und Leber sind kaum Unterschiede zwischen den RAG1-defizienten und den WT Mäusen zu beobachten. Da die Mehrheit der Immunzellen in diesen Organe Makrophagen und DC, nicht aber Lymphozyten sind, könnten sich diese Ergebnisse so erklären lassen.

In der Niere, als primäres Schockorgan in der Sepsis, die schnell durch klinische Faktoren wie Hypotension in ihrer Funktion beeinträchtigt werden kann, zeigen sich reduzierte Zytokinmengen. Zwar ist auch die Niere eher ein Gewebe in dem sich wenige Lymphozyten befinden, jedoch konnte gezeigt werden, dass bei WT Mäusen 24h nach Gabe von LPS i.p. zum einen ein akutes Nierenversagen aber auch ein massives, T-Zell-vermitteltes Einwandern von neutrophilen Granulozyten stattfindet (Singbartl, Bockhorn et al. 2005). Somit könnte die

hier reduzierte Zytokinproduktion auf ein Fehlen der von den T-Zellen über CD28 rekrutierten Neutrophilen zurück zu führen zu sein.

Auch in der Milz konnte ein ähnlicher Rückgang der Zytokinproduktion festgestellt werden. Hier bietet sich zur Erklärung sowohl das Fehlen der B- als auch der T-Zellen an, beide Populationen sind in der Milz in großer Anzahl vorhanden und fehlen in den RAG1<sup>-/-</sup> Tieren. Die Milz RAG1-defizienter Mäuse weicht sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch stark von der Histologie der WT-Milz ab. So konnte für die Milzarchitektur von RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen eine veränderte Anordnung der DCs gezeigt werden (Crowley, Reilly et al. 1999). Auch scheint es, dass die DCs derart dicht angeordnet sind, dass die normale Abgrenzung der einzelnen Subpopulation nicht mehr möglich ist. Auch war die Anzahl der CD11c<sup>+</sup> Zellen in der Milz auf fast 30% des WT Phänotyps reduziert. Dies könnte neben der reduzierten Zytokinproduktion weitere, essentielle Funktionseinschränkungen zur Folge haben.

Ein weiterer, wichtiger Unterschied zwischen den RAG-defizienten und den WT-Tieren stellt die Marginalzone der Milz dar. Diese ist bei den RAG1<sup>-/-</sup> Tieren nicht so stark ausgeprägt, so dass hier wichtige Interaktionen für die Antigenpräsentation während der Sepsis möglicherweise nicht richtig funktionieren. Die Bedeutung der Marginalzone für die Erregerabwehr konnte z.B. bei Arbeiten zu SIGN-R1 (specific intracellular adhesion moleculegrabbing Nonintegrin) gezeigt werden, einem murinen Typ-C Lektin, dass auf Makrophagen der Marginalzone stark exprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass SIGN-R1<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant anfälliger auf Infektionen ausgelöst durch *Streptococcus pneumoniae* sind und diese die Entfernung der Bakterien aus dem Kreislauf nicht bewältigen können (Lanoue, Clatworthy et al. 2004).

Ebenfalls für die Immunpathologie der Sepsis von großer Bedeutung ist die Funktion der Marginalzonen B-Zellen (MZ-B-Zellen). Diese stellen im Verbund mit weiteren Immunzellen die erste Reihe der Abwehr von sich hämatogen verbreitenden Bakterien, Viren und Toxinen dar. Neben ihrer Fähigkeit natürliche Antikörper vom Typ IgM zu produzieren besitzen sie auch die Fähigkeit, T-Zellen zu aktivieren und direkt mit Makrophagen und dendritischen Zellen zu interagieren (Lopes-Carvalho, Foote et al. 2005).

Die in RAG1-defizienten Mäusen beobachteten, starken Veränderungen der Marginalzone (Crowley, Reilly et al. 1999) könnten somit zum Ausbleiben der initialen Immunantwort in der Milz beitragen und in Verbindung mit dem generellen Fehlen der B- und T-Zellen in der Milz Grund für die veränderte Mediatorproduktion septischer RAG1<sup>-/-</sup> Maus Milzen sein.

Die größten Unterschiede zwischen septischen WT und RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen hinsichtlich der Zytokinproduktion besteht für die sepsis-relevanten Zytokine IL-12 (Moreno, Alves-Filho et al. 2006) und IL-10. Wie oben schon erwähnt konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die IL-10 Produktion von Makrophagen in der Sepsis für die Immunpathologie der Sepsis wichtig ist. Allerdings können auch B-, sowie T-Zellen prinzipiell IL-10 produzieren. Der geringere IL-12 Spiegel in den RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen sowie die damit verbundene geringere Produktion von IFN- $\gamma$  könnte zu geringerer Induktion der bakterizid wirkenden Sauerstoffradikale (oxidative burst) und der NO<sub>x</sub> produzierenden, induzierbaren NO Synthetase (iNOS) führen (Entleutner, Traeger et al. 2006).

Um die erhöhte Suszeptibilität der RAG1<sup>-/-</sup> Tiere in der Sepsis einer der fehlenden Zellpopulationen zuordnen zu können, war es unser Ziel die Mäuse vor CASP mit einzelnen Zellpopulationen zu rekonstituieren. In der Literatur gab es bereits Hinweise, dass die Rekonstitution von Splenozyten in RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse deren Überleben in der Sepsis begünstigt. So konnten Shelly et al. im Rahmen der Forschung zur posttraumatischen Sepsis nach schweren Verbrennungen die hohe Sepsis-Suszeptibilität RAG1-defizienter Tiere durch die Rekonstitution von  $1 \times 10^7$  Milzzellen deutlich reduzieren (Shelley, Murphy et al. 2003).

Unsere Arbeit hatte bislang gezeigt, dass B-Zellen prinzipiell aktivierbar sind, so dass wir unsere Rekonstitutionsexperimente mit aus WT-Milzen aufgereinigten B-Zellen begannen um so *in vivo* Einblicke in deren Funktion in der Sepsis zu erhalten.

Im Rahmen einiger Vorversuche konnten wir zeigen, dass sich  $1,5 \times 10^7$  i.v. rekonstituierte B-Zellen auch drei Tage nach Injektion in unterschiedlichen Organen wieder finden lassen. Dies ist wichtig, da die Funktion der B-Zellen und das Zusammenspiel mit anderen Zellen des Immunsystems von ihrer Lokalisation abhängig sind. So wollten wir zeigen, dass die Zellen nicht nur im Blut und in der Bauchhöhle, sondern auch in der Milz wieder zu finden sind. Diese wäre für die Wiederherstellung des WT Phänotyps bei der Rekonstitution der RAG1-defizienten Tiere essentiell.

Die Rekonstitution der B-Zellen in RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte jedoch keine signifikante Verbesserung hinsichtlich der hohen Mortalität, einzig in der klinischen Beurteilung der Tiere zeigten die rekonstituierten Mäuse ein schwächer ausgeprägtes Krankheitsbild. Hier muss jedoch auf die Subjektivität dieses Ergebnisses hingewiesen werden.

Ebenso konnte nach Zytokinanalysen gezeigt werden, dass der Phänotyp der WT Maus durch die alleinige Rekonstitution von B-Zellen i.v. nicht wieder hergestellt werden konnte.



Diese Experimente werfen die Frage auf, ob eine genügend große Anzahl B-Zellen 3 Tage nach i.v. Injektion ihren Bestimmungsort gefunden, dort wie in einer WT Maus ihre Funktion aufgenommen haben und ob die injizierte Zahl der Zellen für eine Veränderung des Immunverhaltens unserer Testtiere ausgereicht hat. Die Untersuchung von Milzen RAG1-defizienter Mäuse nach Rekonstitution von B-Zellen hat gezeigt, dass sich diese zwar in den Milzen wieder finden lassen, die Milzarchitektur jedoch nicht wiederhergestellt wird. So ergab sich bei histologischen Untersuchungen sieben Tage nach Rekonstitution keine dem WT Phänotyp entsprechende Ansiedlung der DCs und Marginalzonenmakrophagen (Crowley, Reilly et al. 1999).

Auch der Zeitpunkt der optimalen Rekonstitution bedarf weiterer Untersuchungen. In unseren Vorversuchen erwies sich der Zeitpunkt, drei Tage vor CASP, zum Nachweis der Zellen als günstig, andere Arbeitsgruppen tendieren teilweise zu früheren (Shelley, Murphy et al. 2003) als auch späteren Zeitpunkten (Buiting, De Rover et al. 1995) für autologe Zelltransfers, wobei immer der unterschiedliche Aufbau der einzelnen Arbeiten und die Eigenschaften der rekonstituierten Zellpopulationen im Auge behalten werden müssen.

Und auch hier kommt erneut die Frage nach der vollständig veränderten Milz Histologie RAG1-defizienter Mäuse auf. Kann es sein, dass ohne den korrekten Aufbau der Milz die Funktion der B-Zellen stark eingeschränkt ist?

Interessanterweise zeigt die Produktion der Zytokine IL-12 und IL-10 einen weiteren Abfall in den rekonstituierten Tiere. Dies hatte sich bereits im Vergleich der RAG1<sup>-/-</sup> zu den WT Mäusen gezeigt. Hier hatten wir das Fehlen der B-Zellen und deren Fähigkeit zur IL-12 Produktion wie bereits in Kapitel 3.3.1 beschrieben, für den Abfall der IL-12 Produktion verantwortlich gemacht, nach einer Rekonstitution der B-Zellen wäre also eher ein Anstieg von IL-12 zu erwarten gewesen. Dies könnte ein weiteres Indiz für die Fehlfunktion der rekonstituierten Zellen sein.

Somit lässt sich abschließend erkennen, dass unsere Hypothese über die Rolle der B-Zellen in der Frühphase der Sepsis nicht in der von uns vermuteten Weise zu halten ist. Zwar mag es durchaus wichtige Funktionen für diese Population geben, jedoch kann die erhöhte Mortalität der RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse nicht allein durch das Ersetzen der B-Zellen gesenkt werden. So bleibt die Frage, ob möglicherweise die Rekonstitution von T-Zellen zu besseren Ergebnissen führen würde. Für diese konnten wir keine Hochregulation der Aktivierungsmarker erkennen, jedoch konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass T-Zellen in der Lage sind, das proinflammatorische Zytokin IL-22 während Sepsis zu produzieren (Weber, Schlautkotter et al. 2007). Inhibition von IL-22 führt am Ort der Infektion zu einer Reduktion der

Bakterienlast, erhöht die bakterizide Aktivität von Leber und Niere und hat somit auch beispielsweise einen geringeren Nierenschaden in der Sepsis zur Folge.

Zudem spielen T-Zellen nach CD28-Ligation eine Rolle bei der Nierenfunktion während Sepsis. Diese in die Nieren rekrutierte T-Zellen haben vor allem regulatorische Aufgaben und verhindern ein oftmals letal endendes akutes Nierenversagen in der Sepsis (Singbartl, Bockhorn et al. 2005).

Ein weiteres Indiz für die Bedeutung der T-Zellen in der peritonealen Sepsis zeigen Untersuchungen zu den „suppressor of cytokine signaling“ Proteinen (SOCS), die Zytokinausschüttung inhibieren können. Es konnte gezeigt werden, dass SOCS5 von T-Zellen exprimiert wird und dort eine regulatorische und aktivierende Funktion für Prozesse der angeborenen Immunität besitzt. So zeigen Mäuse mit einer Überexpression von SOCS5 eine reduzierte Bakterienlast und eine reduzierte Mortalität in der Sepsis, was auf eine verstärkte Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie auf erhöhten IL-12, IFN- $\gamma$  sowie TNF- $\alpha$  Spiegeln zurückzuführen ist (Watanabe, Kubo et al. 2006).

Es wäre also durchaus interessant, analog zu unseren Arbeiten mit B-Zellen, die Rolle der T-Zelle in der Frühphase der Sepsis intensiver zu untersuchen.

Trotzdem können möglicherweise die Zellen der Milz ohne die gesamte Organstruktur ihre Funktionen nicht korrekt ausführen. Es scheint, als ob die Gesamtheit der Milz und das Zusammenspiel der einzelnen Zellpopulationen für die Bakterienerkennung essentiell sind.

Die genaue Abfolge der Bakterienerkennung in der Milz ist immer noch nicht vollständig verstanden und bedarf weiterer Erforschung. So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass *E. coli* 30 Minuten nach i.p. Injektion hauptsächlich in der Marginalzone der Milz zu finden waren und erst im Verlauf über die Milz streuten. (Unveröffentlicht: S. Kaiser-Moore, D. Reim, H. Weighardt).

Dies weist auf eine mögliche Rolle der Marginalzone in der bakteriellen Abwehr auf der Ebene der Pathogenerkennung hin. Da diese jedoch in RAG1-defizienten und mit B-Zellen rekonstituierten Mäusen nicht dem WT Phänotyp entsprechend ausgebildet ist, könnte dies eine weitere Erklärung für das Ausbleiben eines Überlebensvorteils der rekonstituierten Mäuse im Sepsismodell liefern.

Hier finden sich Ansätze für weitere Arbeiten. Interessant wäre die genauere histologische Untersuchung der Marginalzone, denkbar wäre zum Beispiel die genauere Analyse von Mäusen, die Defekte in der Ausbildung der bekannten Marginalzonen-Marker SIGIRR1 und MARCO zeigen, da für diese Tiere bereits Defekte in der Erkennung von Thymus

unabhängigen Typ 2 Antigenen (hier Hüllpolysaccharide von *Streptococcus pneumoniae*) gezeigt wurden (Chen, Pikkarainen et al. 2005).

Ein weitere Ansatz wären Histologien von mit Clodronat depletierten Milzen der RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse, analog zu Arbeiten mit WT Mäusen, die die Marginalzone als wichtigsten Bereich zur Präsentation der Antigene in der Milz hervorstellen konnten (Aichele, Zinke et al. 2003). Aichele et al. zeigten weiterhin die grundlegende Rolle der Marginalzonen Makrophagen für das Überleben bei sublethaler Injektion von Listerien, hier zeigten die mit Clodronat depletierten Mäuse große Nachteile im Überleben.

Dies sollte den Anstoß für intensivere Arbeiten zum Thema der Funktion der Marginalzonen Makrophagen in der Sepsis, vor allem auch bei den RAG-defizienten Tieren geben, um die noch unvollständige Kenntnis über die Funktion der Immunabwehr in der Sepsis besser verstehen und auf dieser Basis effektivere Behandlungsmethoden für die Anwendung in der Medizin entwickeln zu können.

## 5. Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der peritonealen Sepsis bereitet postoperativ noch heute massive Probleme in der Klinik. Da die Immunpathologie der Sepsis noch nicht vollständig verstanden ist, gilt es durch Erforschung der Grundlagen effektivere Therapien zu entwickeln, und die auf Intensivstationen noch immer auszumachende Letalität von über 30% in der peritonealen Sepsis zu reduzieren.

Vorarbeiten in einem Mausmodell der septischen Peritonitis konnten überraschend Überlebensdefizite von RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen, denen reife B- und T-Zellen fehlen, binnen 24h nach Sepsisinduktion per CASP zeigen. Die frühe Immunabwehr bei akuten bakteriellen Infektionen wird nach gängiger Lehrmeinung vom angeborenen Immunsystem bekämpft, das adaptive Immunsystem agiert erst zeitlich nachgeschaltet. Unsere Ergebnisse wiesen aber auf eine wichtige Rolle adaptiver Immunzellen in der Frühphase der Sepsis hin.

Um zu untersuchen, welche Zellpopulationen früh während Sepsis aktiviert werden, wurden mittels Durchflusszytometrie Aktivierungsmarker auf T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen der Milz bestimmt. B-Zellen reagierten mit einer Hochregulation von CD69 und CD86 - nicht aber von CD80 nach CASP. Für die T-Zellen konnte jedoch keine Regulation der Aktivierungsmarker nachgewiesen werden. Aus diesem Grund fokussierte sich die Arbeit auf die Rolle der B-Zellen während Sepsis.

Im Weiteren untersuchten wir *in-vitro*, ob B-Zellen direkt über TLR-Liganden aktiviert werden können. Die Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL6 konnte durch CpG-ODN so wie in geringerem Maße auch durch LPS induziert werden.

Um die Funktion der Lymphozyten nach Sepsis genauer zu analysieren, wurde 12h nach CASP die Zytokin und Chemokinproduktion systemisch, sowie in peripheren Organen von septischen RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Tieren bestimmt. In RAG1<sup>-/-</sup> Tieren ließen sich reduzierte systemische Zytokinlevel für TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12 und MIP2 nachweisen. Dies konnte ebenfalls in Milz und Niere jedoch kaum in Lunge und Leber beobachtet werden. Um die Funktion von B-Zellen *in vivo* zu klären wurden RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse mit  $1,5 \times 10^7$  B-Zellen i.v. rekonstituiert und im Sepsismodell analysiert. Die Überlebensraten rekonstituierter RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten keinen Unterschied zu unbehandelten Kontroll-RAG1<sup>-/-</sup> Tieren. Jedoch konnte eine klinisch Besserung der Versuchstiere in der Sepsis sowie

eine Tendenz für eine reduzierte Bakterienlast beobachtet werden. Zudem zeigte sich eine leicht reduzierte Zytokinproduktion nach Rekonstitution und CASP vor allem in Niere und Milz, jedoch keine Wiederherstellung des WT Phänotyps und auch kein Überlebensvorteil für rekonstituierte Mäuse in der Sepsis.

Somit darf die fehlende Funktion der B-Zelle in der Frühphase der Sepsis als einzige Ursache der Überlebensdefizite der  $RAG1^{-/-}$  Mäuse in Frage gestellt werden.

Auch wenn T-Zellen in unseren Arbeiten nicht mit Regulation von Aktivierungsmarkern auf Entzündungsreize reagiert haben, gilt es im Weiteren, deren Rolle in der Frühphase der peritonealen Sepsis zu ergründen um einen kausalen Zusammenhang zwischen der frühen Mortalität der  $RAG1^{-/-}$  Mäuse in der Frühphase der Sepsis und der fehlenden adaptiven Immunität ausmachen zu können.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIM	activation inducer molecule
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
Bcl-Gene	B-cell leukaemia Gene
BCR	B-Zell-Rezeptor
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
CASP	Colon Ascendens Stent Peritonitis
Caspasen	Cystein-Aspartyl-Proteasen
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester
CFU	Colony Forming Units
CLP	Cecal Ligation and Puncture
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
Cy5	Cyanin 5
DCs	Dendritic Cells = Dendritische Zellen
DHR	Dihydrochlorodamin
DIC	Disseminierte Intravasale Gerinnung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynukleinsäure
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
EGDT	Early Goal-Directed Resuscitation Therapy
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluorescein
FKS	Fötale Kälberserum
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HMGB	High mobility group box protein 1
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN- $\beta$	Interferon Beta
IL	Interleukin
INOS	induzierbare NO Synthetase
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	interferon regulatory factor
KC	keratinocyte-derived chemokine
LPS	Lipopolisaccharid
mAB	muriner Antikörper
MALP	macrophage-activating lipopeptide
MARS	Mixed Antagonistic Response Syndrome
MCP	Monocyte chemoattractant protein-1
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF	macrophage migration inhibitory factor
MIP	Macrophage Inflammatory Protein-2
MOF	Multi organ failure
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene 88
MZ	Marginalzone

---

MZM	Marginalzonenmakrophagen
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor-kappa B
NK	Natürliche Killerzellen
OP	Operation
PAMP	pathogen associated molecular pattern
pCO <sub>2</sub>	Partialdruck Kohlendioxid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PL	Peritoneallavage
PRR	pattern recognition receptor
R	Rezeptor
RAG	Rekombinase Aktivierendes Gen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe combined immune deficiency
SIGN	specific intracellular adhesion moleculegrabbing Nonintegrin
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
SOCS	supressor of cytokine signaling
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell Rezeptor
TF	Tissue Factor
TGF- $\beta$	Transforming groth factor beta
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrosefaktor Alpha
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziirter Faktor
TRIF	TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$
vs.	Versus
WT	Wildtyp

## 7. Literaturverzeichnis

- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., Akira, S. "Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function." *Immunity* 9(1998): 143.
- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., Akira, S. "Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function." *Immunity* 9(1998): 143-50.
- Aichele, P., Zinke, J., Grode, L., Schwendener, R. A., Kaufmann, S. H. E., Seiler, P. "Macrophages of the Splenic Marginal Zone Are Essential for Trapping of Blood-Borne Particulate Antigen but Dispensable for Induction of Specific T Cell Responses." *J Immunol* 171(2003): 1148-1155.
- Aird, W. C. "Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis." *Crit Care Med.* 29(2001): S28.
- Akira, S., Takeda, K. "Toll-like receptor signalling." *Cell* 115(2004): 499.
- Alferink, J., Lieberam, I., Reindl, W., Behrens, A., Weiss, S., Huser, N., Gerauer, K., Ross, R., Reske-Kunz, A. B., Ahmad-Nejad, P., Wagner, H., Forster, I. "Compartmentalized Production of CCL17 In Vivo: Strong Inducibility in Peripheral Dendritic Cells Contrasts Selective Absence from the Spleen." *J. Exp. Med.* 197(2003): 585-599.
- Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., Pinsky, M. R. "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care." *Crit Care Med* 29(2001): 1303-10.
- Anname, D., Aegerter, P., Jars-Guincestre, M. C., Guidet, B. "Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network." *Am J Respir Crit Care Med* 168(2003): 165-72.
- Bekeredjian-Ding, I., Inamura, S., Giese, T., Moll, H., Endres, S., Sing, A., Zahringer, U., Hartmann, G. "Staphylococcus aureus Protein A Triggers T Cell-Independent B Cell Proliferation by Sensitizing B Cells for TLR2 Ligands." *J Immunol* 178(2007): 2803-2812.
- Bernasconi, N. L., Onai, N., Lanzavecchia, A. "A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells." *Blood* 101(2003): 4500-4504.
- Beutler, B., Milsark, I. W., Cerami, A. "Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin." *Science* 229(1985): 869.
- Beutler, B., Rietschel, E. T. "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin." *Nat Rev Immunol* 3(2003): 169-76.
- Bohrer, H., Qiu, F., Zimmermann, T., Zhang, Y., Jllmer, T., Mannel, D., Bottiger, B. W., Stern, D. M., Waldherr, R., Saeger, H. D., Ziegler, R., Bierhaus, A., Martin, E., Nawroth, P. P. "Role of NFkappaB in the mortality of sepsis." *J Clin Invest* 107(2001): 972-85.
- Bone, R. C. "The pathogenesis of sepsis." *Ann Intern Med* 115(1991): 457-69.
- Buiting, A. M., De Rover, Z., Van Rooijen, N. "Brucella abortus causes an accelerated repopulation of the spleen and liver of mice by macrophages after their liposome-mediated depletion." *J Med Microbiol* 42(1995): 133-40.
- Calandra, T., Echtenacher, B., Le Roy, D., Pugin, J., Metz, C. N., H Itner, L., Heumann, D., M., nnel, D., Bucala, R., Glauser, M. P. "Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor." *J Clin Invest* 106(2000): 164.
- Castellanos, M. C., Munoz, C., Montoya, M. C., Lara-Pezzi, E., Lopez-Cabrera, M., de Landazuri, M. O. "Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1." *J Immunol* 159(1997): 5463-5473.



- Chen, Y., Pikkarainen, T., Elomaa, O., Soininen, R., Kodama, T., Kraal, G., Tryggvason, K. "Defective Microarchitecture of the Spleen Marginal Zone and Impaired Response to a Thymus-Independent Type 2 Antigen in Mice Lacking Scavenger Receptors MARCO and SR-A." *J Immunol* 175(2005): 8173-8180.
- Claudia R. Ruprecht, A. L. "Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells." *European Journal of Immunology* 36(2006): 810-816.
- Collins, M., Ling, V., Carreno, B. "The B7 family of immune-regulatory ligands." *Genome Biology* 6(2005): 223.
- Cristina Sobacchi, V. M. F. R. P. V. A. V. "RAG dependent primary immunodeficiencies." *Human Mutation* 27(2006): 1174-1184.
- Crowley, M. T., Reilly, C. R., Lo, D. "Influence of Lymphocytes on the Presence and Organization of Dendritic Cell Subsets in the Spleen." *J Immunol* 163(1999): 4894-4900.
- Divanovic, S., Trompette, A., Atabani, S. F., Madan, R., Golenbock, D. T., Visintin, A., Finberg, R. W., Tarakhovskiy, A., Vogel, S. N., Belkaid, Y., Kurt-Jones, E. A., Karp, C. L. "Inhibition of TLR-4/MD-2 signaling by RP105/MD-1." *J Endotoxin Res* 11(2005): 363-8.
- Echtenacher, B., Falk, W., Mannel, D. N., Krammer, P. H. "Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis." *J Immunol* 145(1990): 3762.
- Emmanuilidis, K., Weighardt, H., Maier, S., Gerauer, K., Fleischmann, T., Zheng, X. X., Hancock, W. W., Holzmann, B., Heidecke, C. D. "Critical role of Kupffer cell-derived IL-10 for host defense in septic peritonitis." *J Immunol* 167(2001): 3919.
- Entleutner, M., Traeger, T., Westerholt, A., Holzmann, B., Stier, A., Pfeffer, K., Maier, S., Heidecke, C. D. "Impact of interleukin-12, oxidative burst, and iNOS on the survival of murine fecal peritonitis." *Int J Colorectal Dis* 21(2006): 64-70.
- Feterowski, C., Mack, M., Weighardt, H., Bartsch, B., Kaiser-Moore, S., Holzmann, B. "CC chemokine receptor 2 regulates leukocyte recruitment and IL-10 production during acute polymicrobial sepsis." *J Immunol* 173(2004): 3664.
- Feterowski, C., Novotny, A., Kaiser-Moore, S., Muhlradt, P. F., Rossmann-Bloech, T., Rump, M., Holzmann, B., Weighardt, H. "Attenuated pathogenesis of polymicrobial peritonitis in mice after TLR2 agonist pre-treatment involves ST2 up-regulation." *J Immunol* 175(2005): 1035.
- Finnerty, C. C., Herndon, D. N., Chinkes, D. L., Jeschke, M. G. "Serum cytokine differences in severely burned children with and without sepsis." *Shock* 27(2007): 4-9
- Flohe, S. B., Agrawal, H., Schmitz, D., Gertz, M., Flohe, S., Schade, F. U. "Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response." *J Leukoc Biol* 79(2006): 473-481.
- Heidecke, C. D., Weighardt, H., Hensler, T., Bartels, H., Holzmann, B. "[Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival]." *Chirurg* 71(2000): 159-65.
- Heike Weighardt, G. J. J. M. R. L. K. H. B. B. H. "Identification of a TLR4- and TRIF-dependent activation program of dendritic cells." *European Journal of Immunology* 34(2004): 558-564.
- Hörner, C., Bouchon, A., Bierhaus, A., Nawroth, P. P., Martin, E., Bardenheuer, H. J., Weigand, M. A. "Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis." *Anaesthesist* 53(2004): 10.
- Hotchkiss, R. S., Chang, K. C., Swanson, P. E., Tinsley, K. W., Hui, J. J., Klender, P., Xanthoudakis, S., Roy, S., Black, C., Grimm, E., Aspiotis, R., Han, Y., Nicholson, D. W., Karl, I. E. "Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte." *Nat Immunol* 1(2000): 496-501.

- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2001). Immunobiology. New York and London, Garland Publishing.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G.-I., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., Pamer, E. G., Littman, D. R., Lang, R. A. "In Vivo Depletion of CD11c+ Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8+ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens." *Immunity* 17(2002): 211-220.
- Karlsson, S., Varpula, M., Ruokonen, E., Pettila, V., Parviainen, I., Ala-Kokko, T. I., Kolho, E., Rintala, E. M. "Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study." *Intensive Care Med*(2007).
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." *J Biol Chem* 274(1999): 115.
- Kox, W. J., Volk, T., Kox, S. N., Volk, H. D. "Immunomodulatory therapies in sepsis." *Intensive Care Medicine* 26(2000): S124-S128.
- Kurihara, T., Warr, G., Loy, J., Bravo, R. "Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor." *J Biol Chem* 272(1997): 1757.
- Lanoue, A., Clatworthy, M. R., Smith, P., Green, S., Townsend, M. J., Jolin, H. E., Smith, K. G., Fallon, P. G., McKenzie, A. N. "SIGN-R1 contributes to protection against lethal pneumococcal infection in mice." *J Exp Med* 200(2004): 1383-93.
- Liu, N., Ohnishi, N., Ni, L., Akira, S., Bacon, K. B. "CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells." *Nat Immunol* 4(2003): 687-93.
- Lopes-Carvalho, T., Foote, J., Kearney, J. F. "Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation." *Current Opinion in Immunology* 17(2005): 244-250.
- Maier, S., Traeger, T., Entleutner, M., Westerholt, A., Kleist, B., Hoser, N., Holzmann, B., Stier, A., Pfeffer, K., Heidecke, C. D. "Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis." *Shock* 21(2004): 505.
- Marx, G., Schuerholz, T., Reinhart, K. "Intensivmedizinische Aspekte bei Sepsis." *Der Chirurg* 76(2005): 845-855.
- Matsukawa, A., Hogaboam, C. M., Lukacs, N. W., Lincoln, P. M., Strieter, R. M., Kunkel, S. L. "Endogenous Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) Protects Mice in a Model of Acute Septic Peritonitis: Cross-Talk Between MCP-1 and Leukotriene B4." *J Immunol* 163(1999): 6148-6154.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C. A. "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* 388(1997): 394.
- Moreno, S. E., Alves-Filho, J. C., Alfaya, T. M., da Silva, J. S., Ferreira, S. H., Liew, F. Y. "IL-12, but Not IL-18, Is Critical to Neutrophil Activation and Resistance to Polymicrobial Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture." *J Immunol* 177(2006): 3218-3224.
- Muller-Werdan, U. "[Septic shock and systemic inflammatory response syndrome--diagnosis]." *Dtsch Med Wochenschr* 128(2003): 2368-71.
- Notarangelo, L. D., Villa, A., Schwarz, K. "RAG and RAG defects." *Curr Opin Immunol* 11(1999): 435-42.
- Ogata, H., Su, I. h., Miyake, K., Nagai, Y., Akashi, S., Mecklenbrauker, I., Rajewsky, K., Kimoto, M., Tarakhovsky, A. "The Toll-like Receptor Protein RP105 Regulates Lipopolysaccharide Signaling in B Cells." *J. Exp. Med.* 192(2000): 23-30.
- Ohlsson, K., Bjork, P., Bergenfeldt, M., Hageman, R., Thompson, R. C. "Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock." *Nature* 348(1990): 550-2.
- Ollila, J., Vihinen, M. "B cells." *Int J Biochem Cell Biol* 37(2005): 518-23.
- Reinhart, K., Karzai, W. "Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned." *Crit Care Med* 29(2001): S121-5.

- Rivers, E. P., McIntyre, L., Morro, D. C., Rivers, K. K. "Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taking advantage of a window of opportunity." *CMAJ* 173(2005): 1054-1065.
- Rosen, M. J., Narasimhan, M. "Critical care of immunocompromised patients: human immunodeficiency virus." *Crit Care Med* 34(2006): S245-50.
- Savarese, E., Chae, O.-w., Trowitzsch, S., Weber, G., Kastner, B., Akira, S., Wagner, H., Schmid, R. M., Bauer, S., Krug, A. "U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7." *Blood* 107(2006): 3229-3234.
- Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., Medzhitov, R. "Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses." *J Biol Chem* 276(2001): 947.
- Scumpia, P. O., McAuliffe, P. F., O'Malley, K. A., Ungaro, R., Uchida, T., Matsumoto, T., Remick, D. G., Clare-Salzler, M. J., Moldawer, L. L., Efron, P. A. "CD11c+ Dendritic Cells Are Required for Survival in Murine Polymicrobial Sepsis." *J Immunol* 175(2005): 3282-3286.
- Shelley, O., Murphy, T., Paterson, H., Mannick, J. A., Lederer, J. A. "Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury." *Shock* 20(2003): 123.
- Singbartl, K., Bockhorn, S. G., Zarbock, A., Schmolke, M., Van Aken, H. "T Cells Modulate Neutrophil-Dependent Acute Renal Failure during Endotoxemia: Critical Role for CD28." *J Am Soc Nephrol* 16(2005): 720-728.
- Theze, J., Alzari, P. M., Bertoglio, J. "Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions." *Immunology Today* 17(1996): 481-486.
- Thijs, L. G., de Boer, J. P., de Groot, M. C., Hack, C. E. "Coagulation disorders in septic shock." *Intensive Care Med* 19 Suppl 1(1993): S8-15.
- Thijs, L. G., Hack, C. E. "Time course of cytokine levels in sepsis." *Intensive Care Med* 21 Suppl 2(1995): S258-63.
- Uematsu, S., Akira, S. "Toll-like receptors and innate immunity." *J Mol Med*. 84(2006): 712-25.
- van der Poll, T. "Immunotherapy of sepsis." *Crit Care Med* 29(2001): 165.
- van Deventer, S. J., Buller, H. R., ten Cate, J. W., Aarden, L. A., Hack, C. E., Sturk, A. "Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways." *Blood* 76(1990): 2520-6.
- Wang, H., Yang, H., Czura, C. J., Sama, A. E., Tracey, K. J. "HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation." *Am J Respir Crit Care Med* 164(2001): 1768-73.
- Watanabe, H., Kubo, M., Numata, K., Takagi, K., Mizuta, H., Okada, S., Ito, T., Matsukawa, A. "Overexpression of Suppressor of Cytokine Signaling-5 in T Cells Augments Innate Immunity during Septic Peritonitis." *J Immunol* 177(2006): 8650-8657.
- Weber, G. F., Schlautkotter, S., Kaiser-Moore, S., Altmayr, F., Holzmann, B., Weighardt, H. "Inhibition of Interleukin-22 Attenuates Bacterial Load and Organ Failure during Acute Polymicrobial Sepsis." *Infect. Immun.* 75(2007): 1690-1697.
- Weighardt, H., Heidecke, C. D., Emmanuilidis, K., Maier, S., Bartels, H., Siewert, J. R., Holzmann, B. "Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon- $\gamma$ -resistant defects of monocyte cytokine production." *Surgery* 127(2000): 309.
- Zantl, N., Uebe, A., Neumann, B., Wagner, H., Siewert, J. R., Holzmann, B., Heidecke, C. D., Pfeffer, K. "Essential role of  $\gamma$ -interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis." *Infect. Immun.* 66(1998): 2300.

## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungen:

---

1. Pathogenese der Sepsis (modifiziert nach Kox et al. 2000)
2. Wesentliche Beziehungen zwischen TLRs, Adapter-Proteinen, sowie verknüpfte Kinasen und deren Signaling Effekte (Beutler et al. 2004)
3. V(D)J-Rekombination (modifiziert nach G. M. Cooper 2000)
4. Überlebenskurve nach Kaplan-Meier - RAG1<sup>-/-</sup> vs. WT im CASP-Modell.
5. FACS Analyse - Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 18h nach Peritonitisinduktion auf CD3<sup>+</sup>-T-Zellen
6. FACS Analyse - Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD80 und CD86 18h nach Peritonitisinduktion auf B220<sup>+</sup>-B-Zellen
7. FACS Analyse - Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD80 und CD86 18h nach Peritonitisinduktion auf CD11c<sup>+</sup>-DC
8. Differenzierung der CD11b<sup>+</sup> Zell-Subpopulationen in der Durchflusszytometrie
9. FACS Analyse - Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD80 und CD86 18h nach Peritonitisinduktion auf CD11b<sup>+</sup> "low" Zellen
10. FACS Analyse - Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD80 und CD86 18h nach Peritonitisinduktion auf CD11b<sup>+</sup> "high" Zellen
11. Spiegel der Zytokine TNF, IL-12, IL-6 und IFN-g von *ex vivo* WT-B-Zellen nach 12h Stimulation mit TLR-Liganden
12. Spiegel der Zytokine TNF, IL-12, IL-6 und IFN-g von *ex vivo* MyD88<sup>-/-</sup>-B-Zellen nach 12h Stimulation mit TLR-Liganden
13. Systemischer Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10 und CXCL1 im Serum 12h nach Peritonitisinduktion
14. Lokale Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10 und CXCL1 in der Leber 12h nach Peritonitisinduktion
15. Lokale Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10 und CXCL1 in der Lunge 12h nach Peritonitisinduktion
16. Lokale Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10 und CXCL1 in der Milz 12h nach Peritonitisinduktion
17. Lokale Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10 und CXCL1 in der Niere 12h nach Peritonitisinduktion
18. Lokale Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10 und CXCL1 in der Peritonealflüssigkeit 12h nach Peritonitisinduktion
19. Rekonstitutionsnachweis im FACS
20. Überlebenskurve nach Kaplan-Meier - mit 1,5x 10<sup>7</sup> B-Zellen rekonstituierte RAG1<sup>-/-</sup> Mäuse vs. naive Tiere.
21. Systemische Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10, MCP-1 und KC im Serum 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. Vorbehandlung 72h vor CASP mit 1,5x10<sup>7</sup> B-Zellen. Kontrollgruppe nur CASP.
22. Lokaler Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10, MCP-1 und KC in der Leber 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. Vorbehandlung 72h vor CASP mit 1,5x10<sup>7</sup> B-Zellen. Kontrollgruppe nur CASP.
23. Lokaler Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10, MCP-1 und KC in der Lunge 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. Vorbehandlung 72h vor CASP mit 1,5x10<sup>7</sup> B-Zellen. Kontrollgruppe nur CASP.
24. Lokaler Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10, MCP-1 und KC in der Milz 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. Vorbehandlung 72h vor CASP mit 1,5x10<sup>7</sup> B-Zellen. Kontrollgruppe nur CASP.

25. Lokaler Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10, MCP-1 und KC in der Niere 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. Vorbehandlung 72h vor CASP mit 1,5x10<sup>7</sup> B-Zellen. Kontrollgruppe nur CASP.
26. Lokaler Spiegel der Zyto-und Chemokine TNF, IL-12, IL-10, MCP-1 und KC in der PL 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. Vorbehandlung 72h vor CASP mit 1,5x10<sup>7</sup> B-Zellen. Kontrollgruppe nur CASP.
27. Bakterienlast der Peritoneallavage 12h nach Peritonitisinduktion bei RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen 20h auf Blutagar inkubiert.

## 8.2 Tabellen:

---

1. Toll-Like Rezeptoren und ihre Liganden (modifiziert nach Akira et al. 2004)
2. Chemikalien
3. Filter, Filme, Gefäße, Sonstiges
4. Reagenziensammlung („Kits“)
5. Geräte
6. Tiere
7. Zelllinien
8. Antikörper (primär/sekundär)
9. *In-vitro* Stimulation Milzzellen
10. Tab. 10 B-Zell-Aufreinigung

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Entstehung dieser Arbeit geholfen haben.

In erster Linie möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. B. Holzmann bedanken der mir diese Arbeit ermöglicht, sie kontrolliert und korrigiert hat, und dank dem ich Teil seiner Klinischen Forschergruppe „Sepsis“ werden durfte.

Des Weiteren darf ich mich bei Frau PD. Dr. Heike Weighardt bedanken. Als Betreuerin dieser Arbeit hat Sie grandiose Arbeit geleistet, viele Ideen stammen aus ihrer Feder und ihre schier unendliche Geduld und ihr Wille zur Wissensvermittlung haben maßgeblich zur Erstellung der Arbeit beigetragen. Vielen, vielen Dank für deine super Betreuung Heike!!!

Wichtiger Bestandteil dieser Arbeit sind die Tierexperimente, die CASP-Operationen wurden von Simone Kaiser-Moore und Gabriela Jusek durchgeführt – nochmals tausend Dank, in diesem Zuge möchte ich mich auch noch bei Felicitas Altmayr und Sylvia Schlaukötter bedanken, die mir ebenfalls eine Menge Arbeit abgenommen und Labortechniken beigebracht haben.

Dies gilt im Übrigen auch für die übrige Arbeitsgruppe, die bei vielen Fragen gute Ratschläge erteilen konnten und alle Zusammen für ein überaus angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben.

Vielen Dank auch an meine Eltern, ohne das ständige und beharrliche Drängen meines Vaters wäre die Arbeit mit Sicherheit nicht so im gleichen Zeitraum entstanden und ohne den Rückhalt meiner Mutter wäre mir das ein oder andere mal während dem Studium die Decke auf den Kopf gefallen.

Zu guter Letzt auch tausend Dank an meine liebe Freundin, die stets dafür sorgte, dass das Leben nicht nur aus Medizin und Mäusen bestand.

## 10. Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

---

Name:	Kay Markus Westenfelder
Anschrift:	Kirchenstr. 74, 81675 München
Geburtsdatum:	23.06.1978
Geburtsort:	Freiburg im Breisgau

### **Ausbildung:**

---

1989 - 1999	Gymnasium am Moltkeplatz in Krefeld
1999 - 2000	Zivildienst beim DRK-Münster und Ausbildung zum Rettungssanitäter in Koblenz
10/2000 - 02/2001	Studium Bioinformatik LMU München
03/2001 - 11/2007	Studium Medizin TU München (Vorklinik LMU)
11/ 2007	Staatsexamen Medizin
Seit 01/2008	Ausbildung zum Facharzt Urologie, Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar

### **Praktika:**

---

07/2002 - 09/2002	Laborpraktikum Nephrologie, University of Utah, Salt Lake City, USA,
08/2003 - 09/2003	Famulatur Handchirurgie, Klinikum Rechts der Isar, München
08/2004 - 09/2004	Famulatur HNO Praxis, Marktoberdorf
08/2005 - 09/2005	Famulatur Urologie, Krankenhaus Maria Hilf, Krefeld
03/2005 - 04/2005	Famulatur Chirurgie, C.H. Baragwanath Hospital, Johannesburg, Südafrika
02/2006 - 06/2006	PJ Gynäkologie, Klinikum Rechts der Isar, TU München
06/2006 - 08/2006	PJ Kardiologie, East General Hospital, University of Toronto, Kanada
08/2006 - 10/2006	PJ Gastroenterologie, Klinikum Rechts der Isar, TU München
10/2006 - 11/2006	PJ Chirurgie, King Edwards VIII Hospital, University of KwaZuluNatal Durban, Südafrika
11/2006 - 01/2007	PJ Chirurgie, C.H. Baragwanath Hospital, University of Witwatersrand Johannesburg, Südafrika

### **Dissertation:**

---

„Rolle von Zellen des adaptiven Immunsystems zur Immunpathologie der polymikrobiellen Sepsis“

Doktorvater: Univ.- Prof. Dr. med. B. Holzmann, Klinische Forschergruppe Chirurgie, Klinikum Rechts der Isar

### **Sprachen:**

---

Deutsch, Englisch, Französisch