

Aus der Medizinischen Klinik III  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. P. Zabel

---

**Die Rolle des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus bei  
systemischen Pneumokokkeninfektionen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der medizinischen Fakultät -**

vorgelegt von  
Hamed Esnaashari  
aus Teheran (Iran)

Lübeck 2008

1. Berichtstatter: Priv. Doz. Dr. med. Bernhard Schaaf

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Peter Kujath

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.11.2008

meiner Mutter

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	4
2	Abkürzungsverzeichnis (englisch, deutsch).....	6
3	Einleitung und Fragestellung .....	8
3.1	Streptococcus pneumoniae .....	8
3.1.1	Ätiologie, Pathogenese und Pathophysiologie der Pneumokokkeninfektionen .....	8
3.1.2	Pneumokokkeninfektion .....	10
3.2	Angeborene Infektabwehr .....	12
3.3	Pro- und Antiinflammation.....	12
3.4	Tumornekrosefaktor alpha.....	14
3.4.1	Die Entdeckung des Tumornekrosefaktors alpha.....	14
3.4.2	Rolle des Tumornekrosefaktors alpha im Immunsystem .....	14
3.4.3	Produktion und Signaltransduktion.....	17
3.4.4	Genomische Organisation und Polymorphismus .....	18
3.5	Fragestellung .....	20
4	Material und Methoden.....	21
4.1	Materialien.....	21
4.1.1	Vollblut-Assay und ELISA-Messung .....	21
4.1.2	TNF $\alpha$ -Polymerasekettenreaktion .....	21
4.2	Methoden.....	22
4.2.1	Studienkollektiv .....	22
4.2.2	Kontrollkollektiv .....	23
4.2.3	Erfassung klinischer Parameter.....	23
4.2.4	Ethik.....	27
4.2.5	Blutentnahme .....	27
4.2.6	Vollblut-Assay .....	27
4.2.7	Polymerasekettenreaktion .....	28
4.2.8	PCR zur Identifizierung des TNF $\alpha$ -308-Promotor-polymorphismus .....	29

4.2.9	Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	31
4.3	Statistische Auswertung.....	31
5	Ergebnisse .....	33
5.1	Demographische Daten.....	33
5.1.1	Patienten.....	33
5.1.2	Kontrollen .....	33
5.2	Klinische Daten .....	33
5.2.1	Klinische Manifestation der Pneumokokkeninfektion und Pneumokokkennachweis.....	33
5.2.2	Einteilung des Schweregrads der Erkrankung.....	34
5.2.3	Risikofaktoren.....	36
5.2.4	Komplikationen und Letalitätsrate .....	37
5.3	Genotyp- und Allelhäufigkeiten .....	38
5.3.1	Genotyphäufigkeiten der Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe.....	38
5.3.2	Einfluss des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus auf den Schweregrad der Sepsis.....	39
5.3.3	Einfluss des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus auf den klinischen Verlauf .....	40
5.4	In-vitro Zytokinproduktion: TNF $\alpha$ “high” und “low secretor”.....	41
5.4.1	TNF $\alpha$ -Phänotyp bei Kontrollen und Patienten.....	42
5.4.2	TNF $\alpha$ -Phänotyp bei schwerer Sepsis .....	43
5.4.3	TNF $\alpha$ -Phänotyp in Abhängigkeit vom TNF $\alpha$ -308-Promotor-Polymorphismus .....	44
6	Diskussion.....	46
7	Zusammenfassung.....	54
8	Literaturverzeichnis.....	55
9	Danksagung.....	71
10	Lebenslauf .....	72

## 2 Abkürzungsverzeichnis (englisch, deutsch)

AM	<i>Alveolar Macrophage</i> , Alveolaramakrophagen
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i> , akutes progressives Lungenversagen
APACHE	<i>Acute Physiology And Chronic Health Evaluation</i>
APS	<i>Acute Physiology Score</i>
BAL	<i>Bronchoalveolar lavage</i> , Bronchoalveoläre Lavage
BK	<i>Blood culture</i> , Blutkultur
CARS	<i>Compensatory anti-inflammatory response syndrome</i> , kompensatorisches antiinflammatorisches Response-Syndrom
Cbp A	<i>Choline Binding Protein A</i> , Cholinbindendes Protein A
dNTP	<i>desoxy nucleoside triphosphate</i> , desoxy-Nukleotidtriphosphate
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EIA ( <i>ELISA</i> )	<i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i> , Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
IFN $\gamma$	<i>Gamma interferon</i> , Gamma-Interferon
IL-1	<i>Interleukin-1</i> , Interleukin-1
Kb	<i>Kilobase</i> , Kilobase
kDa	<i>kilodalton</i> , Kilodalton
LD	<i>Linkage disequilibrium</i> , Kopplungsgleichgewicht
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i> , Lipopolysaccharid
LTA	<i>Lipoteichoid acid</i> , Lipoteichonsäure
LK	<i>Liquor culture</i> , Liquorkultur
memTNF	<i>transmembrane TNF</i> , membrangebundenes TNF
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor-kappa B</i> , Nukleärer Faktor Kappa-B
NO	<i>Endothelium-Derived-Factor</i> , Stickstoffmonoxid
PAF	<i>Platlet-activating factor</i> , Plättchenaktivierender Faktor

PMN	<i>polymorphonuclear leukocytes</i> , polymorphonukleäre Granulozyten
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i> , systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i> , Einzelbasenpolymorphismus
sTNF	<i>soluble TNF</i> , lösliches TNF
TACE	<i>TNF-converting-enzyme</i> , TNF-Konvertase
TLRs	<i>Toll-like receptors</i> , Toll-like-Rezeptoren
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> , Tumornekrosefaktor
TNFR	<i>Tumor Necrosis Factor receptor</i> , Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNF $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> , Tumornekrosefaktor alpha

## 3 Einleitung und Fragestellung

### 3.1 *Streptococcus pneumoniae*

#### 3.1.1 Ätiologie, Pathogenese und Pathophysiologie der Pneumokokkeninfektionen

Pneumokokken (*Streptococcus pneumoniae*) sind etwa 1 – 3 µm lange, grampositive, fakultativ aerobe Diplokokken. Sie gehören zu den  $\alpha$ -hämolyisierenden (vergrünenden) Streptokokken. Einzig die bekapselten Pneumokokken sind humanpathogenen, da sie die zelluläre Immunantwort der Phagozytose hemmen (Watson und Musher 1999). Sie werden anhand des unterschiedlichen Aufbaus ihrer Kapselpolysaccharide in 90 Serovaren unterteilt. Die Polysaccharidkapsel stellt den wichtigsten Virulenzfaktor dar, da sie die Phagozytose verhindert. Dabei ist sie in ihrem Aufbau äußerst heterogen. Es sind mehr als 90 Serotypen beschrieben (Bruyn und Zegers 1992).

Die Übertragung erfolgt aerogen. Die Pneumokokken besiedeln die nasopharyngeale Schleimhaut des oberen Respirationstraktes. Diese gilt als ihr natürliches Habitat. Eine asymptomatische Kolonisation ist bei bis zu 64% gesunder Erwachsener und Kinder beschrieben (Coles et al. 2001; Gray und Dillon, 1986). Der Grad der Kolonisation hängt vom Alter, geographischer Lage, genetischem Hintergrund und sozioökonomischen Bedingungen ab (Bogaert et al. 2001; El Ahmer et al. 1999). Dabei spielt die lokale Immunabwehr eine entscheidende Rolle. Bei schlechter Immunlage kann es zu persistierender oder rekurrenter Kolonisation mit konsekutiver Infektion kommen. Hingegen eliminiert eine rege und rasche Immunantwort den Keim und verhindert zugleich die Rekolonisation (Ghaffar et al. 1999). Vor diesem Hintergrund wird es verständlich, dass die meisten Pneumokokkeninfektionen endogenen Ursprungs sind.

Laut Literatur bestehen verschiedenste Risikofaktoren für die Entwicklung einer Pneumokokkeninfektion. Neben chronischen Erkrankungen wie beispielsweise COPD, Diabetes und Herzinsuffizienz prädisponieren angeborene und erworbene Immundefekte wie auch erhöhte Exposition die Entstehung von Pneumokokkeninfektionen. Diese sind detailliert in Tabelle 1 aufgeführt (Koivula et al. 1994; Lipsky et al. 1986; Marrie 2000).

---

## Prädisponierende Faktoren für die Entstehung von Pneumokokkeninfektionen

---

Alter < 2 oder > 65	Leberzirrhose
Männliches Geschlecht	Angeborene und erworbene Immundefekte
Rauchen	Hypo- oder Agammaglobulinämie
Alkoholismus	Komplementdefekte
Diabetes mellitus	Lymphome
Chronische Herz- und Lungenerkrankungen	Chronisch lymphatische Leukämie
Herzinsuffizienz	Immunsuppressive Therapie
COPD	Leukopenie
Nerulogische Erkrankungen	Funktionelle oder anatomische Asplenie
zerebrovaskuläre Erkrankungen	HIV-Infektion
Demenz	Erhöhte Exposition
Herabgesetzter Hustenreflex	Kindergarten
Niereninsuffizienz	Kasernen
	Obdachlose

---

**Tabelle 1:** In der Literatur angegebene prädisponierende Faktoren für die Entstehung von Pneumokokkeninfektionen

In vielen klinischen und experimentellen Studien wurde die Interaktion zwischen der Schleimhautflora des Nasopharynx und den Pneumokokken gezeigt. Beispielsweise hemmen  $\alpha$ -hämolisierende Streptokokken die Schleimhautkolonisation durch Pneumokokken (Ghaffar et al. 1999). Neben der kompetitiven Besiedlung sind auch koexistentielle Formen der Besiedlung beschrieben. So konnten Pericone und Mitarbeiter zeigen, dass Pneumokokken in Gegenwart von Meningokokken vermehrt wachsen (Pericone et al. 2000). Auch virale Produkte und die Immunantwort des Wirts auf die Viren fördern die Adhäsion und Invasion der *S. pneumoniae* (Tong et al. 2001). *Streptococcus pneumoniae* verfügt dazu neben der erwähnten Polysaccharidkapsel über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die die Kolonisation und Invasion des Wirts ermöglichen. In Tabelle 2 sind die wichtigsten Virulenzfaktoren mit einer kurzen Beschreibung ihrer Funktionsweise und Wirkung wiedergegeben.

<b>Virulenzfaktor</b>	<b>Mechanismus</b>	<b>Wirkung (Literatur)</b>
Adhäsion	Interaktion mit dem Disaccharid des epithelialen Zellrezeptors	Adhäsion (Feldman et al. 1992)
Cholinbindendes Protein (Cbp A)	Interaktion mit zytokin-aktivierten, humanen Zellen	Schleimhautkolonisation (Rosenow et al. 1997)
IgA-Protease	Veränderung der Oberflächenladung der Pneumokokken	Adhäsion (Weiser et al. 2003)
Pneumolysin	Epitheliolyse des Respirationstraktes / Komplementaktivierung	Schleimhautkolonisation (Mitchell und Andrew 1997; Mitchell 2000)
Wasserstoffperoxid	Induktion von Apoptose	Zytolyse (Bermpohl et al. 2005; Braun et al. 2001)
Penicillinbindendes Protein	Veränderte Affinität der Penicilline	Penicillinresistenz (Watson et al. 1995)

**Tabelle 2:** Virulenzfaktoren von Pneumokokken und ihre Funktionsweise

### 3.1.2 Pneumokokkeninfektion

Pneumokokken wurden erstmals 1881 als Krankheitserreger des Respirationssystems isoliert. Sie sind einer der wichtigsten humanpathogenen Keime und finden sich endemisch in der gesamten Welt. Seit mehr als einem Jahrhundert sind sie Hauptverursacher der akuten Sinusitis, Otitis media, der ambulant erworbenen Pneumonie und einer der häufigsten Erreger der bakteriellen Meningitis (Austrian 1981; Austrian 1999). Seltener werden sie als Erreger der Endokarditis, Peritonitis oder Phlegmone identifiziert. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts sterben in Deutschland mindestens 4000 - 8000 Menschen pro Jahr an invasiven Pneumokokken-Infektionen (Ley 2000).

*S. pneumoniae* verursacht etwa die Hälfte aller ambulant erworbenen Pneumonien (CAP) und ist somit der häufigste Erreger der CAP (Bartlett und Mundy, 1995). Das konnte in zahlreichen Studien mit sensitiven immunologischen Nachweismethoden (Pneumolysin-Antikörper bzw. Immunkomplexe) belegt werden (Kauppinen et al. 1995; Porath et al. 1997). Laut aktueller Veröffentlichungen gelingt der Pneumokokken-nachweis mit den herkömmlichen Methoden bei etwa 35% aller Patienten (Bauer 2006). Die Morbidität und Letalität invasiver Pneumokokkeninfektionen ist trotz Einführung moderner Antibiotikatherapie und intensivmedizinischer Maßnahmen nach wie vor weltweit hoch (Brandenburg et al., 2000; Kalin et al., 2000). Die Letalitätsrate der

unbehandelten Pneumokokkeninfektion wird in der Literatur mit über 30% angegeben (Austrian 1999). Nach Einführung antibiotischer Substanzen gelang es zwar zunächst, die Morbiditäts- und Letalitätsrate deutlich zu senken, sie stagniert allerdings seit mehr als 50 Jahren (Ewig und Torres 1999). Fine und Mitarbeiter fanden in einer Meta-Analyse zur ambulant erworbenen Pneumonie mit Pneumokokken eine Letalitätsrate von 6,4% (Fine et al., 1996).

Klinisch imponiert die Erkrankung durch ihr plötzliches Einsetzen. Sie ist begleitet von pleuritischen Thoraxschmerz, hohem Fieber und produktivem Husten (Heffron R. 2006). Die Symptomatik variiert sehr stark, wobei zum Teil die respiratorischen Symptome gänzlich fehlen können. Fieberfreiheit ist nicht unüblich, was als negatives prognostisches Zeichen zu werten ist (Marfin et al. 1995; Torres et al. 1998). Gerade bei älteren Patienten ist die Fieberlosigkeit häufig. Hier treten unspezifische Symptome wie Verwirrtheit in den Vordergrund (Metlay et al. 1997).

In einer Studie aus dem Jahre 1937, der präantibiotischen Ära, wurde bei über 1.500 Patienten mit Pneumokokkenpneumonie eine Gesamtkomplikationsrate von 12% festgestellt (Tilghman 1937). Die häufigsten Komplikationen sind dabei Pleuraempyeme und Bakteriämien. Derzeit wird angenommen, dass etwa 20 – 25% aller Pneumokokkenpneumonien mit einer Bakteriämie vergesellschaftet sind (Mufson 1981). Die Bakteriämie wird als ein prognostisch ungünstiges Zeichen gewertet. Es gilt als Indiz, dass der Körper nicht in der Lage ist, die Infektion auf den Primärherd begrenzen zu können. Die Letalitätsrate der Pneumokokkenbakteriämie liegt bei 20 – 30% (Marfin et al. 1995; Torres et al. 1998).

Eine bakterielle Meningitis im Sinne einer Komplikation der unbehandelten Pneumokokkenpneumonie tritt bei etwa 2% der Fälle auf (Tilghman 1937). *Streptococcus pneumoniae* ist der häufigste und aggressivste Erreger der bakteriellen Meningitis bei Erwachsenen (De Gans und van de Beek 2002; Koedel et al. 2002; Schuchat et al. 1997). Dabei ist die Letalität laut Literatur mit 28 - 34% höher als bei anderen Erregern. Zudem leiden mehr als die Hälfte aller Überlebenden an schwersten Folgekrankheiten mit Hirnödemen, Sinusvenenthrombose und ischämischen Infarkten (Kragstjerg et al. 1994).

### **3.2 Angeborene Infektabwehr**

Die pulmonale Infektabwehr setzt sich aus der erworbenen (spezifischen) und der angeborenen (unspezifischen) Immunabwehr zusammen. Letztere besitzt keine pathogene Spezifität und führt zu keinem immunologischen Gedächtnis. Sie wird aus mechanischen Faktoren, antimikrobiellen Peptiden und dem Phagozytensystem gebildet (Zhang et al. 2000). Der gesamte obere und untere Respirationstrakt ist mit Flimmerepithel ausgekleidet. Diese Schleimhautbarriere ist ein Hauptbestandteil der mechanischen Abwehr. Die mikrozilliäre Clearance trägt zusätzlich zur Keimelimination bei. Ferner können Zellen des oberen und unteren Respirationstraktes verschiedene antimikrobielle Substanzen bilden. Beispiele hierfür sind die Muramidase und Defensine. Diese Substanzen können zusätzlich eine proinflammatorische Antwort des Wirtes auslösen (Coonrod 1986; Hiratsuka et al. 1998).

Am Beginn des Phagozytensystems stehen die Alveolarmakrophagen (AM), welche intrazelluläre Bakterien – wie auch *Streptococcus pneumoniae* – töten können. Dadurch wird die immunologische und inflammatorische Antwort des Wirtes eingeleitet (Ozaki et al. 1989; Twigg et al. 1998). AM sind in der Lage, eine Vielzahl von polymorphonukleären Granulozyten (PMN) in die Alveolaren zu rekrutieren. PMN sind ebenfalls zur Phagozytose befähigt. Sowohl AM als auch PMN erkennen mittels ihrer Oberflächenproteine – den Toll-like-Rezeptoren (TLRs) – bakterielle Bestandteile und Toxine (Imler und Hoffmann 2001). Diese Rezeptoraktivierung induziert über „second messenger“-Systeme die Aktivierung und Produktion von Zytokinen. Sie sind Mediatoren der systemisch-entzündlichen Immunantwort und vermitteln mit Hilfe eines hochkomplexen Netzwerks je nach Anforderung eine pro- oder antiinflammatorische Entzündungsreaktion.

### **3.3 Pro- und Antiinflammation**

Zytokine sind in der Lage, andere proinflammatorische Zytokine zu produzieren. Dadurch wird die Entzündungskaskade weiter potenziert (Geiser 1999). Die proinflammatorische Entzündungsreaktion findet zunächst lokal und kompartimentiert statt. Dehoux und Mitarbeiter belegten, dass die Konzentration proinflammatorischer Zytokine in der bronchoalveolären Lavage (BAL) bei unilateraler Pneumonie in der

betroffenen Lunge statistisch signifikant höher ist (Dehoux et al. 1994). Diese selektierte Erhöhung proinflammatorischer Zytokine ist wichtig, damit eine bakterielle Clearance erreicht werden kann.

Proinflammatorische Zytokine sind jedoch auch in der Lage, antiinflammatorische Zytokine zu induzieren und eine kompensatorische, antiinflammatorische Reaktion im Sinne eines „Auto-Feedbacks“ zu initiieren. Die Balance zwischen der pro- und antiinflammatorischen Entzündungskaskade bestimmt im Wesentlichen den Verlauf der Entzündungsreaktion und ist für den klinischen Verlauf der Erkrankung substantiell. Goodman und Mitarbeiter zeigten durch den Vergleich der BAL zwischen gesunden Probanden und Patienten, die an einem akuten, progressiven Lungenversagen (ARDS) erkrankt waren auf, dass bei ARDS-Patienten ein deutliches Missverhältnis zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen vorliegt. Dieses Ungleichgewicht zugunsten proinflammatorischer Zytokine war bei ARDS-Patienten um das Zehnfache erhöht. (Goodman et al. 1996). Eine andere Studie belegt, dass die Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine, von Patienten, die an ARDS verstarben, im Vergleich zu den Überlebenden signifikant höher waren (Meduri et al. 1995). Daher muss angenommen werden, dass überschießende, ungehemmte Immunreaktionen das Gewebe nachhaltig schädigen. Man vermutet, dass bei ARDS-Patienten eine Schädigung des Kapillarendothels wie auch des Alveolarepithels mit konsekutivem Verlust der Alveolarschranke vorliegt (Matthay 1994).

Das Zusammenspiel der pro- und antiinflammatorischen Komponenten beobachtet man nicht nur bei lokalen Entzündungsgeschehen. Auch bei der systemischen Immunreaktion findet initial eine signifikante proinflammatorische Reaktion statt, woran ebenfalls Zytokine maßgeblich beteiligt sind. Diese wird mit „systemic inflammatory response syndrom (SIRS)“ beschrieben. Es folgt die kompensatorische, antiinflammatorische Reaktion mit einem autokrinen „Feedback“, wodurch der Organismus versucht, sich vor schädlichen Effekten der Inflammation zu schützen. An dieser so genannten „Compensatory Antiinflammatory Response Syndrom“ (CARS) sind Zytokine wie beispielsweise IL10, IL4 oder TGF beta beteiligt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine übermäßige proinflammatorische Antwort zum systemischen „overspill“ der Zytokine und damit sekundär zur Organschädigung führt (Bone et al. 1997). Andererseits stört eine zu starke

antiinflammatorische oder unzureichende proinflammatorische Antwort die bakterielle Clearance, was in einer ungehinderten Infektionsausbereitung mit konsekutiv septischem Schock endet (Waterer und Wunderink 2005). Wann immer das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Mechanismen verloren geht, ist die Gefahr der Entstehung schwerer septischer Krankheitsbilder mit letalem Ausgang wahrscheinlich. Diese Interaktion der pro- und antiinflammatorischen Antwort wird in vielfältiger Art und Weise beeinflusst. Nicht zuletzt sind die Erreger aber auch interindividuelle Unterschiede in der Immunantwort des Wirts dafür verantwortlich (Bone 1996; Bone et al. 1997).

### **3.4 Tumornekrosefaktor alpha**

#### **3.4.1 Die Entdeckung des Tumornekrosefaktors alpha**

Die Erstbeschreibung des Tumornekrosefaktors alpha (TNF $\alpha$ ) geht auf das Jahr 1893 zurück. Der Chirurg William Coley beobachtete eine Reduktion von Tumormassen bei Patienten, die an bakteriellen Infektionen erkrankten (Coley 1893). Im Jahre 1975 konnte Carswell TNF erstmalig als einen „Serumfaktor“ isolieren und beobachtete im Tierexperiment die Nekrose transplantiert Tumoren (Carswell et al. 1975). Zu Beginn des nächsten Jahrzehnts identifizierten Kawakami und Cerami ein Molekül, das ursächlich für die Kachexie war. Dieses Molekül wurde entsprechend seiner Wirkung „Kachexin“ genannt. Im Jahre 1985 konnte Beutler nach Analyse der Aminosäuresequenz belegen, dass es sich um ein identisches Molekül handelt (Beutler et al. 1985).

#### **3.4.2 Rolle des Tumornekrosefaktors alpha im Immunsystem**

TNF $\alpha$  ist ein Polypeptid und gehört zu der Familie der Zytokine mit außergewöhnlichem, bioaktivem Einfluss, da fast alle Zellen des Körpers für TNF $\alpha$  empfindlich sind (Wajant et al. 2003). Er ist in der Lage das Immunsystem zu modulieren und damit das Ausmaß entzündlicher Prozesse entscheidend zu regulieren. Je nach Anforderung ist TNF $\alpha$  aber auch in der Lage, Proliferation und Differenzierung von Zellen zu fördern oder den programmierten Zelltod herbeizuführen (MacEwan

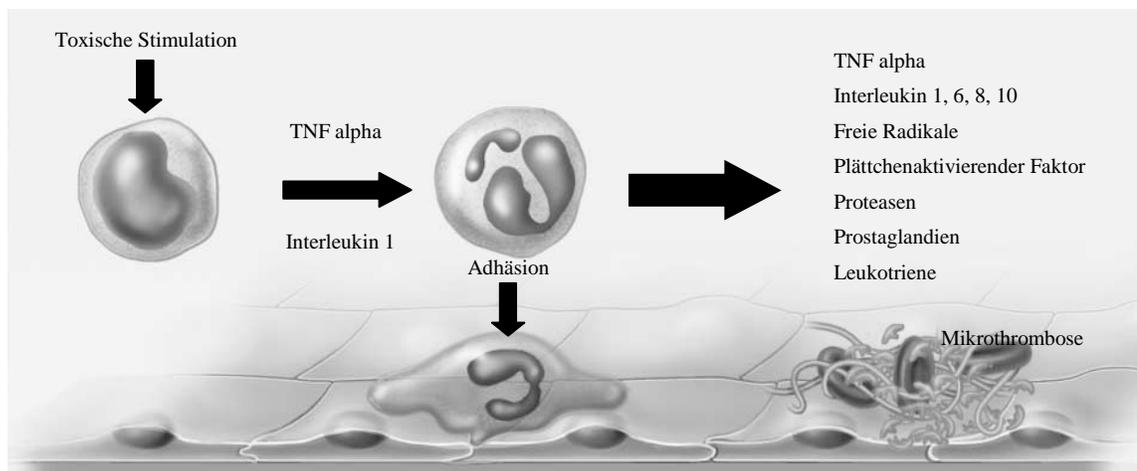
2002; Wyllie 1997). Basierend auf diesen drei Hauptmechanismen entwickelt TNF $\alpha$  seine pluripotente systemische Wirkung und reguliert so beispielsweise den Fettstoffwechsel über die Lipoproteinlipase (Price et al. 1986) oder erhöht die Freisetzung von Glukokortikoiden (Hermann et al. 1998). Auch kann er gemeinsam mit Interleukin(IL)-1 im hinteren Hypothalamus eine Sollwertänderung der Körpertemperatur bewirken (Long et al. 1992).

Seine zentrale immunmodulatorische Wirkung lässt sich anhand der Koch-Dale-Kriterien ableiten. Diese besagen (King 1957),

- dass der Mediator bei Krankheit nachweisbar sein muss.
- dass die Krankheitssymptome nach exogener Gabe des Mediators ausgelöst werden.
- dass nach Blockade des Mediators die Symptome verhindert oder abgeschwächt werden.

Alle oben genannten Kriterien werden, wie mehrere Studien belegten, durch TNF $\alpha$  erfüllt (Beutler et al. 1985; Stephens et al. 1988; Waage et al. 1987). Daher kann auf eine kausale Beteiligung des TNF $\alpha$  bei der SIRS und der Sepsis geschlossen werden (Neugebauer et al. 1995).

Die SIRS beginnt mit der Freisetzung eines Stimulus bzw. eines Antigens. Makrophagen und Monozyten schütten nach Phagozytose des Stimulus TNF $\alpha$  aus. Dieser initiiert die proinflammatorische Entzündungsreaktion. TNF $\alpha$  löst zusammen mit IL-1 die sekundäre Zytokinkaskade aus. Diese beiden Zytokine wirken weitestgehend synergetisch und initiieren die Produktion weiterer, proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren wie IL6, IL8, Gamma-Interferon (IFN  $\gamma$ ) und Plättchenaktivierender Faktor (PAF). Dadurch wird die Freisetzung von TNF $\alpha$  ebenfalls getriggert (Bone 1991). Ferner aktiviert TNF $\alpha$  auf klassischem Weg das Komplement- und Gerinnungssystem (Neugebauer et al. 1995). Wie oben bereits erwähnt, werden gleichzeitig antiinflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-10 induziert (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Nach initialem Stimulus, wie beispielsweise Endotoxin, wird die Stimulation der zentralen proinflammatorischen Zytokine getriggert. TNF $\alpha$  und IL-1 induzieren die Adhäsion und Migration der neutrophilen Granulozyten. Gleichzeitig wird die Produktion anderer proinflammatorischer, aber auch antiinflammatorischer Zytokine induziert (adaptiert nach Wheeler und Bernard 1999).

TNF $\alpha$  ist im Rahmen der Entzündungsreaktion bakterieller Infektionen ebenfalls ein entscheidender, proinflammatorischer Mediator. Dieser ist für die lokale bakterielle Clearance maßgeblich. Rothe et al. fanden deutlich höhere Infektanfälligkeit nach Keimexposition bei sog. TNF $\alpha$ -Knockout-Mäusen (Rothe et al. 1993). Andere Studien zeigten im Tiermodell, dass eine Unterdrückung der TNF $\alpha$ -Immunantwort bei Pneumonie zu einer höheren Keimkonzentration in der Lunge und im Blut führt und mit signifikant höherer Mortalität vergesellschaftet ist (van der Poll et al. 1996). Auf der anderen Seite führt die systemische Freisetzung von TNF $\alpha$  zum septischen Schock. Eines der Hauptwirkungsorte des TNF $\alpha$  und der von ihm initiierten Entzündungsreaktion ist das Endothel. Endothelzellen setzen Prostaglandine und Stickstoffmonoxid (NO) frei, was zu Vasodilatation und verbesserter Adhäsion und Einwanderung der neutrophilen Granulozyten führt (Utsumi et al. 1990). Die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten kann auch direkt durch TNF $\alpha$  aktiviert werden. Diese schädigen das Endothel durch Degranulation und Bildung freier Sauerstoffradikale (Jacobs und Tabor 1989). Sie erhöhen ebenfalls die Gefäßpermeabilität, wodurch Blutplasma austritt. Im nächsten Schritt kommt es zur Hypovolämie, Thrombozytenaggregation und Aktivierung des Gerinnungssystems mit Störung der Mikrozirkulation. Klinisch imponieren Hypotonie mit Organminderperfusion, was konsekutiv zu Organdysfunktion und Organversagen führt (Bone et al. 1997).

### 3.4.3 Produktion und Signaltransduktion

TNF $\alpha$  wird als Transmembranprotein synthetisiert. Die Vorstufe hat ein Molekulargewicht von 25 Kilodalton (kDa). Durch die so genannte „TNF-Convertase“ (TACE), einer membrangebundenen Metalloprotease, wird es in seine biologisch aktive Form mit einem Molekulargewicht von 51 kDa gespalten (Aggarwal et al. 1985; Black et al. 1997). Er wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen produziert. Bei entsprechender Stimulation sind aber auch andere Zellen wie B- und T-Lymphozyten, Endothelzellen, natürliche Killer-Zellen und Fibroblasten in der Lage, TNF $\alpha$  freizusetzen (Idriss und Naismith 2000; Wajant et al. 2003). Eine Vielzahl von Stimuli kann die TNF $\alpha$ -Produktion initiieren. Neben LPS und Viren sind Interferone und Interleukine sowie freie Sauerstoffradikale als TNF $\alpha$ -Induktoren bekannt (Spriggs et al. 1992). Nach LPS-Exposition wird die höchste TNF $\alpha$ -Konzentration nach etwa 90 Minuten gemessen. Diese fällt rasch wieder ab und ist nach etwa 4 Stunden nicht mehr nachweisbar (Michie et al. 1988).

Die biologische Aktivität von TNF $\alpha$  wird vornehmlich durch IL-10 begrenzt. Auch andere Faktoren wie Cortisol, TGF- $\beta$  und interstitiell vorliegende TNF $\alpha$ -Rezeptoren können die TNF $\alpha$ -Wirkung limitieren (Platzer et al. 1995; Randow et al. 1995; Zabel et al. 1989).

TNF $\alpha$  vermittelt seine biologische Aktivität über zwei transmembranöse TNF-Rezeptoren (TNFR) (Brockhaus et al. 1990; Stauber et al. 1988). Während TNFR1 auf fast allen Körperzellen exprimiert wird, findet sich TNFR2 auf der Oberfläche von Endothelzellen und Zellen des Immunsystems (Aggarwal 2003). TNFR1 besitzt eine hohe Affinität für lösliches TNF $\alpha$  (sTNF). Hingegen ist membrangebundenes TNF $\alpha$  (memTNF) der physiologische Ligand für TNFR2 (Grell et al. 1995). Daher wird angenommen, dass die Signalinduktion durch TNF $\alpha$  zwischen Immunzellen hauptsächlich durch direkten Zellkontakt entsteht (MacEwan 2002). Ein weiterer Hauptunterschied besteht darin, dass TNFR1 über eine so genannte Todesdomäne verfügt, worüber die Apoptosekaskade aktiviert werden kann. Ferner kann TNF $\alpha$  über TNFR1 Proliferation, Differenzierung und die Entzündungsreaktion der Zelle modulieren. Die Entzündungsmodulation wird über den Transkriptionsfaktor (NF- $\kappa$ B) vermittelt. Die Signalweiterleitung ist bei beiden Rezeptoren identisch.

TNFR2 besitzt eine zeitlich stark begrenzte Bindungseigenschaft zu TNF $\alpha$  bei zusätzlich signifikant größerer Schwankungsbreite der Assoziationskinetik im Vergleich zu TNFR1. Beispielsweise ist die Affinität bei niedriger TNF $\alpha$ -Konzentration deutlich erhöht. Durch diese charakteristischen Merkmale kann TNFR2 die Konzentration an sTNF innerhalb kurzer Zeit deutlich an der Zielzelle erhöhen und somit die Sensitivität von TNFR1 für seinen Liganden verbessern (Tartaglia et al. 1993). Ferner kann TNFR2 mittels Proteolyse von der Zelloberfläche abgespalten werden, an TNF $\alpha$  binden und dessen Wirkung neutralisieren. TACE kann die Abspaltung des TNFR2 induzieren, sodass dieses Enzym Einfluss auf die biologische Verfügbarkeit des TNF $\alpha$  ausübt. Darüber hinaus ist es TNF $\alpha$  möglich, über seine beiden Rezeptoren seine weitere Produktion und Freisetzung zu hemmen (Porteu und Hieblot 1994).

Durch Stimulation der TNF-Rezeptoren wird die Inhibition des nukleären Faktor Kappa-B (NF- $\kappa$ B), ein spezifischer Transkriptionsfaktor, aufgehoben (Tartaglia et al. 1993a). Dadurch gelangt NF- $\kappa$ B in den Zellkern und bindet spezifisch an seine Bindungsstelle ( $\kappa$ 3) am TNF $\alpha$ -Promotor (Papavassiliou 1995), was zur Produktion des TNF $\alpha$  führt. Über NF- $\kappa$ B wird hauptsächlich die intrazelluläre Entzündungsreaktion moduliert. Hingegen wird über die so genannte Caspaden-Kaskade die intrazelluläre Apoptose vermittelt. Dieser direkte Weg ist nur über den TNFR1 möglich, da die Signaltransduktion über die Todesdomäne stattfindet (Tsukumo und Yonehara 1999).

#### **3.4.4 Genomische Organisation und Polymorphismus**

Sorensen et al. haben schon 1988 in einer epidemiologischen Studie an 960 Familien mit Adoptivkindern eine starke genetische Prädisposition für Infektionskrankheiten nachgewiesen. Das relative Risiko, im Alter zwischen 16 und 58 Jahren an einer Infektion zu versterben, war 5,8 fach erhöht bei Kindern, die ein Elternteil im Alter unter 50 Jahren an einer Infektion verloren haben (Sorensen et al. 1988).

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass es eine genetische Prädisposition für eine starke oder schwache Zytokinantwort nach Zellstimulation, den „high“- und „low secretor“-Phänotyp, gibt. Diese genetische Komponente wird für den TNF $\alpha$ -Phänotyp auf 60% geschätzt (Westendorp et al. 1997). Der individuelle Zytokin-Phänotyp wird durch spezifische einzelne Nucleotid-Polymorphismen (Single nucleotide

polymorphisms, SNPs) in den Rezeptoren und Mediatoren des angeborenen Immunsystems beeinflusst. Verschiedene SNPs in dem TNF-Gen wurden beschrieben. Insbesondere wurden die biallelischen Polymorphismen im TNF $\alpha$ -308-Promotor und dem Lymphotoxin (LT)- $\alpha$ -Gen (ehemals TNF $\beta$ -Intron-1) mit der TNF $\alpha$ -Induzierbarkeit assoziiert (Stuber et al. 1996).

Das Gen für TNF $\alpha$  befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 6, ist etwa 3 Kilobasen (kb) lang und besitzt vier Exons, wobei 80% der Proteinsequenz durch das vierte Exon kodiert werden (Nedwin et al. 1985). Die kodierende Sequenz befindet sich zwischen den MHC Klasse I und II Loci. Nachdem bereits Spies 1986 nachgewiesen hatte, dass das TNF $\alpha$ -Gen mit den MHC-Klassen gekoppelt ist, wurde ein Jahr später nachgewiesen, dass 850 kb Zentromer die MHC Klasse II und 250 Basen Telomer die MHC Klasse I lokalisiert ist (Spies et al. 1986; Carroll et al. 1987). Für das Gen im TNF $\alpha$ -Locus ist ein biallelischer SNP an Positionen -308 relativ vom Transkriptionsstart beschrieben. Hierbei handelt es sich jeweils um eine Transition der Purinbasen von Guanin zu Adenin (D'Alfonso und Richiardi 1994; Wilson et al. 1997). Weitere Polymorphismen sind an Positionen -1031, -857, -851, -419, -376, -238, -163 sowie bei +691 beschrieben (Hajeer und Hutchinson 2000; Herrmann et al. 1998).

An der Position -308 befindet sich die Promotorregion des TNF $\alpha$  Gens. Die Base Guanin ist als TNF1-Allel und die Base Adenin als das TNF2-Allel definiert. Für TNF-A homozygote Individuen konnte eine höhere Konzentration von frei zirkulierendem TNF $\alpha$  nachgewiesen werden (Bouma et al. 1996). Diese Beobachtung wurde ebenfalls für heterozygote Träger des TNF2-Allels nach Vollblutstimulation mit LPS gezeigt (Louis et al. 1998). Ferner konnten mehrere Arbeitsgruppen für das TNF-A-Allel eine vielfach höhere Transkriptionsrate nachweisen (Braun et al. 1996; Kroeger et al. 1997; Wilson et al. 1997). Andere Arbeitsgruppe konnten jedoch keine der oben genannten Ergebnisse reproduzieren (He et al. 1995; Huizinga et al. 1997; Turner et al. 1995).

In wieweit diese genetische Prädisposition für eine starke oder schwache Zytokinantwort und somit für das "Outcome" infektiöser Erkrankungen eine Rolle spielt, wird kontrovers diskutiert. Mira und Kollegen deklarierten nach einer Multi-Center-Studie, dass das TNF-A-Allel mit dem Auftreten schwerer Sepsis und erhöhter Letalität assoziiert ist (Mira et al. 1999). Tang allerdings konnte dieses Ergebnis in seiner Studienpopulation nicht bestätigen (Tang et al. 2000).

### **3.5 Fragestellung**

Ziel dieser Studie war es, bei Patienten mit invasiver Pneumokokkeninfektion, den Einfluss einer genetisch bedingten, gesteigerten TNF $\alpha$ -Induzierbarkeit auf den klinischen Verlauf zu untersuchen.

1. Prädisponiert der TNF $\alpha$  Genotyp A für eine erhöhte Inzidenz von Pneumokokken-Infektionen?
2. Ist der TNF $\alpha$  Genotyp A mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert?
3. Haben Patienten mit einem TNF $\alpha$  Genotyp A einen TNF „high secretor“ Phänotyp?
4. Ist der TNF $\alpha$  „high secretor“ Phänotyp mit der Schwere der Pneumokokkensepsis assoziiert?

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Materialien**

#### **4.1.1 Vollblut-Assay und ELISA-Messung**

Zur Durchführung des Vollblut-Assays wurde das RPMI-Medium [500ml; Seromed Bioform] benutzt. Dem Medium wurden 5ml Penicillin / Streptomycin [10.000 IE / 10 mg/ml; Biochrom] sowie 5ml L-Glutamin [200mM; Biochrom] zugesetzt. Die Stimulation des Vollbluts wurde mit Liposaccharid (LPS) [E.Coli 25mg, Serotyp 026; B6; Sigma] nach Verdünnung mit 50ml Medium vorgenommen. Des Weiteren wurde Lipoteichonsäure (LTA) [Staph. Aureus 10mg; Sigma] nach Verdünnung mit 1ml Medium als Stimulans benutzt. Für die ELISA-Messungen wurden Immunoassay-Kits mit einer unteren Nachweisgrenze von 15,6 pg/ml [BioSource] verwendet.

Zur Blutentnahme wurden Lithium-Heparin-Monovetten [5ml, Sarstedt], Ethylendiamin-Tetraessigsäure(EDTA)-Kalium-Monovetten [5ml, Sarstedt] und Im Labor Combitipps Pipetten [100-1000 $\mu$ l, Eppenddorf], Ploypropylenröhrchen [5ml, Greiner] Brutschrank [Cell House 200, Sternkopf], Gefriertruhe [Nautaire, Zapf Instrumente] und ein ELISA-Reader [SLT 340 ATTC, SLT Instruments] benutzt.

#### **4.1.2 TNF $\alpha$ -Polymerasekettenreaktion**

Die DNA-Isolation wurde mittels „Puregene® DNA Isolation Kit“ [Gentra Systems], reinem Isopropanol und 70 prozentigem Ethanol [Sigma] durchgeführt. Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde ein PCR-Puffer mit einem Zusatz von 50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL (pH 8,3 bei 24°C) und 1,5 mM Mgcl<sub>2</sub> [Qiagen] benutzt. Weiterhin wurden Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTP) als dNTP-Mix [Biometra], DNA-Polymerase (Hot-Star-Taq, 5 U/ $\mu$ l) [Qiagen], spezifische Sense-Primer (5'AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT3') [Eurogentec] und Antisense-Primer (5'TCCTCCCTGCTCCGATTCCG3') [Eurogentec] verwendet. Zur Restriktionsanalyse wurde das Restriktionsenzym Nco I [New England Biolabs] eingesetzt.

Das Agarosegel wurde mittels MetaPhor Agarose® [FMC BioProducts] gegossen und bei Bedarf mit Ethidium Bromid [ICN] nachgefärbt. Der DNA- Farbstoff wurde aus 25g Bromphenol Blau, 25g Xylene Cyanol in 70 ml Wasser mit 30 ml Glycerol hergestellt. Zusätzlich zu den oben aufgeführten Geräten wurden Labor-Kühl-Zentrifuge [Haereus/Biofuge fresc], Rüttler und Wärmeblock [Eppendorf], Thermocycler TRIO [Biometra], Elektrophoresekammer [Agagel Maxi von Biometra] und UV-Lichtquelle [INTAS] eingesetzt.

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Studienkollektiv**

Von Dezember 1998 bis Mai 2002 haben wir 69 Patienten mit kulturell nachgewiesenen, ambulant erworbenen, invasiven Pneumokokkeninfektionen untersucht. Alle Fälle einer in Kultur nachgewiesenen Pneumokokkeninfektion meldete uns das mikrobiologische Institut der Medizinischen Universität Lübeck. Die Patienten wurden nach folgenden Kriterien in unsere Studie aufgenommen.

#### Einschlusskriterien

Wir haben Patienten mit in Kultur nachgewiesener, ambulant erworbener, invasiver Pneumokokkeninfektion in unsere Studie aufgenommen. Die Diagnose der Pneumokokkeninfektion wurde anhand des kulturellen Pneumokokkennachweises in Kombination mit der entsprechenden Klinik geführt. Die klinische Diagnose der Pneumonie und Meningitis wurde entsprechend dem körperlichen und apparativen Untersuchungsbefund gestellt.

Die Diagnose der Pneumonie basierte auf dem Nachweis

- klinische Symptome: Husten, purulenter Auswurf, Atemnot, atemabhängiger Thoraxschmerz, Fieber oder Hypothermie;
- typischer physikalischer Untersuchungsbefunde: feinblasige ohrnahe Rassengeräusche;
- eines frischen Infiltrates im Röntgenbild der Thoraxorgane;
- einer laborchemischen Infektkonstellation im Blut.

Die Diagnose der Meningitis wurde gestellt bei

- klinischen Symptomen mit akuten Kopf- und Nackenschmerzen, Fieber, Vigilanzstörungen; im fortgeschrittenen Stadium neurologischen Herdsymptomen, symptomatischen fokalen oder generalisierten epileptischen Anfällen;
- einem typischen Untersuchungsbefund, insbesondere Zeichen eines meningealen Reizsyndroms: Meningismus, positives Brudzinski- / Kernig-Zeichen; im Verlauf Zeichen eines neurologischen Ausfallsyndroms;
- einer laborchemischen Infektkonstellation im Blut;
- einem charakteristischen Liquorbefund: granulozytäre Pleozytose, erniedrigter Liquorzucker bei erhöhtem Liquorlaktat, Nachweis von grampositiven Kokken im Direktpräparat;
- mikrobiologischem Erregernachweis im Liquor.

#### Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen von unserer Untersuchung haben wir Patienten mit einem bekannten Immundefekt: maligne hämatologische oder solide Tumore, systemische Glukokortikoidtherapie oder Zytostatikatherapie, HIV-Infektion, Immunglobulinmangel, Z.n. Splenektomie.

#### **4.2.2 Kontrollkollektiv**

Es wurden 50 Probanden rekrutiert. Sie glichen in Alter und Geschlecht dem Patientenkollektiv. Alle Probanden waren Patienten der Klinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Lübeck, die zur elektiven Operation stationär aufgenommen wurden. Die Blutentnahme erfolgte präoperativ. In diesem Rahmen wurde eine klinische und laborchemische Kontrolle durchgeführt. Bei keinem Probanden wurden Zeichen der Infektion beobachtet.

#### **4.2.3 Erfassung klinischer Parameter**

Die Evaluation der klinischen Parameter erfolgte anhand standardisierter Erfassungsbögen zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie sowie anschließend in

einwöchigen Abständen bis zum Abschluss der stationären Behandlung. Dabei wurden die medikamentöse Therapie, Laborparameter, klinische und apparative Untersuchungsergebnisse, krankheitsspezifische Komplikationen, Letalität, Krankenhausaufenthaltsdauer, relevante Vorerkrankungen und Risikofaktoren protokolliert. Alter, Geschlecht, chronischer Nikotin- und Alkoholabusus, chronische Niereninsuffizienz, chronische Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale und chronisch obstruktive Lungenerkrankungen, schwere koronare Herzkrankheit und Herzinsuffizienz, Diabetes mellitus, schwere neurologische Erkrankungen wie dementielles Syndrom sowie Aufenthalt in Pflege- und Seniorenheim wurden als relevante Risikofaktoren erfasst.

Die Erfassung des Schweregrads der Sepsis wurde anhand der Definition der Konsensus-Konferenz des American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine aus dem Jahre 1992 nach Anpassung durch Bone im Jahre 1997 vorgenommen (Bone et al. 1992; Bone et al. 1997). Die darin enthaltenen Definitionen dienten als Grundlage zur Einteilung von septischen Patienten. Bone und Mitarbeiter teilen die Sepsis in vier Schweregrade ein, die im Folgenden dargelegt werden:

### 1. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)

Ein SIRS liegt vor, wenn mindestens zwei der vier folgenden Symptome (möglichst > 24 Stunden) vorliegen:

- Hyperthermie  $> 38^{\circ}\text{C}$  oder Hypothermie  $< 36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz  $> 90$  Schläge / Minute
- Atemfrequenz  $> 20$  / Minute oder arterieller  $\text{CO}_2$ -Partialdruck ( $\text{Pa}(\text{CO}_2)$ )  $< 32$  mmHg
- Leukozytose  $> 12.000 / \text{mm}^3$  oder  $< 4.000 / \text{mm}^3$  oder  $> 10\%$  unreife Vorläuferzellen

### 2. Sepsis

Eine Sepsis liegt vor, wenn ein SIRS als Folge einer Infektion auftritt und andere, potentielle Ursachen für die Symptome der SIRS ausgeschlossen werden können.

### 3. Schwere (severe) Sepsis

Die schwere Sepsis besteht, wenn die Sepsis mit Organdysfunktion (zum Beispiel akutes Nierenversagen), Hypoperfusion (zum Beispiel Laktatazidose als Zeichen für O<sub>2</sub>-Mangel in peripheren Geweben) oder Hypotension (systolischer Blutdruck < 90 mmHg oder Reduktion des systolischen Blutdrucks vom Ausgangswert um > 40 mmHg) einhergeht.

### 4. Septischer Schock

Der septische Schock ist definiert als schwere Sepsis mit arterieller Hypotonie, die trotz adäquater Volumensubstitution anhält, sodass eine Katecholamintherapie notwendig wird.

Entsprechend den Vorgaben wurde unser Studienkollektiv zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie und nach einwöchiger stationärer Behandlung in vier Gruppen „Non-Sepsis“, „Sepsis“, „schwere Sepsis“ und „septischer Schock“ eingeteilt.

Das *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE II)* ist ein auf Intensivstationen vielfach eingesetztes Verfahren, um die Überlebenschancen der Patienten vorauszusagen. In dieses Punktesystem fließen das Alter des Patienten, aktuelle physiologische Parameter (*Acute Physiology Score, APS*) und anamnestische Angaben (*Chronic Health Score*) ein. Die erfassten Parameter sind in Abbildung 2 wiedergegeben.

<b>Acute Physiology Score (APS)</b>									
Punkte	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Temp. rektal °C	≥41	39-40,9		38,5-38,9	36-38,4	34-35,9	32-33,9	30-31,9	≤29,9
Mittlerer art. Druck mmHg	≥160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤49
Herzfrequenz /min	≥180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤39
Atemfrequenz <sup>1)</sup> /min	≥50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤5
a)FiO <sub>2</sub> ≥0,5 A-aDO <sub>2</sub> <sup>2)</sup>	≥500	350-499	200-349		<200				
b)FiO <sub>2</sub> < 0,5 PaO <sub>2</sub>					>70	61-70		55-60	<55
pH	≥7,7	7,6-7,69		7,5-7,59	7,33-7,49		7,25-7,32	7,15-7,24	<7,15
Na <sup>+</sup> mmol/l	≥180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤110
K <sup>+</sup> mmol/l	≥7	6,6-6,69		5,5-5,59	3,5-5,4	3,0-3,4	2,5-2,9		≤2,5
Kreatinin <sup>3)</sup> mg/dl	≥3,5	2,0-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		<0,6		
Hämatokrit %	≥60		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		<20
Leukozyten (x1000)	≥40		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		<1
Glasgow Coma Scale	Punkte = 15- aktueller GCS								

<b>Glasgow Coma Scale (GCS)</b>		
Augen öffnen	Spontan	4
	Öffnen auf Ansprechen	3
	Öffnen auf Schmerzreiz	2
	Keine Reaktion	1
Verbale Reaktion	Orientiert	5
	Verwirrt, desorientiert	4
	Unzusammenhängende Worte	3
	Unverständliche Laute	2
Motorische Reaktion (auf Schmerzreiz)	Keine verbale Reaktion	1
	Befolgt Aufforderung	6
	Gezielte Schmerzabwehr	5
	Massenbewegungen	4
	Beugesynergien	3
	Strecksynergien	2
	Keine Reaktion	1

<b>Chronic Health Points (CHP)</b>					
Leber	5				
Durch Biopsie gesicherte Zirrhose und portaler Hochdruck oder obere gastrointestinale Blutung in der Vorgeschichte oder vorhergehende Episode mit hepatischer Insuffizienz / hepatischem Koma					
Kardiovaskulär	5				
New York Health Association Class IV					
Atmung	5				
Chronisch retraktive, obstruktive Lungenerkrankung, Hyperkapnie, Abhängigkeit von Sauerstofftherapie					
Niere	5				
Chronische Dialysepflichtigkeit					
Immunschwäche	5				
Immunsuppression, Chemotherapie, Leukämie, Lymphom					
<b>Altersbewertung</b>					
Alter	≤44	45-54	55-64	65-74	≥75
Punkte	0	2	3	5	6

APACHE II = Altersbewertung + CHP + APS

**Abbildung 2:** APACHE-II-Score 1) Beatmung oder Spontanatmung  
2)  $2 \text{ PAO}_2 = \text{FIO}_2 \times (\text{PB} - \text{PH}_2\text{O}) - (\text{PaCO}_2 / \text{RQ}) = \text{FIO}_2 \times 713 - \text{PaCO}_2 / 0,8$ ;  $\text{A-aDO}_2 = \text{PAO}_2 - \text{PaO}_2$ .

#### **4.2.4 Ethik**

Alle Patienten und Probanden gaben vor Aufnahme in die Studie eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

Die Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission gebilligt (AZ: 98 – 152, Erstantrag: Dezember 1998).

#### **4.2.5 Blutentnahme**

Dem Patientenkollektiv wurde bei Aufnahme in die Studie 5ml Blut zur Genotypisierung entnommen. Dafür wurden EDTA-Kalium-Monovetten benutzt. Die Proben wurden anschließend ohne weitere Bearbeitung bei - 30°C eingefroren.

Des Weiteren wurde kurz vor Abschluss der stationären Behandlung nochmals 5ml Blut zur Phänotypisierung abgenommen. Hier wurden Lithium-Heparin-Monovetten verwendet. Zu diesem Zeitpunkt war die Leukozytenzahl bei allen Patienten normwertig und das C-reaktive Protein lag unter 5 mg/l. Dadurch wurde ein vergleichbarer Zeitpunkt für alle Patienten zur Phänotypisierung erreicht.

Den Probanden wurde 5ml EDTA-Blut präoperativ in der Klinik für Orthopädie abgenommen.

#### **4.2.6 Vollblut-Assay**

Der Vollblut-Assay wurde nach De Groote durchgeführt (De Groote et al. 1992). Dabei wird Vollblut unter Zugabe von Nährmedium und einem Stimulans inkubiert. Dadurch wird die Produktion von Zytokinen durch Immunzellen provoziert. Anschließend kann aus dem zellfreien Überstand eine quantitative Zytokinmessung vorgenommen werden.

In diesem Falle wurden sterile 5ml-Polypropylen-Röhrchen mit je 850µl RPMI-Medium und 50µl LPS oder LTA stimuliert. Das entspricht 1µg LPS bzw. 100µg LTA. Anschließend wurden jedem Röhrchen 100µl Blut dazugegeben. Ferner wurden Negativkontrollen ohne Zugabe von Stimulans angesetzt. Dieser Arbeitsschritt erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank. Nach Vermischung des Ansatzes wurden sie bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert. Die zellfreien Überstände wurden sodann abpipettiert und in sterilen Eppendorf-Küvetten bei -80°C eingefroren.

## 4.2.7 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, um kurze und definierte Abschnitte der DNA zu vervielfältigen. Dafür werden Oligonukleotide (Primer) benötigt, die zum amplifizierenden DNA-Abschnitt komplementär sind und dadurch an diese anlagern. Das Prinzip beruht auf einem sich wiederholenden Zyklus, der aus drei Hauptschritten besteht.

### 1. DNA-Denaturierung

Die Reaktionslösung, bestehend aus der zu amplifizierenden DNA, Primern, Polymerasen und Desoxynukleotiden (dNTP), wird auf 95°C erhitzt. Dadurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen, die die DNA-Stränge zusammenhalten, aufgeschmolzen und es entstehen einzelsträngige DNA-Ketten. Es ist zu beachten, dass die Primer in großem Überschuss vorliegen, wodurch der erneute Zusammenschluss der DNA-Stränge verhindert wird.

### 2. Primerhybridisierung

Die Temperatur wird gesenkt, sodass sich die Primer an die einzelnen DNA-Stränge anlagern. Die gewählte Temperatur, in diesem Fall 60°C, hängt von den verwendeten Primern ab. Eine zu hohe oder zu niedrige Temperatur führt dazu, dass die Primer entweder an den falschen Stellen oder überhaupt nicht an die DNA binden.

### 3. DNA-Elongation

Nun verlängert die DNA-Polymerase mit Hilfe der erwähnten Desoxynukleotiden die fehlenden Stränge der DNA. Dabei beginnt sie am 3'-Ende des angelagerten Primers. Für diesen Schritt wird die Temperatur auf 75°C erhöht. Die gewählte Temperatur und die Zeit, die für diesen Schritt benötigt wird, hängt von der verwendeten DNA-Polymerase ab.

Dieser Reaktionszyklus wird mehrfach wiederholt, wodurch eine große Anzahl der zu untersuchenden DNA entsteht. Anschließend werden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel, das an eine elektrische Spannung angeschlossen ist, getrennt und anhand ihrer Größe identifiziert.

#### **4.2.8 PCR zur Identifizierung des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus**

Die Analyse zur Genotypisierung der Patienten und Kontrollen wurde im Forschungszentrum Borstel vorgenommen. Das Protokoll war an die von Wilson und Mitarbeiter erstmalig beschriebene Methode zur Analyse des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus angelehnt (Wilson et al. 1992), welche wie folgt durchgeführt wurde:

##### 1. DNA-Isolation

Die DNA wurde aus dem EDTA-Vollblut mittels kommerzieller Kits isoliert. Es wurden 300 $\mu$ l EDTA-Vollblut mit 900 $\mu$ l „Red Blood Cell (RBC) Lysis Solution“ in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert und anschließend bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, wobei ein Rest von 25 $\mu$ l belassen wurde. 300 $\mu$ l Cell Lysis Solution wurden dem restlichen Reaktionsgemisch hinzugegeben. Das Lysat wurde für 15 – 60 Minuten bei 37°C inkubiert, durchmischt und für 3 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. 300 $\mu$ l Isopropanol wurden zusätzlich gegeben und das Gemisch für eine Minute erneut bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Der restlichen Probe wurden 300 $\mu$ l 70 prozentiges Ethanol zugegeben und diese abermals eine Minute bei gleicher Umdrehung zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen und verworfen wurde, ließ man den DNA-Pellet bei geöffnetem Eppendorfgefäß trocknen. Im letzten Schritt wurden 100 $\mu$ l DNA-Hydratationslösung in die Probe pipettiert und das Gemisch bei 65°C im Wärmeblock für 60 Minuten dauerhaft gerührt und inkubiert. Die gelöste DNA konnte bei -80°C gelagert werden.

##### 2. Polymerasekettenreaktion

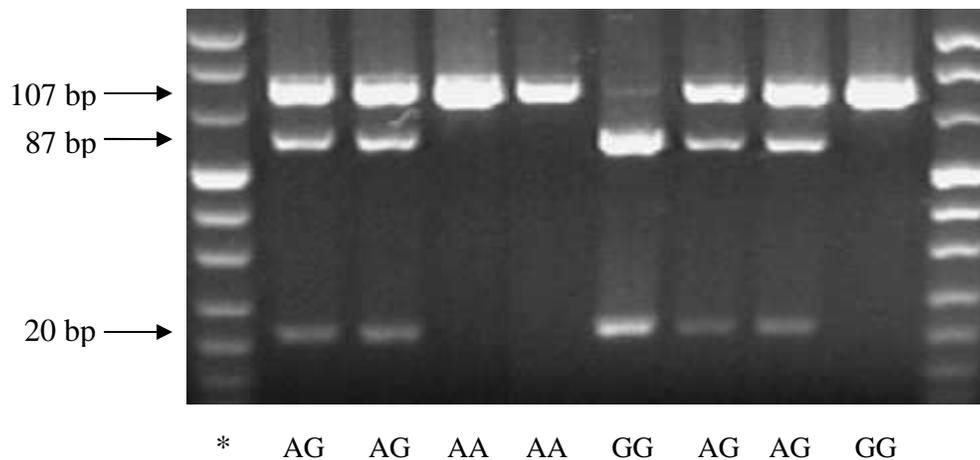
2 $\mu$ l der isolierten DNA wurden in den Reaktionsansatz, die aus 2,5 $\mu$ l PCR-Buffer, 0,5 $\mu$ l dNTP-Mix mit einer Endkonzentration von 200 $\mu$ M, 16,68 $\mu$ l Aqua destillata, 0,125 $\mu$ l der spezifischen DNA-Polymerase, 1,25 $\mu$ l spezifische Sense- und 1,25 $\mu$ l Antisense-Primer und 0,7 $\mu$ l Magnesiumchlorid, beigegeben, sodass ein 25 $\mu$ l Ansatz entstand.

Das PCR-Protokoll beinhaltete 38 Zyklen mit jeweils 1 Minute bei 95°C, eine weitere Minute bei 60°C und anschließend 90 Sekunden bei 72°C, wobei pro Zyklus dieser Schritt um 2 Sekunden verlängert wurde. Schließlich wurde die Probe bei 4°C in der Endlosschleife gekühlt.

Anschließend wurde die Restriktionsanalyse durchgeführt. Dabei wurden 34µl des PCR-Produktes, welches 107 Basenpaare lang ist, 40µl destilliertem Wasser zugegeben. Ferner wurde 20 U des Restriktionsenzym Nco I beigemischt.

Das häufige TNF-G-Allel wird durch die Base Guanin definiert. Diese Konstellation wird durch das Nco I geschnitten. Es entsteht ein 87 und ein 20 Basenpaar langes DNA-Fragment. Das TNF-A-Allel wird hingegen durch das Restriktionsenzym nicht geschnitten. Dadurch bleibt das Fragment in seiner ursprünglichen Länge. Amplifikate von homozygoten TNF-G-Allelträgern werden daher komplett geschnitten. Bei heterozygoten Individuen kommt es zur partiellen Durchschneidung der DNA-Fragmente und bei homozygoten TNF-A-Allelträgern bleiben alle Fragmente ungeschnitten.

Diese DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese in einem zweiprozentigen Agarosegel identifiziert. 5µl des PCR-Produktes wurden unter Anfärben mit DNA-Farbstoff auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wurde mit 0,5-fach Tris-Borsäure-EDTA-Puffer gefüllt und für etwa eine Stunde an eine Stromquelle mit 90V und 0,87A angeschlossen. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe einer UV-Lichtquelle bei 312nm sichtbar gemacht und abfotografiert (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Ergebnis einer Gelelektrophorese zur Restriktionsanalyse der PCR des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus, DNA-Längenstandard

#### **4.2.9 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay, zu Deutsch Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA), bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Mit Hilfe dieses Verfahrens können unter anderem Proteine in einer Probe nachgewiesen und deren Konzentration quantitativ gemessen werden. Dabei wird mit Hilfe von Antikörpern, die spezifisch an den zu untersuchenden Stoff binden, ein Antikörper-Antigen-Komplex gebildet. Antikörper oder Antigen werden zuvor an ein Enzym gekoppelt. Durch dieses Enzym wird wiederum eine Reaktion ausgelöst, die als Nachweis für das Vorhandensein des zu untersuchenden Stoffes fungiert.

Zur Konzentrationsmessung von Zytokinen wird die so genannte „Sandwich-Methode“ angewandt. Hier kommen zwei Antikörper zum Einsatz, die jeweils an unterschiedlichen Stellen an den zu untersuchenden Stoff binden können. Der erste Antikörper, auch „*coating*-Antikörper“ genannt, ist fest an den Boden der Mikropipettierplatte gebunden. Die Probe wird mit dem zu untersuchenden Zytokin hinzugegeben. Nach definierter Inkubationszeit wird die Platte gewaschen. Dadurch werden die ungebundenen Bestandteile entfernt. Im nächsten Schritt wird ein zweiter, enzymmarkierter Antikörper, der sogenannte „*Detection*-Antikörper“ beigefügt. Dieser bindet im Verlaufe der zweiten Inkubationsphase ebenfalls an das Antigen, sodass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Nach erneutem Waschvorgang wird eine Substratlösung zugegeben. Das am Komplex gebundene Enzym katalysiert die Farbreaktion, in der sich das Substrat umwandelt. Die Intensität der Farbreaktion ist dabei direkt proportional mit der Konzentration des zu untersuchenden Proteins.

Im Rahmen der in dieser Studie durchgeführten Phänotypisierungen wurden kommerzielle ELISA-Kits für humanes TNF $\alpha$  der Firma BioSource benutzt.

#### **4.3 Statistische Auswertung**

Die statistischen Berechnungen wurden mit Statistica 5.1 (StatSoft Inc. 1997, Tulsa USA) und StatXact 5.0 (Cytel Software Corporation, Cambridge, MA) durchgeführt. Mittels des Cochran-Armitage-Trend-Tests wurde das Chancenverhältnis für den TNF $\alpha$ -308 AA/AG-Genotyp in Assoziation zum Schweregrad der Sepsis geprüft. Den

Man-Whitney-U-Test (U Test) verwendeten wir zur Berechnung der unabhängigen nicht-parametrischen Stichproben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, p-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. In der statistischen Auswertung wurden wir vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik, UK-SH – Campus Lübeck beraten.

## **5 Ergebnisse**

### ***5.1 Demographische Daten***

#### **5.1.1 Patienten**

Im Zeitraum von Dezember 1998 bis Oktober 2002 wurden 69 Patienten mit mikrobiologisch nachgewiesener, systemischer Pneumokokkeninfektion in die Studie aufgenommen. Alle Patienten waren deutscher Abstammung und hatten ein Durchschnittsalter von 65 ( $\pm 17.8$ ) Jahren bei einer Spanne von 34 bis 92 Jahren. 37 Patienten waren männlich und 32 weiblich. Eine Verwandtschaft zwischen den Patienten bestand nicht.

#### **5.1.2 Kontrollen**

Eine Kontrollgruppe aus 50 gesunden Probanden wurde rekrutiert. Diese waren in Alter und Geschlecht unserer Patientengruppe angeglichen, sie waren alle ebenfalls deutscher Abstammung. Eine Verwandtschaft untereinander und zu der Patientengruppe lag nicht vor.

### ***5.2 Klinische Daten***

#### **5.2.1 Klinische Manifestation der Pneumokokkeninfektion und Pneumokokkennachweis**

Es waren 61 (89%) Patienten an einer Pneumonie erkrankt, fünf (7%) Patienten litten an einer Meningitis und drei (4%) Patienten waren sowohl an Pneumonie als auch an Meningitis erkrankt.

Der Nachweis der Pneumokokkeninfektion gelang durch Blutkultur (BK, n=39), Liquorkultur (LK, n=3), BAL mit einer Konzentration von  $10^4$  Bakterien/CFU (n=8),

Trachealsekret mit einer Konzentration von  $10^6$  Bakterien/CFU (n=11), Pleurapunktat (n=3), sowie kombiniertem Nachweis in BK und LK (n= 3) und BK und BAL (n=2). Tabelle 3 zeigt die demographischen Daten der Patientengruppe und den Nachweis der invasiven Pneumokokkeninfektion.

<b>Patienten insgesamt</b>	69		
Alter (MW $\pm$ SD)	65 $\pm$ 17,8		
<b>Geschlecht</b>			
Männlich	37 (54%)	Weiblich	32 (45%)
<b>Pneumokokkennachweis</b>			
Blutkultur	39 (57%)	Pleurapunktat	3 (4%)
Liquorkultur	3 (4%)	Blut- + Liquorkultur	3 (4%)
BAL	8 (12%)	Blutkultur + BAL	2 (3%)
Sputum/ Trachealsekret	11 (15%)		
<b>Diagnose</b>			
Pneumonie	61 (88%)	Pneumonie + Meningitis	3 (4%)
Meningitis	5 (7%)		

**Tabelle 3:** Demographische Daten, Pneumokokkennachweis und klinische Manifestation der Patientengruppe; absolute und relative Zahlen ( ) im Bezug auf das Gesamtkollektiv der Patienten.

### 5.2.2 Einteilung des Schweregrads der Erkrankung

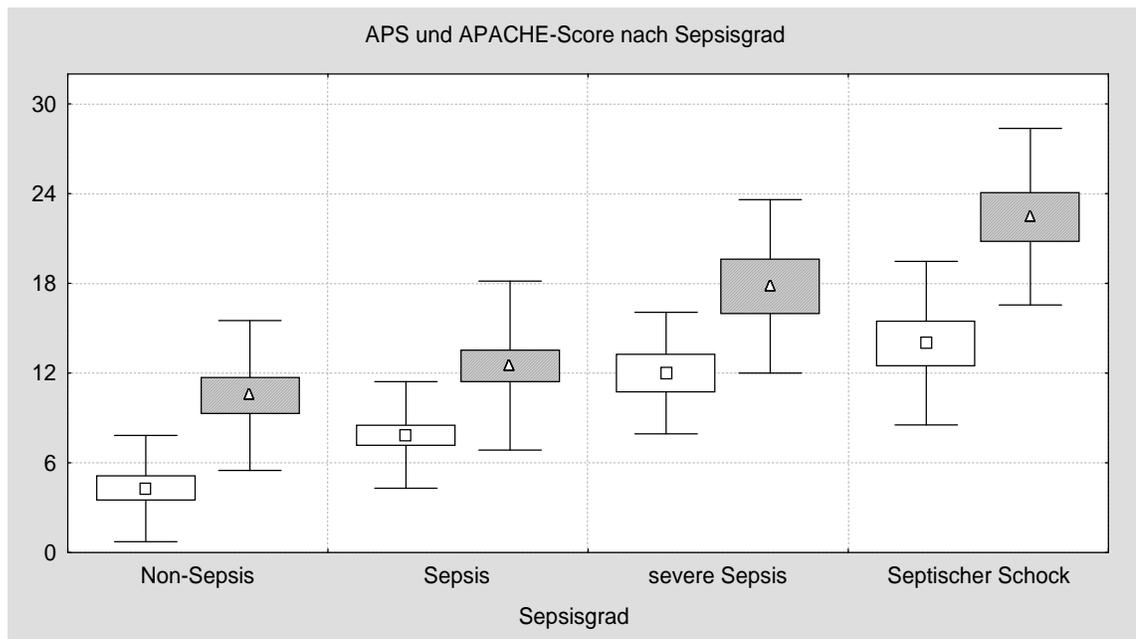
Die Patienten wurden am Tag der stationären Aufnahme sowie nach sieben Tagen nach den Bone-Kriterien bewertet und in vier Hauptgruppen „Non-Sepsis“, „Sepsis“, „schwere Sepsis“ und „septischer Schock“ eingeteilt. Von den 69 in die Studie aufgenommen Patienten hatten 18 am Tag der Aufnahme eine systemische Pneumokokkeninfektion ohne jedoch die Sepsiskriterien zu erfüllen. Die restlichen 51 Patienten erfüllten die Sepsiskriterien nach Bone. Davon zeigten 28 Patienten eine Sepsis, 10 Patienten hatten eine schwere Sepsis und 13 Patienten entwickelten einen septischen Schock.

Am siebten Tag der Behandlung erfüllten 58 Patienten die Sepsiskriterien nicht. Elf Patienten konnten weiterhin als septisch eingestuft werden. Zwei Patienten waren zu diesem Zeitpunkt verstorben. Die genaue Verteilung ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

<b>Einteilung der Patienten</b>			
<i>Aufnahmetag</i>	<i>7. Tag</i>		
Non-Sepsis	18 (26%)	Non-Sepsis	54 (78%)
Sepsis	28 (41%)	Sepsis	11 (16%)
Schwere Sepsis	10 (14%)	Schwere Sepsis	1 (1%)
Septischer Schock	13 (19%)	Septischer Schock	1 (1%)
		Verstorben	2 (3%)

**Tabelle 4:** Absolute und relative (%) Verteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme und nach einer Woche nach den Variablen: Non-Sepsis, Sepsis, Schwere Sepsis und septischer Schock.

Für die einzelnen Gruppen wurden der APACHE-II-Score sowie weitere klinische Parameter erfasst. Anhand dieser Daten kann sehr gut demonstriert werden, dass der Sepsis-Schweregrad mit dem APS- und APACHE-II-Score korreliert. Die APACHE-II- und die APS-Punkteverteilungen der untersuchten Gruppen sind in Abbildung 4 dargestellt. Dabei nimmt proportional zum Schweregrad der Erkrankung auch der APS und APACHE-II-Score zu.



**Abbildung 4:** APS und APACHE-II Score der Patienten nach den Variablen Non-Sepsis, Sepsis, Schwere Sepsis und Septischer Schock, □ APS-Score Δ APACHE-Score.

Fasst man Patienten, mit schwerer Sepsis und septischem Schock zusammen und vergleicht sie mit der Restgruppe, so zeigt sich, dass bei diesen Patienten sowohl der APS als auch der APACHE-II-Score statistisch signifikant höher sind (zweiseitiger

Mann-Whitney U Test  $p < 0,01$ ). Ferner beobachteten wir einen signifikant längeren Krankenhausaufenthalt dieser Gruppe. Eine Übersicht über die klinischen Parameter, aufgeteilt nach Gruppen ohne Sepsis oder Sepsis gegen schwere Sepsis und septischer Schock, ist in Tabelle 5 dargestellt.

Parameter	Non-Sepsis		Schwere Sepsis Septischer Schock		P <sup>1)</sup>
	Mittel	±Std.Abw	Mittel	±Std.Abw.	
APS	6,46	3,94	7,86	4,9	< 0,01
APACHE	11,72	5,44	12,50	6,19	< 0,01
CRP max. (mg/l)	306,4	152,26	298,2	186,59	> 0,05
Leukozyten max. (tsd/nl)	19,69	8,64	22,62	1,26	> 0,05
Temp. max. °C	38,69	1,07	39,12	12,68	> 0,05
Krankenhausaufenthalt in Tagen	20	11	27,4	13,1	< 0,05

**Tabelle 5:** Klinische Parameter der Patienten (Mittelwert ± Standardabweichung) nach den Variablen: Non-Sepsis / Sepsis im Vergleich zu schwerer Sepsis / septischer Schock; <sup>1)</sup> exakter zweiseitiger Fisher-Test

### 5.2.3 Risikofaktoren

Bei lediglich 8 (12%) Patienten unseres Kollektivs war die Anamnese bezüglich Risikofaktoren für die Entstehung invasiver Pneumokokkeninfektionen leer. Hingegen hatten 30 (43%) Patienten mindestens zwei Risikofaktoren. Der am häufigsten beobachtete Risikofaktor war das Alter. 33 (48%) Patienten hatten zum Zeitpunkt der Erkrankung das 70. Lebensjahr vollendet. Bei 28 (41%) Patienten konnte ein Nikotinabusus beobachtet werden. Eine genaue Übersicht über die einzelnen Risikofaktoren ist in Tabelle 6 wiedergegeben.

Risikofaktoren			
Alter > 70	33 (48%)	neurologische Erkrankung <sup>1)</sup>	13 (19%)
Nikotinabusus	28 (41%)	Niereninsuffizienz	9 (13%)
Asthma / COPD	21 (30%)	Alkoholabusus	8 (12%)
KHK /Herzinsuffizienz	19 (28%)	Pflege-/ Altersheim	5 (7%)
Diabetes mellitus	14 (20%)		
≥ 1 Risikofaktor	61 (88%)	≥ 2 Risikofaktor	30 (43%)

**Tabelle 6:** Absolute und relative ( ) Verteilung der Risikofaktoren der Patientengruppe für die Entstehung invasiver Pneumokokkeninfektionen; <sup>1)</sup> dokumentierte fortgeschrittene Demenz, fortgeschrittene cerebrovaskuläre Insuffizienz, Anfallsleiden

Es stellte sich die Frage, ob bekannte Vorerkrankungen und Risikofaktoren für Pneumokokkeninfektionen mit der Entstehung der schweren Sepsis und septischem Schock assoziiert sind. Hier zeigte sich, dass Patienten, die eine schwere Sepsis oder einen septischen Schock entwickelten, statistisch signifikant älter waren als das restliche Kollektiv ( $61,5 \pm 18,6$  vs.  $71,4 \pm 14,0$ ; zweiseitiger Mann-Whitney U Test  $p = 0,04$ ). Andere Risikofaktoren waren nicht mit der Entstehung der schweren Sepsis und des septischen Schocks assoziiert.

#### 5.2.4 Komplikationen und Letalitätsrate

Die krankheitsspezifischen Komplikationen wurden ebenfalls miterfasst. Als häufigste Komplikation wurde der Pleuraerguss bei 36 (52%) Patienten beobachtet. Eine akute Niereninsuffizienz mit signifikanter Erhöhung der Nierenretentionsparameter war bei 6 (9%) Patienten nachweisbar. Weitere 4 (6%) Patienten entwickelten sogar ein manifestes Nierenversagen, sodass eine Nierenersatztherapie mit kontinuierlicher Hämofiltration durchgeführt werden musste. Bei 13 (19%) Patienten trat ein septisches Kreislaufversagen mit der Notwendigkeit der Katecholamintherapie auf. 14 (20%) Patienten mussten mittels Respirator beatmet werden. Septische Metastasen wurden bei 6 (9%) Patienten gesehen. Insgesamt entwickelten 27 (39%) Patienten mindestens eine septische Komplikation, wobei der Pleuraerguss hier nicht zu den septischen Komplikationen gezählt wurde (Tabelle 7).

<b>Komplikationen</b>			
Pleuraerguss	36 (52%)	Septische Metastasen	6 (9%)
Pleuraempyem	5 (7%)	septisches Kreislaufversagen <sup>1)</sup>	13 (19%)
Akute Niereninsuffizienz <sup>2)</sup>	6 (9%)	Beatmung	14 (20%)
Akutes Nierenversagen <sup>3)</sup>	4 (6%)	≥ 1 septische Komplikation	27 (39%)
Gerinnungsstörung	4 (5%)	Tod	5 (7%)

**Tabelle 7:** Absolute und relative ( ) Verteilung der aufgetretenen Komplikationen und Letalitätsrate der Patienten im Verlauf der invasiven Pneumokokkeninfektion; <sup>1)</sup>septisches Kreislaufversagen mit Notwendigkeit einer Katecholamintherapie; <sup>2)</sup> Zeichen der akuten Niereninsuffizienz wie Harnstoff- oder Kreatininanstieg, ohne dass bereits ein ANV besteht; <sup>3)</sup> ANV mit Notwendigkeit einer Dialysebehandlung.

Bei 8 von 28 Patienten (29%) mit Sepsis beobachteten wir mindestens eine septische Komplikation. Vergleicht man die Gruppe der Patienten ohne Sepsis und Sepsis mit dem Restkollektiv, in der 19 von 23 (82%) Patienten mindestens eine septische Komplikation hatten, so ergibt sich ein statistisch hochsignifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung septischer Metastasen bei schwerer und schwerster Sepsis (exakter zweiseitiger Fisher-Test  $p = 0,01$ ).

Bei fünf verstorbenen Patienten betrug die Letalitätsrate des Patientenkollektivs 7%, wobei alle verstorbenen Patienten unter einer schweren Sepsis bzw. an einem septischen Schock litten. Zwei Patienten verstarben innerhalb der ersten Behandlungswoche.

### 5.3 Genotyp- und Allelhäufigkeiten

#### 5.3.1 Genotyphäufigkeiten der Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe

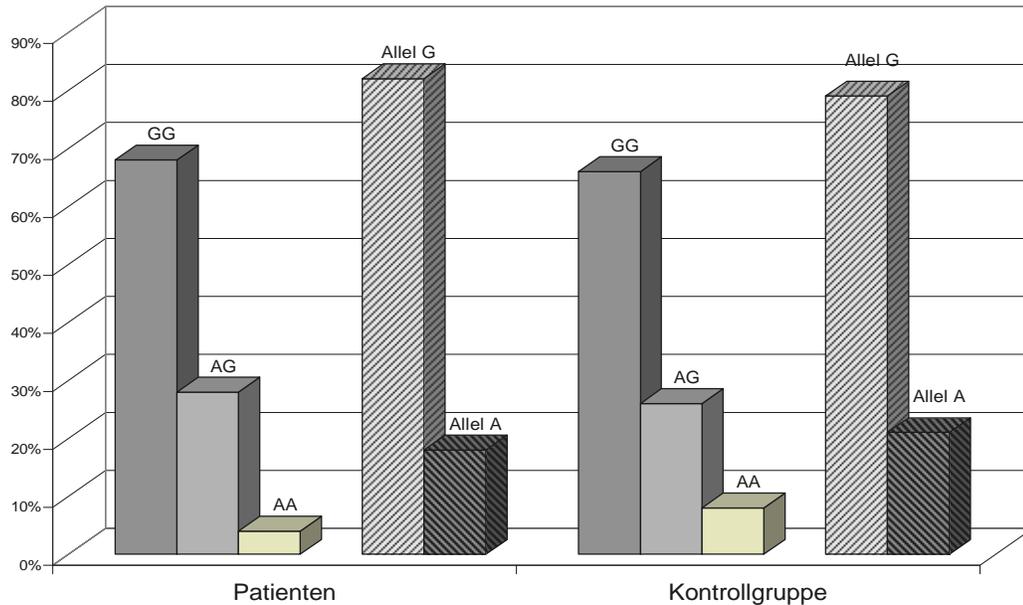
Die Genotyp- und Allelverteilung der Patienten und der Kontrollgruppe ist in Tabelle 8 wiedergegeben.

Genotypisierung	Genotyp						Allelfrequenz			
	GG		AG		AA		G		A	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Patienten (n= 68)	48	71	18	26	2	3	114	84	22	16
Kontrollgruppe (n=50)	33	66	13	26	4	8	79	79	21	21
Exakter zweiseitiger Fisher-Test	P= 0,69						p = 0,39			

**Tabelle 8:** Absolute und relative Genotypverteilung sowie die Allelfrequenz der Patienten, im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Bei einem Patienten gelang die Genotypisierung nicht. Die Genotypverteilung wurde wegen der geringen Fallzahlen des homozygoten A-Genotyps in einer Vierfeldertafel getestet. Ferner ist in anderen Studien gezeigt worden, dass sowohl der heterozygote AG-Typ als auch der homozygote AA-Typ eine signifikant höhere TNF $\alpha$ -Produktion im Vergleich zum häufigeren homozygoten GG-Typ induzieren. Somit sind Individuen mit den Genotypen AG und AA dem GG-Genotyp gegenübergestellt worden. Die

Häufigkeit der jeweiligen Genotypen der beiden Gruppen ist nahezu identisch. Der TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus hat keinen Einfluss auf die Inzidenz der systemischen Pneumokokkeninfektion (Exakter zweiseitiger Fisher-Test  $p= 0,69$ ). Eine schematische Darstellung des Verteilungsmusters ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5:** Vergleich der relativen Genotyp- und Allelverteilung der Patienten und Kontrollen.

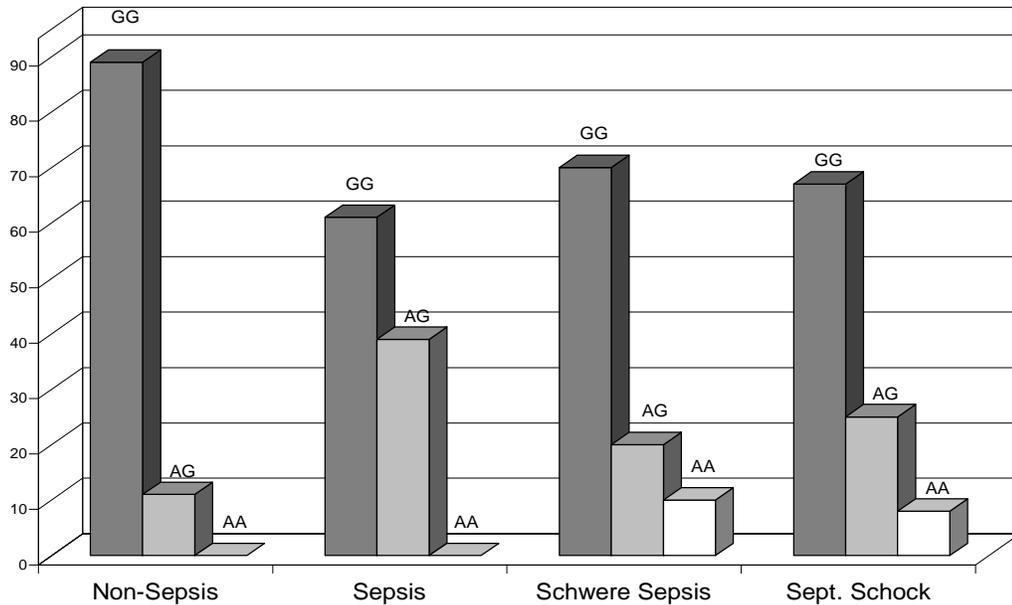
### 5.3.2 Einfluss des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus auf den Schweregrad der Sepsis

Es wurde untersucht, ob der TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus eine Rolle bei der Entstehung schwerer und schwerster Krankheitsbilder systemischer Pneumokokkeninfektionen spielt. In Tabelle 9 und Abbildung 6 ist die Verteilung der Genotypen innerhalb der einzelnen Patientengruppen aufgeführt. Mittels Cochran Armitage Trend Test konnte gezeigt werden, dass der TNF $\alpha$ -308-Promotor-Polymorphismus keine Assoziation zum Schweregrad der Sepsis besitzt (Exakter zweiseitiger Fisher-Test  $p = 0,31$ ).

Sepsis-Schweregrad	GG	AG	AA
Non-sepsis (n=18)	16 (89%)	2 (11%)	0
Sepsis (n=28)	17 (61%)	11 (39%)	0
Schwere Sepsis (n=10)	7 (70%)	2 (20%)	1 (10%)
Septischer Schock (n=12)	8 (67%)	3 (25%)	1 (8%)

Exakter zweiseitiger p= 0,31

**Tabelle 9:** Genotypverteilung des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus in absoluten und relativen ( ) Zahlen im Vergleich mit dem Schweregrad der Sepsis.



**Abbildung 6:** Darstellung der relativen Genotypverteilung nach jeweiligem Schweregrad der Sepsis.

### 5.3.3 Einfluss des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus auf den klinischen Verlauf

In Tabelle 10 sind die Komplikationshäufigkeiten und Letalitätsrate TNF-A-Allel-negativer und -positiver Individuen gegenüber gestellt. Im Vierfeldertest zeigt sich keine Assoziation des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus mit der Inzidenz septischer Metastasen bzw. der Letalität (Exakter zweiseitiger Fisher-Test p = 0,16 [septische Metastasen] p =1,0 [Letalität]).

<b>Morbidität / Letalität</b>	<b>G / G</b>	<b>A / G</b>	<b>A / A</b>
Letalität	4 (8%)	1 (5%)	
Exakter zweiseitiger p = 1,0			
≥1 septische Komplikation	16 (33%)	4 (20%)	
Exakter zweiseitiger p = 0,16			

**Tabelle 10:** Letalität und septische Komplikationen der Patientengruppe in Assoziation mit dem TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus.

Weiterhin untersuchten wir, ob eine Assoziation zwischen dem TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus und anderen klinischen Verlaufsparemtern besteht. Weder für den APS- und APACHE-Score, noch für andere klinische Parameter zeigte sich eine Assoziation mit dem TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test p > 0,05). Die klinischen Daten sind entsprechend den Genotypverteilungen in Tabelle 11 wiedergegeben.

<b>Parameter</b>	<b>G / G</b>		<b>A / G</b>		<b>A / A</b>
	Mittelwert	$\pm$ Std.Abw	Mittelwert	$\pm$ Std.Abw	
APS	8,79	$\pm$ 5,69	8,3	$\pm$ 4,47	0,85
APACHE II	15,14	$\pm$ 6,87	13,15	$\pm$ 7,44	0,17
CRP (mg/l)	314,7	$\pm$ 151,5	333,2	$\pm$ 197,1	0,85
Leukozyten (tsd/nl)	20,67	$\pm$ 10,41	22,13	$\pm$ 5,73	0,11
Temperatur (°C)	38,58	$\pm$ 1,16	39,13	$\pm$ 1,1	0,08

**Tabelle 11:** Klinische Parameter der Patientengruppe in Assoziation mit dem TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus, aufgeschlüsselt nach Genotypen. <sup>1)</sup> zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test

#### **5.4 In-vitro Zytokinproduktion: TNF $\alpha$ „high“ und „low secretor“**

Wie bereits erwähnt, existiert eine genetische Prädisposition für eine starke oder schwache TNF-Antwort nach Zellstimulation, „high“- und „low secretor“-Phänotyp. Diese genetische Komponente wird auf 60% geschätzt (Reuss 2002).

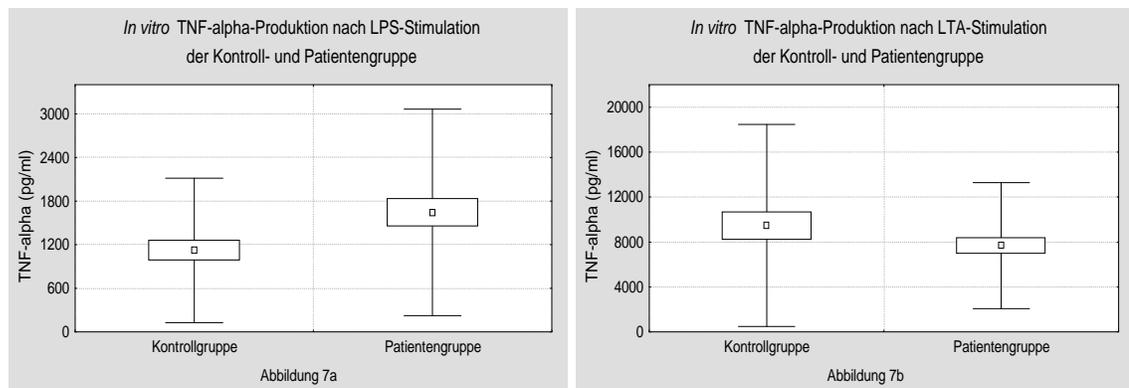
Um den „angeborenen“ Phänotyp zu bestimmen wurde eine Vollblutstimulation durchgeführt. Um einen Einfluss der akuten Infektion auf den Assay auszuschließen, wurde die Untersuchung erst vor Entlassung der Patienten, bei einem CRP Wert < 5mg/l und normaler Gesamtleukozytenzahl durchgeführt. Dadurch lässt sich ein Einfluss der akuten Infektion auf den Assay ausschließen.

Die Untersuchung (*in vitro* Zytokinproduktion nach 24 Stunden Vollblutstimulation mit LPS und LTA) konnte bei 59 der Pneumokokkenpatienten und 50 Probanden durchgeführt werden.

### 5.4.1 TNF $\alpha$ -Phänotyp bei Kontrollen und Patienten

Wir haben die *in vitro* Zytokinproduktion nach Vollblutstimulation der Patienten und Probanden miteinander verglichen.

Wir fanden keinen statistisch signifikanten Unterschied in der TNF $\alpha$ -Produktion zwischen den beiden Gruppen nach Stimulation mit LPS und LTA (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test  $p > 0,05$ ). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 7a, b und in Tabelle 12 wiedergegeben.



**Abbildung 7a, 7b:** Graphische Darstellung der *in vitro* TNF $\alpha$ -Produktion mittels ELISA nach Stimulation mit LPS (7a) und LTA (7b), aufgeschlüsselt nach Kontrollkollektiv und Patienten. I: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $\square$  Mittelwert  $\pm$  Standardfehler;  $\square$  Mittelwert

Phänotypisierung	Probanden		Patienten		P <sup>1</sup>
	Mittel	$\pm$ Std.Abw.	Mittel	$\pm$ Std. Abw.	
LPS-Stimulation <sup>2</sup>	1120,8	995,1	1642,9	1418,8	0,11
LTA-Stimulation <sup>2</sup>	9470,1	8986,7	7678,5	5600,5	0,09

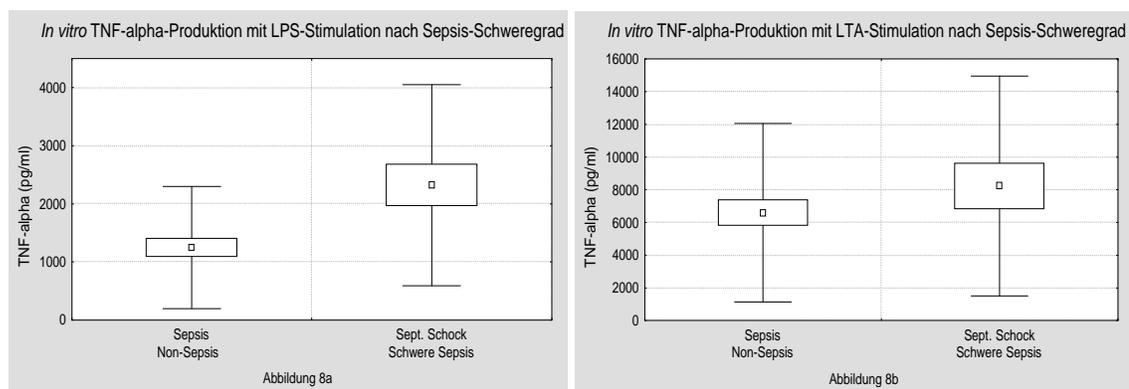
**Tabelle 12:** Tabellarische Darstellung der TNF $\alpha$ -Produktion nach Vollblutstimulation mit LPS und LTA.  
<sup>1</sup> Zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test; <sup>2</sup> Werte in pg/ml

## 5.4.2 TNF $\alpha$ -Phänotyp bei schwerer Sepsis

Wir untersuchten, ob Patienten mit schwerer Sepsis bzw. septischem Schock einen anderen TNF $\alpha$ -Phänotyp haben als Patienten mit leichter Pneumokokkeninfektion.

Dabei wurde beobachtet, dass die *in vitro* TNF $\alpha$ -Produktion nach LPS-Stimulation bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock im Durchschnitt fast doppelt so hoch lag wie bei Patienten ohne Sepsis oder mit Sepsis. Während Patienten mit schwerer oder schwerster Sepsis im Mittel 2357,4 ( $\pm$ 1459,8) pg/ml TNF $\alpha$  produzierten, lag die Zytokinproduktion in der Vergleichsgruppe bei 1415,5 (1316,2) pg/ml (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test  $p = 0,01$ ). Nach Stimulation mit LTA fanden wir in der Gruppe mit schwerer Sepsis und septischem Schock ebenfalls eine höhere, aber statistisch nicht signifikante, TNF $\alpha$ -Produktion. Die Ergebnisse nach Stimulation mit LPS und LTA sind in Tabelle 13 und Abbildung 8a, b wiedergegeben.

Patienten mit schwerer Pneumokokkeninfektion haben somit häufiger einen TNF $\alpha$  „high secretor“ Phänotyp. Der TNF $\alpha$  „high secretor“ Phänotyp prädisponiert somit wahrscheinlich für einen schweren Verlauf.



**Abbildung 8a, 8b:** Graphische Darstellung der *in vitro* TNF $\alpha$ -Produktion mittels ELISA nach Stimulation mit LPS (8a) und LTA (8b), aufgeschlüsselt nach dem Sepsisschweregrad. I: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $\square$ : Mittelwert  $\pm$  Standardfehler,  $\square$  Mittelwert

Phänotypisierung Patienten	Non-Sepsis		Schwere Sepsis Septischer Schock		P <sup>1</sup>
	Mittel	$\pm$ Std.Abw.	Mittel	$\pm$ Std.Abw.	
LPS-Stimulation <sup>2</sup>	1415,5	1316,2	2357,4	1415,5	0,01
LTA-Stimulation <sup>2</sup>	6591,3	5459,3	9645,3	6591,3	0,49

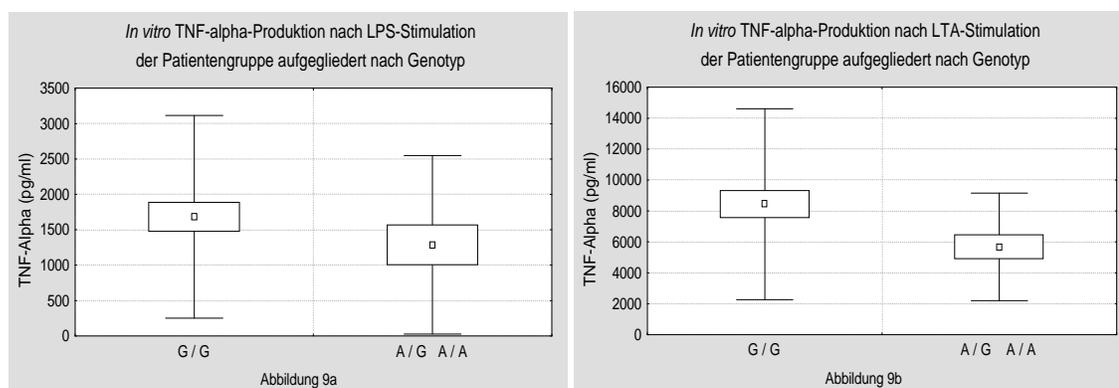
**Tabelle 13:** Tabellarische Darstellung der *in vitro* TNF $\alpha$ -Produktion nach LPS- und LTA-Stimulation nach dem Sepsisschweregrad, <sup>1</sup> Zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test; <sup>2</sup> Werte in pg/ml

## 5.4.3 TNF $\alpha$ -Phänotyp in Abhängigkeit vom TNF $\alpha$ -308-Promotor-Polymorphismus

### 5.4.3.1 Patienten

Wie bereits erwähnt, konnten Louis und Kollegen nachweisen, dass das TNF-A-Allel nach in-vitro Stimulation mit LPS mit einer signifikant höheren TNF $\alpha$ -Produktion vergesellschaftet ist (Louis et al. 1998). Wir untersuchten daher die Assoziation vom TNF $\alpha$ -Phänotyp zu TNF $\alpha$ -Genotyp.

In unserem Patientenkollektiv fand sich keine Assoziation des TNF $\alpha$ -Phänotyps mit dem TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus. Die Ergebnisse nach LPS- und LTA-Stimulation sind in den Abbildungen 9a, b sowie in Tabelle 14 wiedergegeben.



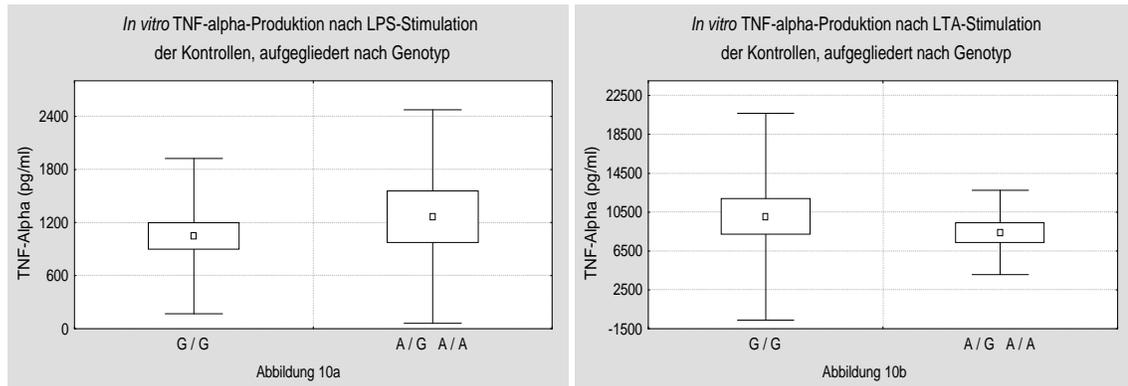
**Abbildung 9a, 9b:** Graphische Darstellung der der *in vitro* TNF $\alpha$ -Produktion der Patienten mittels ELISA nach Stimulation mit LPS(9a) und LTA (9b), aufgeschlüsselt nach TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus. I: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $\square$  Mittelwert  $\pm$  Standardfehler;  $\square$  Mittelwert

Phänotypisierung Patienten	G / G		A/G A/A		P <sup>1</sup>
	Mittel	$\pm$ Std.Abw.	Mittel	$\pm$ Std. Abw.	
LPS-Stimulation <sup>2</sup>	1682,9	1432,5	1287,3	1262,5	0,45
LTA-Stimulation <sup>2</sup>	8437,3	6181,7	5682,3	3481,3	0,15

**Tabelle 14:** Tabellarische Darstellung der TNF $\alpha$ - In-vitro-Produktion der Patienten nach LPS- und LTA-Stimulation nach TNF $\alpha$ -Genotypen G/G und A/G, A/A; <sup>1</sup> Zweiseitiger Mann-Whitney U-Test; <sup>2</sup> Werte in pg/ml.

### 5.4.3.2 Probanden

In unserem Probandenkollektiv fand sich ebenfalls keine Assoziation zwischen TNF $\alpha$ -Phänotyp und -Genotyp. Die Ergebnisse nach LPS- und LTA-Stimulation sind in den Abbildungen 10a, b sowie in Tabelle 15 wiedergegeben.



**Abbildung 10a, 10b:** Graphische Darstellung der der *in vitro* TNF $\alpha$ -Produktion der Kontrollen mittels ELISA nach Stimulation mit LPS (10a) und LTA (10b), aufgeschlüsselt nach dem TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus.

I: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $\square$  Mittelwert  $\pm$  Standardfehler;  $\square$  Mittelwert

Phänotypisierung Probanden	G / G		A/G A/A		P <sup>1</sup>
	Mittel	$\pm$ Std.Abw.	Mittel	$\pm$ Std. Abw.	
LPS-Stimulation <sup>2</sup>	1045,2	877,6	1267,6	1207,4	0,74
LTA-Stimulation <sup>2</sup>	10023,3	10645,2	10645,2	4339,6	0,85

**Tabelle 15:** Tabellarische Darstellung der TNF $\alpha$ - In-vitro-Produktion der Kontrollen nach LPS- und LTA-Stimulation nach TNF $\alpha$ -Genotypen G/G und A/G, A/A, <sup>1</sup> Zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test; <sup>2</sup> Werte in pg/ml

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Assoziation des individuellen TNF $\alpha$ -Phänotyps mit der Schwere der humanen Pneumokokkeninfektion gezeigt werden: Patienten mit einem TNF $\alpha$  „high secretor“ Phänotyp (= starke TNF $\alpha$ -Freisetzung nach Antigen-Stimulation) haben häufiger eine schwere Sepsis oder einen septischen Schock, als Patienten mit einem TNF $\alpha$  „low secretor“ Phänotyp (= schwache TNF $\alpha$ -Freisetzung nach Antigen-Stimulation). Es ist bekannt, dass etwa 2/3 des TNF $\alpha$ -Phänotyps (= der interindividuellen Variabilität der TNF $\alpha$ -Produktion) genetisch bedingt sind (Molvig et al. 1988; Westendorp et al. 1997). Der Einfluss des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus auf den Phänotyp ist umstritten. In der vorliegenden Studie fand sich weder bei Patienten mit Pneumokokkeninfektion, noch bei Probanden eine Assoziation zwischen dem TNF $\alpha$ -308-Genotyp und dem TNF $\alpha$ -Phänotyp (Tabellen 14 und 15, Grafiken 9,10).

Die genetische Prädisposition sowohl für die Inzidenz, als auch für den Schweregrad infektiöser Krankheiten ist gut belegt. So konnten Sorensen und Mitarbeiter durch eine fünfzigjährige Longitudinalstudie bei Adoptierten zeigen, dass das relative Risiko, an einer infektiösen Krankheit zu versterben, um den Faktor 5,81 erhöht ist, wenn eines der biologischen Elternteile vor Erreichen des fünfzigsten Lebensjahres an einer infektiösen Erkrankung verstorben war (Sorensen et al. 1988). Auch im Rahmen von Zwillingsstudien wurde nachgewiesen, dass das Risiko, an Tuberkulose, Lepra und Polio zu erkranken, bei monozygoten Zwillingen mehr als doppelt so hoch ist wie bei heterozygoten Zwillingen (Cooke und Hill 2001).

Da Zytokine als Teil der angeborenen Infektabwehr bei Infektionen eine zentrale Rolle besitzen, wird eine genetische Variabilität bezüglich der inflammatorischen Antwort für die Entstehung und den Verlauf infektiöser Erkrankungen diskutiert.

Insbesondere TNF $\alpha$  steht, als wichtiges proinflammatorisches Zytokin, bei der Erforschung der Pathogenese bakterieller Infektionen im Vordergrund. Wie die pulmonale Infektion und Inflammation bei der Pneumonie verläuft, hängt wesentlich vom Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren ab. Eine starke lokale pro-inflammatorische Antwort, getriggert durch TNF $\alpha$ , ist wichtig für die lokale bakterielle Clearance. TNF $\alpha$  wird früh nach spezifischem oder unspezifischem

Antigenkontakt lokal in der Lunge produziert (Dehoux et al. 1994). Während der Pneumonie ist TNF $\alpha$  notwendig für die lokale bakterielle Clearance. Die Neutralisation von TNF $\alpha$  führt in der experimentellen Pneumonie zu einer eingeschränkten bakteriellen Clearance und zu einer erhöhten Mortalität (van der Poll et al. 1997). Auch für andere wichtige Pneumonieerreger (*L. pneumophila*, *K. pneumoniae* und *S. aureus*) konnte nach TNF $\alpha$ -Inhibition eine reduzierte Clearance gezeigt werden (Laichalk et al. 1996; Skerrett et al. 1997).

Eine zu starke proinflammatorische Antwort auf die Infektion führt jedoch zum systemischen „overspill“ von Zytokinen und dem septischen Schock (Bone et al. 1997). Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Zusammenhang zwischen TNF $\alpha$  „high secretor“ Phänotyp und Schwere der Sepsis unterstützt die These, dass eine zu starke TNF $\alpha$ -Antwort während der Pneumonie zu einer systemischen Entzündungsreaktion führt und die Prognose verschlechtert.

Die proinflammatorische Reaktion ist jedoch nicht unabhängig von der antiinflammatorischen Reaktion, speziell der IL-10-Sekretion (IL-10 ist eines der wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine). So wurde gezeigt, dass ein IL-10 „high secretor“ Geno- und Phänotyp auch mit dem Schweregrad der Pneumokokkensepsis korreliert (Schaaf et al. 2003). Zusammengefasst sind somit sowohl zu viel Proinflammation, als auch zu viel Antiinflammation während der bakteriellen Pneumonie mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

Als nächstes stellt sich die Frage, welche genetischen Faktoren für den TNF $\alpha$  „high secretor“ Phänotyp der Pneumokokkenpatienten verantwortlich ist. Es ist bekannt, dass die genetische Prädisposition für den TNF $\alpha$  Phänotyp („high secretor“ versus „low secretor“) etwa 60% ausmacht (Molvig et al. 1988; Westendorp et al. 1997). Wahrscheinlich beeinflussen einzelne Nucleotid-Polymorphismen (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) den Phänotyp. Für das TNF $\alpha$ -Gen sind unterschiedliche SNPs beschrieben. Insbesondere wurden die biallelischen Polymorphismen im TNF $\alpha$ -308-Promotor und dem Lymphotoxin (LT)- $\alpha$ -Gen (ehemals TNF $\beta$ -Intron-1) mit der TNF $\alpha$ -Induzierbarkeit assoziiert (Stuber et al. 1996). Bei dem biallelischen SNP an der Promotorposition -308 handelt es sich jeweils um eine Transition der Purinbasen von Guanin zu Adenin (D'Alfonso und Richiardi 1994; Wilson et al. 1997). Die Base Guanin ist als TNF1-Allel und die Base Adenin als das TNF2-Allel definiert. Andere

Polymorphismen sind an Positionen -1031, -857, -851, -419, -376, -238, -163 und +691 beschrieben (Hajeer und Hutchinson 2000; Herrmann et al. 1998;). In einzelnen Studien wurde bei TNF-A-homozygoten Individuen eine höhere Konzentration von frei zirkulierendem TNF $\alpha$  gemessen (Bouma et al. 1996). Andere Autoren konnten eine erhöhte TNF $\alpha$ -Sekretion nach Vollblutstimulation mit LPS bei heterozygoten Trägern des TNF-A-Allels zeigen (Louis et al. 1998). Ferner konnten mehrere Arbeitsgruppen für das TNF-A-Allel eine vielfach höhere Transkriptionsrate nachweisen (Braun et al. 1996; Kroeger et al. 1997; Wilson et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit findet sich jedoch weder bei Patienten mit Pneumokokkeninfektion noch bei Probanden eine Assoziation zwischen TNF $\alpha$ -Phänotyp und TNF-308-Genotyp. Ferner fanden wir keine Assoziation zwischen den erfassten klinischen und paraklinischen Parametern und dem Genotyp. Andere Arbeitsgruppen sind zu einem ähnlichen Ergebnis gekommen und konnten keine eindeutige Assoziation zwischen TNF $\alpha$ -308-Genotyp und TNF $\alpha$ -Phänotyp zeigen (He et al. 1995; Huizinga et al. 1997; Turner et al. 1995). In einer kürzlich publizierten Arbeit wurde die These, dass der 308-Genotyp mit der TNF $\alpha$ -Induzierbarkeit in Zusammenhang steht, ebenso widerlegt. Die Autoren untersuchten bei 87 gesunden Probanden die TNF $\alpha$ -Konzentrationen im Blut vor und nach Gabe von LPS. Ferner wurde eine Genotypisierung des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus vorgenommen. Die TNF $\alpha$ -Konzentrationen im Blut waren sowohl vor wie auch nach LPS-Injektion zwischen der TNF-A-Allel-positiven und -negativen Gruppe vergleichbar. Auch weitere klinische und paraklinische Entzündungsparameter wie Körpertemperatur, IL-6, Prothrombin und D-Dimere unterschieden sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht (Kovar et al. 2007). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte weder bei Patienten noch bei Probanden eine Korrelation zwischen dem „angeborenen“ Phänotyp und dem untersuchten SNP beobachtet werden.

Werden die aktuellen und unsere Daten zusammenfasst, scheint der 308-Genotyp keinen Einfluss auf den TNF $\alpha$ -Sekretion zu haben.

Die nächste Frage ist, ob ein Zusammenhang zwischen TNF $\alpha$ -308-Genotyp und Pneumokokkeninfektion besteht. Wir fanden keinen Unterschied zwischen Probanden und Patienten mit Pneumokokkeninfektion (Tabelle 8, Grafik 5). Dies entspricht den Daten zu anderen Infektionen, z.B. der Sepsis, in denen ebenfalls kein Einfluß auf die

Häufigkeit einer Infektion gesehen wurde (Stuber et al. 1995). Der untersuchte Polymorphismus scheint daher keinen Einfluss auf die Inzidenz der Pneumokokkeninfektion zu haben. Ähnliche Daten wurden auch für die Tuberkulose gezeigt (Goldfeld et al. 1998). Für andere Infektionen ist hingegen eine erhöhte Inzidenz in Bezug auf den TNF $\alpha$ -308-Genotyp gezeigt. Die Chance, an lepromatöser Lepra zu erkranken, scheint bei TNF-A-Allelträgern um den Faktor 3,3 erhöht zu sein (Roy et al. 1997). Ebenso scheint das Risiko, an einem Trachom zu erkranken, bei heterozygoten und homozygoten TNF-A-Allelträgern signifikant erhöht zu sein.

Wenn kein eindeutiger Einfluss auf die Inzidenz der Pneumokokkeninfektion besteht, könnte der TNF $\alpha$ -Genotyp dennoch einen Einfluss auf den Schweregrad der Infektion haben. Bei Patienten mit bakterieller Sepsis (verschiedene Erreger) konnte entsprechend eine Assoziation des TNF-A-Allels (vermutlich TNF $\alpha$  „high secretor“) mit dem Auftreten der schweren Sepsis und einer erhöhten Letalität assoziiert werden (Mira et al. 1999). In einer Studie mit 112 Patienten mit postoperativer Sepsis wurde zwar keine Assoziation für das TNF-A-Allel und die Entwicklung des septischen Schocks gefunden, das TNF-A-Allel war jedoch mit letalem Ausgang assoziiert (Tang et al. 2000b). Calvano wiederum konnte keine der Daten in seinem Kollektiv mit postoperativer Sepsis reproduzieren (Calvano et al. 2003). Weiterhin untersuchten Jessen und Mitarbeiter die Rolle des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus bei 319 Patienten mit gram-negativer Sepsis. Weder für den Schweregrad der Sepsis noch für die Letalität wurde eine Assoziation zum untersuchten Polymorphismus gefunden (Jessen et al. 2007). In einer Studie aus Norddeutschland mit ausschließlich Deutschen, die aus einem engen geographischen Areal stammten und matched-pair-Kontrollen, welche unserem Studiendesign und –kollektiv ähnelt, fand sich ebenfalls keine Assoziation für die Entstehung und den Verlauf der Sepsis für den TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus. In dieser Arbeit unterschieden sich die Serumkonzentrationen zwischen dem Kontroll- und Patientenkollektiv nach LPS-Stimulation nicht, was unsere Ergebnisse unterstützt (Stuber et al. 1995).

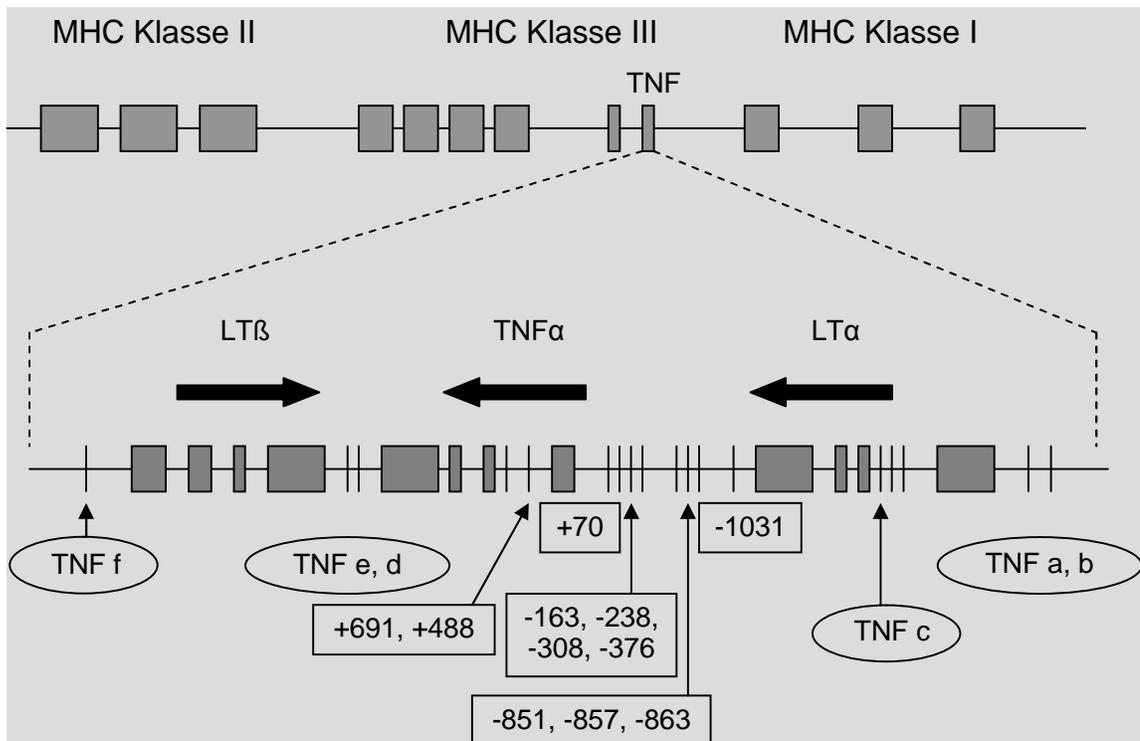
Bei Kindern mit Meningokokkeninfektion konnte hingegen eine Assoziation zwischen dem TNF-A-Allel und dem Schweregrad der Erkrankung und der Letalität gezeigt werden (Nadel et al. 1996). In einer anderen Studie an Familienangehörigen von Patienten mit Meningokokkeninfektion konnte hingegen keine Assoziation für den

TNF $\alpha$ -308-Genotyp gezeigt werden (Westendorp et al. 1997). Für andere Infektionen finden sich sowohl positive als auch negative Assoziationen zu dem 308-Genotyp: Helicobacter-pylori-assoziierte Magen- und Duodenalulcera (Garcia-Gonzalez et al. 2005; Zambon et al. 2005); Malaria, Hepatitis B und HIV (Brinkman et al. 1997; Du et al. 2006; Hohler et al. 1998; Quasney et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit fanden wir keinen Einfluß des 308-Genotyp auf die Inzidenz oder die Schwere der Pneumokokkeninfektion.

Wie können die diskrepanten Ergebnisse in den verschiedenen Studien in Bezug auf den Einfluss des Genotyps auf die TNF $\alpha$ -Sekretion zum einen und auf die Inzidenz und Schwere von Infektionserkrankungen zum anderen erklärt werden? Laut einer Metaanalyse anhand von etwa 600 Studien, die eine Assoziation von Genpolymorphismen zu Krankheiten untersuchten, konnten lediglich 4% der mutmaßlichen Assoziationen reproduziert werden (Hirschhorn et al. 2002). Ein wesentlicher Punkt liegt in dem unterschiedlichen Studiendesign und der untersuchten Studienpopulation. Im Gegensatz zu vielen anderen Studien mit Sepsis durch verschiedene Keime, wurden in unserer Studie nur Patienten mit definierter Pneumokokkeninfektion untersucht. Die Rolle von TNF $\alpha$  für die angeborene Infektabwehr kann bei den verschiedenen Erregern unterschiedlich sein. Ein weiterer wesentlicher Punkt ist das sogenannte Linkage disequilibrium. Das Gen für TNF $\alpha$  befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 6, ist etwa 3 Kilobasen (kb) lang und besitzt vier Exons, wobei 80% der Proteinsequenz durch das vierte Exon kodiert werden (Nedwin et al. 1985). Die kodierende Sequenz befindet sich zwischen den MHC Klasse I und II Loci. Nachdem bereits Spies 1986 nachgewiesen hatte, dass das TNF $\alpha$ -Gen mit den MHC-Klassen gekoppelt ist, wurde ein Jahr später nachgewiesen, dass 850 kb Zentromer die MHC Klasse II und 250 Basen Telomer die MHC Klasse I lokalisiert ist (Carroll et al. 1987; Spies et al. 1986). Es ist daher möglich, dass gemessene TNF $\alpha$ -Polymorphismen nicht kausal mit der Schwere der Sepsis assoziiert sind, sondern nur eine Markermutation für andere Polymorphismen, wie z.B. MHC-Polymorphismen, darstellen. Das Linkage disequilibrium, auch als Kopplungsgleichgewicht bezeichnet, beschreibt die überzufällig häufige Verbindung eines Allels mit einem anderen Allel oder einem anderen Phänotyp. Beispielsweise besteht eine starke Assoziation im Sinne eines LD zwischen dem TNF-A-Allel und der HLA-DR3. Bouma und Mitarbeiter beschreiben in ihrer Arbeit aus dem Jahre 1996 eine

von der HLA-DR3-unabhängige erhöhte TNF $\alpha$ -Produktion nach Stimulation von Vollblut bei TNF-A-Allelträgern mit entzündlicher Darmerkrankung (Bouma et al. 1996). Andere Arbeitsgruppen konnten dieses Ergebnis bei anderen Erkrankungen jedoch nicht reproduzieren (Turner et al. 1995; Westendorp et al. 1997). Ferner ist bekannt, dass die HLA-Klassen DR1, DR4 und DR7 mit einer erhöhten TNF $\alpha$ -Produktion vergesellschaftet sind. Im Gegensatz dazu ist für die HLA-Klassen DR2 und DR5 eine verminderte TNF $\alpha$ -Produktion beschrieben (Bendtsen et al. 1988; Jacob et al. 1990; Pociot et al. 1993). Des Weiteren ist eine Gruppe von 5 Mikrosatelliten-Markern auf dem TNF-Gen beschrieben, welche jeweils eine unterschiedliche Anzahl von Allelen besitzen. Es besteht ein LD zwischen den alphabetisch nummerierten Mikrosatelliten-Markern (TNFa bis TNFe) und den HLA-Genen. Im Rahmen mehrerer Untersuchungen wurde die Rolle der Mikrosatelliten-Marker auf die TNF $\alpha$ -Produktion untersucht. Auch hier konnte ein LD zwischen der TNF $\alpha$ -Produktion und den Mikrosatelliten-Markern gezeigt werden. So induzieren die Mikrosatelliten-Marker TNFa2, b1 und c1 ebenfalls eine erhöhte TNF $\alpha$ -Produktion (Pociot et al. 1993). Hier sind starke Variationen zwischen einzelnen ethnischen Gruppen beschrieben (Abb. 11).



**Abbildung 11:** TNF-Komplex auf Chromosom 6. Die Lokalisation der Mikrosatelliten-Marker a – e (Ovale) und Einzelbasenpolymorphismen (Rechtecke) sind schematisch dargestellt. Legende: | Polymorphismen, → Transkriptionsrichtung, □ Exon; (adaptiert nach Haajer und Hutchisson)

Dieses komplexe Zusammenspiel bei der TNF $\alpha$ -Produktion verdeutlicht, dass in Zukunft definiertere Modelle notwendig sein werden, damit eine sichere Aussage bezüglich der genetischen Determinante, die für den angeborenen „high secretor“ Phänotyp verantwortlich ist, gemacht werden kann.

Das wesentliche Ergebnis der Arbeit ist daher, dass der gemessene TNF $\alpha$ -308-Polymorphismus wahrscheinlich keinen Einfluss auf die TNF $\alpha$ -Produktion hat, dass aber Patienten mit einem TNF $\alpha$  „high secretor“ Phänotyp einen schlechteren Verlauf haben.

Warum ist eine starke TNF $\alpha$ -Reaktion bei Pneumokokkeninfektion möglicherweise schädlich? Für die initiale Antwort auf Pneumokokkeninfektionen ist TNF $\alpha$  essentiell: In Tiermodellen mit TNF $\alpha$ -Antikörper (TNF $\alpha$ -AK) vorbehandelten Mäusen sowie gendefizientem TNF-Rezeptor-Typ-I mit induzierter Pneumokokkeninfektion wurden im Vergleich zu Kontrollmäusen neben erhöhter Bakterienlast insbesondere progredientere Krankheitsverläufe mit letalem Ausgang beobachtet (Kerr et al. 2002; Takashima et al. 1997). In anderen Studien mit vergleichbarem Versuchsmodell wurden ähnliche Ergebnisse bei peritonealen und intrakraniellen Pneumokokkeninfektionen berichtet (Wellmer et al. 2001).

Die Versuche an Knockout Mäusen entsprechen allerdings nicht der humanen Situation. Patienten unterscheiden sich in „low“ und „high secretor“ Phänotypen, ein kompletter TNF-Knockout kommt nicht vor. Initial ist eine TNF $\alpha$ -Antwort für die bakterielle Clearance in der Lunge notwendig, eine überschießende TNF $\alpha$ -Produktion im Verlauf der Infektion fördert die septische Inflammationsreaktion. TNF $\alpha$  führt zur zunehmenden endothelialen Dysfunktion mit erhöhter Gefäßpermeabilität und Thrombozytenaggregation. Die konsekutive Aktivierung des Gerinnungssystems induziert eine Störung der Mikrozirkulation und endet in Organdysfunktion und Organversagen (Bone 1996). Das klinische Bild des septischen Schocks zeigt sich auch im *in vivo* Experiment bei intravenöser Gabe von TNF $\alpha$  (Tracey et al. 1988). Zudem zeigt sich bei Patienten eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Pneumonie und den systemischen TNF $\alpha$ -Spiegeln (Bauer et al. 2000). Pinsky et al fanden erhöhte TNF $\alpha$ -Spiegel bei Pneumoniepatienten mit schweren septischen Verläufen (Pinsky et al. 1993).

Interessanterweise fanden wir nur für den TNF $\alpha$ -Phänotyp nach LPS-Stimulation signifikante Ergebnisse. Die *in vitro* Vollblutstimulation mit LTA erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne schwere Sepsis. In diesem

Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation peripherer Monozyten mit LTA die TNF $\alpha$ -Produktion induzieren kann (Lindemann et al. 1988). Andere Autoren zeigen jedoch, dass LPS hundert- bis tausendfach stärker als LTA die TNF $\alpha$ -Produktion induziert (Mattsson et al. 1993). Daher ist anzunehmen, dass LTA keine ausreichende Stimulation zur TNF $\alpha$ -Produktion darstellt.

Neben genetischen Einflussgrößen existieren weitere wichtige Faktoren, die den Krankheitsverlauf nachhaltig bestimmen. Garnacho-Montero und Mitarbeiter untersuchten bei Patienten mit nachgewiesener Sepsis neben dem TNF $\alpha$ -Promotorpolymorphismus, weitere SNPs wie den IL-10-Promotorpolymorphismus sowie den Zeitpunkt und die adäquate Antibiotikatherapie. Nach multivariater Analyse fanden sich lediglich der APACHE-II-Score und die verspätete oder inadäquate antibiotische Therapie als unabhängige Faktoren für die Letalität (Garnacho-Montero et al. 2006). Auch bakterielle Faktoren beeinflussen den Verlauf der Infektion. Beispielsweise ist der Serotyp 6B mit lokalen, auf die Lunge begrenzten, nicht letal verlaufenden Infektionen, der Serotyp 3 mit disseminierten, letalen Erkrankungen assoziiert. Experimente bei TNF Knockoutmäusen mit dem Serotyp 6B zeigen keine Unterschiede in der lokalen Inflammation und der bakteriellen Clearance trotz Fehlens von TNF $\alpha$ . Diese Ergebnisse legen nahe, dass TNF $\alpha$  im Rahmen der pulmonalen Antistreptokokken-Antwort auf andere Zytokine angewiesen ist. Beim selben Versuchsmodell mit dem Serotyp 3 zeigt sich allerdings, dass TNF $\alpha$  für die systemische Immunantwort unerlässlich ist (Kirby et al. 2005).

Die kontroversen Ergebnisse der in den letzten Jahren publizierten Studien sind sowohl Indizien der komplexen Funktionsweise des TNF $\alpha$  in schweren infektiösen Erkrankungen und der Sepsis wie auch für deren hoch komplizierte Modifikationsvarianten auf genetischer Ebene. Einzig die These, dass eine überschießende und ungehemmte proinflammatorische Entzündungsreaktion mit einem negativen Outcome einhergeht, gilt als erwiesen. Diese konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Assoziation einer schweren Sepsis mit dem TNF $\alpha$ -„high secretor“-Phänotyp bestätigt werden. Unsere Daten sprechen jedoch gegen einen Einfluss des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus auf den TNF $\alpha$ -Phänotyp und auf den Verlauf von Pneumokokkeninfektionen.

## 7 Zusammenfassung

Diese Arbeit analysiert anhand einer Assoziationsstudie die Rolle des angeborenen TNF $\alpha$ -Phänotyps bezüglich des Schweregrads der systemischen Pneumokokken-erkrankung. Weiterhin wurden der Einfluss des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus auf den Phänotyp und ein möglicher Zusammenhang mit der Inzidenz und dem Schweregrad der Infektion untersucht.

TNF $\alpha$  besitzt im Rahmen bakterieller Infektionen eine zentrale Rolle und initiiert eine proinflammatorische Entzündungskaskade. Diese für die bakterielle Clearance unerlässliche Funktion verhindert damit auch den disseminierten Krankheitsverlauf. Auf der anderen Seite kann die überschießende TNF $\alpha$ -Produktion zu Organdysfunktion und Organversagen sowie schweren septischen Verläufen führen. Für den biallelischen Polymorphismus in der TNF $\alpha$ -308-Promotorregion wird eine erhöhte TNF $\alpha$ -Induzierbarkeit diskutiert.

In der vorliegenden Studie wurden 69 Patienten mit einer invasiven Pneumokokkeninfektion und 50 in Alter und Geschlecht angepasste Probanden phäno- und genotypisch untersucht. Aus zellfreiem Überstand nach Vollblutstimulation mit LPS wurde mittels ELISA die Phänotypisierung der Patienten nach Rekonvaleszenz von der Erkrankung vorgenommen. Die Genotypisierung des TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus wurde mittels Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Von den 69 Patienten entwickelten 23 Patienten laut standardisierter Kriterien eine schwere Sepsis oder einen septischen Schock. Die Bestimmung des angeborenen Phänotyps dieser Patienten ergab eine statistisch hochsignifikant vermehrte TNF $\alpha$ -Produktion im Vergleich zum Restkollektiv. Hingegen fand sich keine Assoziation zwischen dem Phänotyp und dem TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus. Weiterhin wurde der TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus als mögliche Ursache für die Inzidenz oder den Verlauf der systemischen Pneumokokkeninfektion ausgeschlossen.

Unsere Daten unterstützen somit die These, dass eine genetisch präterminierte, vermehrte TNF $\alpha$ -Produktion mit progredienterem Krankheitsverlauf assoziiert ist. Während der TNF $\alpha$ -308-Promotorpolymorphismus als Ursache ausgeschlossen werden kann, bleibt die Frage, welche genetische Determinante für die vermehrte TNF $\alpha$ -Produktion verantwortlich ist, Gegenstand der Diskussion.

## 8 Literaturverzeichnis

Aggarwal, B. B. "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." *Nat.Rev.Immunol.* 2003;3(9):745-56.

Aggarwal, B. B., W. J. Kohr, P. E. Hass, B. Moffat, S. A. Spencer, W. J. Henzel, T. S. Bringman, G. E. Nedwin, D. V. Goeddel, and R. N. Harkins. "Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization." *J.Biol.Chem.* 1985; 260(4):2345-54.

Austrian, R. "Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention." *Rev.Infect.Dis.* 1981;3 Suppl:1-17.

Austrian, R. "The pneumococcus at the millennium: not down, not out." *J.Infect.Dis.* 1999;179 Suppl 2:338-41.

Bartlett, John G. and Linda M. Mundy. "Community-Acquired Pneumonia." *The New England Journal of Medicine* 1995;333(24):1618-24.

Bauer, T. "CAPNETZ: Competence network for community acquired pneumonia in Germany." *Pneumologie* 2006;60(2):111-3.

Bauer, T. T., C. Monton, A. Torres, H. Cabello, X. Fillela, A. Maldonado, J. M. Nicolas, and E. Zavala. "Comparison of systemic cytokine levels in patients with acute respiratory distress syndrome, severe pneumonia, and controls." *Thorax* 2000;55(1):46-52.

Bendtsen, K., N. Morling, A. Fomsgaard, M. Svenson, B. Jakobsen, N. Odum, and A. Svejgaard. "Association between HLA-DR2 and production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide." *Scand.J.Immunol.* 1998;28(5):599-606.

Bermppohl, D., A. Halle, D. Freyer, E. Dagand, J. S. Braun, I. Bechmann, N. W. Schroder, and J. R. Weber. "Bacterial programmed cell death of cerebral endothelial cells involves dual death pathways." *J.Clin.Invest* 2006;115(6):1607-15.

Beutler, B., D. Greenwald, J. D. Hulmes, M. Chang, Y. C. Pan, J. Mathison, R. Ulevitch, and A. Cerami. "Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin." *Nature* 1985;316(6028):552-4.

Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, and D. P. Cerretti. "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." *Nature* 1997;385(6618):729-33.

Bogaert, D., M. N. Engelen, A. J. Timmers-Reker, K. P. Elzenaar, P. G. Peerbooms, R. A. Coutinho, Groot R. de, and P. W. Hermans. "Pneumococcal carriage in children in The Netherlands: a molecular epidemiological study." *J.Clin.Microbiol.* 2001;39(9):3316-20.

Bone, R. C. "The pathogenesis of sepsis." *Ann.Intern.Med* 1991;115(6):457-69.

Bone, R. C. "Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS)." *Ann.Intern.Med* 1996;125(8):680-7.

Bone, R. C., R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein, and W. J. Sibbald. "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." *Chest* 1992;101(6):1644-55.

Bone, R. C., C. J. Grodzin, and R. A. Balk. "Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process." *Chest* 1997;112(1):235-43.

Bouma, G., J. B. Crusius, Pool M. Oudkerk, J. J. Kolkman, B. M. von Blomberg, P. J. Kostense, M. J. Giphart, G. M. Schreuder, S. G. Meuwissen, and A. S. Pena. "Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease." *Scand.J.Immunol.* 1996;43(4):456-63.

Braun, J. S., R. Novak, P. J. Murray, C. M. Eischen, S. A. Susin, G. Kroemer, A. Halle, J. R. Weber, E. I. Tuomanen, and J. L. Cleveland. "Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus." *J.Infect.Dis.* 2001;43(4):456-63.

Braun, N., U. Michel, B. P. Ernst, R. Metzner, A. Bitsch, F. Weber, and P. Rieckmann. "Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF-alpha production." *Neurosci.Lett.* 1996;215(2):75-8.

Brinkman, B. M., I. P. Keet, F. Miedema, C. L. Verweij, and M. R. Klein. "Polymorphisms within the human tumor necrosis factor-alpha promoter region in human immunodeficiency virus type 1-seropositive persons." *J.Infect.Dis.* 1997;175(1):188-90.

Brockhaus, M., H. J. Schoenfeld, E. J. Schlaeger, W. Hunziker, W. Lesslauer, and H. Loetscher. "Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies." *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1990;87(8):3127-31.

Bruyn, G. A. and B. J. Zegers. "Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*." *Clin.Infect.Dis.* 1992;14(1):251-62

Calvano, J. E., J. Y. Um, D. M. Agnese, S. J. Hahm, A. Kumar, S. M. Coyle, S. E. Calvano, and S. F. Lowry. "Influence of the TNF-alpha and TNF-beta polymorphisms upon infectious risk and outcome in surgical intensive care patients." *Surg.Infect.(Larchmt.)* 2003;4(2):163-9

Carroll, M. C., P. Katzman, E. M. Alicot, B. H. Koller, D. E. Geraghty, H. T. Orr, J. L. Strominger, and T. Spies. "Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes." *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1987;84(23):8535-9.

Carswell, E. A., L. J. Old, Kassel R.L., S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72(9):3666-70.

Coles, C. L., R. Kanungo, L. Rahmathullah, R. D. Thulasiraj, J. Katz, M. Santosham, and J. M. Tielsch. "Pneumococcal nasopharyngeal colonization in young South Indian infants." *Pediatr.Infect.Dis.J.* 2001;20(3):289-95.

Coley, W. B. "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of Erysipeals: with a report of ten original cases. 1893" *Clin Orthop Relat Res.* 1991;262:3-11.

Cooke, G. S. and A. V. Hill. "Genetics of susceptibility to human infectious disease." *Nat.Rev.Genet.* 2001 2(12):967-77.

Coonrod, J. D. "The role of extracellular bactericidal factors in pulmonary host defense." *Semin.Respir.Infect.* 1986;1(2):118-29.

D'Alfonso, S. and P. M. Richiardi. "A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region." *Immunogenetics* 1994;39(2):150-4.

De Gans, J. and D. van de Beek. "Dexamethasone in adults with bacterial meningitis." *N.Engl.J.Med.* 2002;347(20):1549-56.

De Groote D., P. F. Zangerle, Y. Gevaert, M. F. Fassotte, Y. Beguin, F. Noizat-Pirenne, J. Pirenne, R. Gathy, M. Lopez, I. Dehart et al. "Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation." *Cytokine* 1992 May;4(3):239-48.

Dehoux, M. S., A. Boutten, J. Ostinelli, N. Seta, M. C. Dombret, B. Crestani, M. Deschenes, J. L. Trouillet, and M. Aubier. "Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia." *Am J.Respir.Crit Care Med* 1994;150(3):710-6.

Du, T., X. H. Guo, X. L. Zhu, J. H. Li, L. P. Lu, J. R. Gao, C. Y. Gou, Z. Li, Y. Liu, and H. Li. 2006. "Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population." *J.Viral Hepat.* 2006;13(9):618-24.

El Ahmer, O. R., S. D. Essery, A. T. Saadi, M. W. Raza, M. M. Ogilvie, D. M. Weir, and C. C. Blackwell. "The effect of cigarette smoke on adherence of respiratory pathogens to buccal epithelial cells." *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 1999;23(1):27-36.

Ewig, S. and A. Torres. "Severe community-acquired pneumococcal pneumonia - what might be done better." *Intensive Care Med.* 1999;25(2):143-5.

Feldman, C., R. Read, A. Rutman, P. K. Jeffery, A. Brain, V. Lund, T. J. Mitchell, P. W. Andrew, G. J. Boulnois, H. C. Todd, et al. "The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with intact human respiratory mucosa in vitro." *Eur.Respir.J.* 1992;5(5):576-83.

Garcia-Gonzalez, M. A., P. H. Savelkoul, R. Benito, S. Santolaria, J. B. Crusius, A. S. Pena, and A. Lanas. "No allelic variant associations of the IL-1 and TNF gene polymorphisms in the susceptibility to duodenal ulcer disease." *Int.J.Immunogenet.* 2005;32(5):299-306.

Garnacho-Montero, J., T. bo-Pallas, C. Garnacho-Montero, A. Cayuela, R. Jimenez, S. Barroso, and C. Ortiz-Leyba. "Timing of adequate antibiotic therapy is a greater determinant of outcome than are TNF and IL-10 polymorphisms in patients with sepsis." *Crit Care* 2006;10(4):R111..

Geiser, T. "Inflammatory cytokines and chemokines in acute inflammatory disease." *Schweiz.Med Wochenschr.* 1999;129(14):540-6.

Ghaffar, F., I. R. Friedland, and G. H. McCracken, Jr. "Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*." *Pediatr.Infect.Dis.J.* 1999;18(7):638-46.

Goldfeld, A. E., J. C. Delgado, S. Thim, M. V. Bozon, A. M. Ugliarolo, D. Turbay, C. Cohen, and E. J. Yunis. "Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis." *JAMA* 1998 Jan 21;279(3):226-8.

Goodman, R. B., R. M. Strieter, D. P. Martin, K. P. Steinberg, J. A. Milberg, R. J. Maunder, S. L. Kunkel, A. Walz, L. D. Hudson, and T. R. Martin. "Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome." *Am J.Respir.Crit Care Med* 1996;154(3Pt1):602-11.

Gray, B. M. and H. C. Dillon, Jr. "Clinical and epidemiologic studies of pneumococcal infection in children." *Pediatr.Infect.Dis.* 1986;5(2):201-7.

Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Lohden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. "The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor." *Cell* 1995;83(5):793-802.

Hajeer, A. H. and I. V. Hutchinson. "TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications." *Microsc.Res.Tech.* 2000;50(3):216-28.

He, B., V. Navikas, J. Lundahl, M. Soderstrom, and J. Hillert. "Tumor necrosis factor alpha-308 alleles in multiple sclerosis and optic neuritis." *J.Neuroimmunol.* 1995; 63(2):143-7.

Heffron R. Pneumonia: with special reference to pneumococcus lobar pneumonia. A Commonwealth Fund book. Cambridge, MA: The Commonwealth Fund; 1939, reprinted by Harvard University Press 1979.

Hermann, D. M., J. Mullington, D. Hinze-Selch, W. Schreiber, C. Galanos, and T. Pollmacher. "Endotoxin-induced changes in sleep and sleepiness during the day." *Psychoneuroendocrinology* 1998;23(5):427-37.

Herrmann, S. M., S. Ricard, V. Nicaud, C. Mallet, D. Arveiler, A. Evans, J. B. Ruidavets, G. Luc, L. Bara, H. J. Parra, O. Poirier, and F. Cambien. "Polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity." *Eur.J.Clin.Invest* 1998;28(1):59-66.

Hiratsuka, T., M. Nakazato, Y. Date, J. Ashitani, T. Minematsu, N. Chino, and S. Matsukura. "Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia." *Biochem.Biophys.Res.Commun.*1998;249(3):943-7

Hirschhorn, J. N., K. Lohmueller, E. Byrne, and K. Hirschhorn. "A comprehensive review of genetic association studies." *Genet.Med.* 2002;4(2):45-61.

Hohler, T., A. Kruger, G. Gerken, P. M. Schneider, K. H. Meyer zum Buschenefelde, and C. Rittner. "A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection." *Clin.Exp.Immunol.* 1998;111(3):579-82.

Huizinga, T. W., R. G. Westendorp, E. L. Bollen, V. Keijsers, B. M. Brinkman, J. A. Langermans, F. C. Breedveld, C. L. Verweij, Gaer L. van de, L. Dams, J. B. Crusius, A. Garcia-Gonzalez, B. W. van Oosten, C. H. Polman, and A. S. Pena. "TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients." *J.Neuroimmunol.* 1997;72(2):149-53.

Idriss, H. T. and J. H. Naismith. "TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)." *Microsc.Res.Tech.* 2000;50(3):184-95.

Imler, J. L. and J. A. Hoffmann. "Toll receptors in innate immunity." *Trends Cell Biol.* 2001;11(7):304-11.

Jacob, C. O., Z. Fronck, G. D. Lewis, M. Koo, J. A. Hansen, and H. O. McDevitt. "Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus." *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1990;87(3):1233-7.

Jacobs, R. F. and D. R. Tabor. "Immune cellular interactions during sepsis and septic injury." *Crit Care Clin.* 1989;5(1):9-26.

Jessen, K. M., S. B. Lindboe, A. L. Petersen, J. Eugen-Olsen, and T. Benfield. "Common TNF-alpha, IL-1 beta, PAI-1, uPA, CD14 and TLR4 polymorphisms are not associated with disease severity or outcome from Gram negative sepsis." *BMC.Infect.Dis.* 2007;18:108.

Kauppinen, M. T., E. Herva, P. Kujala, M. Leinonen, P. Saikku, and H. Syrjala. "The etiology of community-acquired pneumonia among hospitalized patients during a Chlamydia pneumoniae epidemic in Finland." *J Infect.Dis.* 1995;172(5):1330-5.

Kerr, A. R., J. J. Irvine, J. J. Search, N. A. Gingles, A. Kadioglu, P. W. Andrew, W. L. McPheat, C. G. Booth, and T. J. Mitchell. "Role of inflammatory mediators in resistance and susceptibility to pneumococcal infection." *Infect.Immun.* 2002;70(3):1547-57

King, L. S. "Dr. Koch's Postulate." *J.Hist.Med.Allied.Sci* 1957;7:350-361

Kirby, A. C., J. G. Raynes, and P. M. Kaye. "The role played by tumor necrosis factor during localized and systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*." *J.Infect.Dis.* 2005;191(9):1538-47.

Koedel, U., W. M. Scheld, and H. W. Pfister. "Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis." *Lancet Infect.Dis.* 2002;2(12):721-36.

Koivula, I., M. Sten, and P. H. Makela. "Risk factors for pneumonia in the elderly." *Am.J Med.* 1994;96(4):313-20.

Kovar, F. M., C. Marsik, T. Cvitko, O. F. Wagner, B. Jilma, and G. Endler. "The tumor necrosis factor alpha -308 G/A polymorphism does not influence inflammation and coagulation response in human endotoxemia." *Shock* 2007;27(3):238-41.

Kragsbjerg, P., J. Kallman, and P. Olcen. "Pneumococcal meningitis in adults." *Scand.J.Infect.Dis.* 1994;26(6):659-66.

Kroeger, K. M., K. S. Carville, and L. J. Abraham. "The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription." *Mol.Immunol.* 1997; 34(5):391-9.

Laichalk, L. L., S. L. Kunkel, R. M. Strieter, J. M. Danforth, M. B. Bailie, and T. J. Standiford. "Tumor necrosis factor mediates lung antibacterial host defense in murine *Klebsiella pneumoniae*." *Infect.Immun.* 1996;64(12):5211-8.

ley S.G. Zur Impfung gegen Pneumokokken-Infektionen. *Epidemiologisches Bulletin* 2000; 97-98.

Lindemann, R. A., J. S. Economou, and H. Rothermel. "Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides." *J.Dent.Res.* 1988;67(8):1131-5

Lipsky, B. A., E. J. Boyko, T. S. Inui, and T. D. Koepsell. "Risk factors for acquiring pneumococcal infections." *Arch.Intern.Med* 1986;146(11):2179-85.

Long, N. C., A. Morimoto, T. Nakamori, and N. Murakami. "Systemic injection of TNF-alpha attenuates fever due to IL-1 beta and LPS in rats." *Am J.Physiol.* 1992; 263:987-91.

Louis, E., D. Franchimont, A. Piron, Y. Gevaert, N. Schaaf-Lafontaine, S. Roland, P. Mahieu, M. Malaise, Groote D. De, R. Louis, and J. Belaiche. "Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans." *Clin.Exp.Immunol.* 1998; 113(3):401-6.

MacEwan, D. J. "TNF ligands and receptors--a matter of life and death." *Br.J.Pharmacol.* 2002;135(4):855-75.

Marfin, A. A., J. Sporrer, P. S. Moore, and A. D. Siefkin. "Risk factors for adverse outcome in persons with pneumococcal pneumonia." *Chest* 1995;107(2):457-62.

Marrie, T. J. "Community-acquired pneumonia in the elderly." *Clin.Infect.Dis.* 2000; 31(4):1066-78.

Matthay, M. A. "Function of the alveolar epithelial barrier under pathologic conditions." *Chest* 1994;105(Suppl.3):67-74.

Mattsson, E., L. Verhage, J. Rollof, A. Fler, J. Verhoef, and Dijk H. van. "Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6." *FEMS Immunol.Med Microbiol.* 1993;7(3):281-7.

Meduri, G. U., S. Headley, G. Kohler, F. Stentz, E. Tolley, R. Umberger, and K. Leeper. "Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time." *Chest* 1995;107(4):1062-73

Metlay, J. P., R. Schulz, Y. H. Li, D. E. Singer, T. J. Marrie, C. M. Coley, L. J. Hough, D. S. Obrosky, W. N. Kapoor, and M. J. Fine. "Influence of age on symptoms at presentation in patients with community-acquired pneumonia." *Arch.Intern.Med.* 1997; 157(13):1453-9.

Michie, H. R., K. R. Manogue, D. R. Spriggs, A. Revhaug, S. O'Dwyer, C. A. Dinarello, A. Cerami, S. M. Wolff, and D. W. Wilmore. "Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration." *N.Engl.J.Med* 1988;318(23):1481-6.

Mira, J. P., A. Cariou, F. Grall, C. Delclaux, M. R. Losser, F. Heshmati, C. Cheval, M. Monchi, J. L. Teboul, F. Riche, G. Leleu, L. Arbibe, A. Mignon, M. Delpech, and J. F. Dhainaut. "Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study." *JAMA* 1999;282(6):561-8.

Mitchell, T. J. "Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*." *Res.Microbiol.* 2000;151(6):413-9.

Mitchell, T. J. and P. W. Andrew. "Biological properties of pneumolysin." *Microb.Drug Resist.* 1997;3(1):19-26.

Molvig, J., L. Baek, P. Christensen, K. R. Manogue, H. Vlassara, P. Platz, L. S. Nielsen, A. Svejgaard, and J. Nerup. "Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumour necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences." *Scand.J.Immunol.* 1988;27(6):705-16

Mufson, M. A. 1981. "Pneumococcal infections." *JAMA* 1981;246(17):1942-8.

Nadel, S., M. J. Newport, R. Booy, and M. Levin. "Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease." *J.Infect.Dis.* 1996;174(4):878-80.

Nedwin, G. E., S. L. Naylor, A. Y. Sakaguchi, D. Smith, J. Jarrett-Nedwin, D. Pennica, D. V. Goeddel, and P. W. Gray. "Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization." *Nucleic Acids Res.* 1985; 13(17):6361-73.

Neugebauer, E., S. Dimmeler, and H. Troidl. "Mediator systems and infection." *Chirurg* 1995;66(1):2-10.

Ozaki, T., M. Maeda, H. Hayashi, Y. Nakamura, H. Moriguchi, T. Kamei, S. Yasuoka, and T. Ogura. "Role of alveolar macrophages in the neutrophil-dependent defense

system against *Pseudomonas aeruginosa* infection in the lower respiratory tract. Amplifying effect of muramyl dipeptide analog." *Am Rev.Respir.Dis.* 1989; 140(6):1595-601.

Papavassiliou, A. G. "Molecular medicine. Transcription factors." *N.Engl.J.Med* 1995; 332(1):45-7.

Pericone, C. D., K. Overweg, P. W. Hermans, and J. N. Weiser. "Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract." 2000;68(7):3990-7.

Pinsky, M. R., J. L. Vincent, J. Deviere, M. Alegre, R. J. Kahn, and E. Dupont. "Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality." *Chest* 1993;103(2):565-75.

Platzer, C., C. Meisel, K. Vogt, M. Platzer, and H. D. Volk. "Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs." *Int.Immunol.* 1995;7(4):517-23.

Pociot, F., L. Briant, C. V. Jongeneel, J. Molvig, H. Worsaae, M. Abbal, M. Thomsen, J. Nerup, and A. Cambon-Thomsen. "Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus." *Eur.J.Immunol.* 1993;23(1):224-31.

Porath, A., F. Schlaeffer, and D. Lieberman. "The epidemiology of community-acquired pneumonia among hospitalized adults." *J Infect.* 1997;34(1):41-8.

Porteu, F. and C. Hieblot. "Tumor necrosis factor induces a selective shedding of its p75 receptor from human neutrophils." *J.Biol.Chem.* 1994;269(4):2834-40.

Price, S. R., T. Olivecrona, and P. H. Pekala. "Regulation of lipoprotein lipase synthesis by recombinant tumor necrosis factor--the primary regulatory role of the hormone in 3T3-L1 adipocytes." *Arch.Biochem.Biophys.* 1986;251(2):738-46.

Quasney, M. W., Q. Zhang, S. Sargent, M. Mynatt, J. Glass, and J. McArthur. "Increased frequency of the tumor necrosis factor-alpha-308 A allele in adults with human immunodeficiency virus dementia." *Ann.Neurol.* 2001;50(2):157-62.

Randow, F., U. Syrbe, C. Meisel, D. Krausch, H. Zuckermann, C. Platzer, and H. D. Volk. "Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta." *J.Exp.Med* 1999;181(5):1887-92..

Rosenow, C., P. Ryan, J. N. Weiser, S. Johnson, P. Fontan, A. Ortqvist, and H. R. Masure. "Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*." *Mol.Microbiol.* 1997;25(5):819-29.

Rothe, J., W. Lesslauer, H. Lotscher, Y. Lang, P. Koebel, F. Kontgen, A. Althage, R. Zinkernagel, M. Steinmetz, and H. Bluethmann. "Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*." *Nature* 1993;364(6440):798-802.

Roy, S., W. McGuire, C. G. Mascie-Taylor, B. Saha, S. K. Hazra, A. V. Hill, and D. Kwiatkowski. "Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy." *J.Infect.Dis.* 1997;176(2):530-2.

Schaaf, B. M., F. Boehmke, H. Esnaashari, U. Seitzer, H. Kothe, M. Maass, P. Zabel, and K. Dalhoff. 2003. "Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism." *Am J.Respir.Crit Care Med* 2003;168(4):476-80.

Schuchat, A., K. Robinson, J. D. Wenger, L. H. Harrison, M. Farley, A. L. Reingold, L. Lefkowitz, and B. A. Perkins. "Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team." *N Engl J Med.* 1997;337(14):970-6.

Skerrett, S. J., G. J. Bagby, R. A. Schmidt, and S. Nelson. "Antibody-mediated depletion of tumor necrosis factor-alpha impairs pulmonary host defenses to *Legionella pneumophila*." *J.Infect.Dis.* 1997;176(4):1019-28.

Sorensen, T. I., G. G. Nielsen, P. K. Andersen, and T. W. Teasdale. "Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees." *N.Engl.J.Med* 1988; 318(12):727-32.

Spies, T., C. C. Morton, S. A. Nedospasov, W. Fiers, D. Pious, and J. L. Strominger. "Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex." *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1986;83(22):8699-702.

Spriggs, D. R., S. Deutsch, and D. W. Kufe. "Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha." *Immunol.Ser.* 1992;56:3-34.

Stauber, G. B., R. A. Aiyer, and B. B. Aggarwal. "Human tumor necrosis factor-alpha receptor. Purification by immunoaffinity chromatography and initial characterization." *J.Biol.Chem.* 1988;263(35):19098-104.

Stephens, K. E., A. Ishizaka, J. W. Larrick, and T. A. Raffin. "Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. Comparison to septic acute lung injury." *Am Rev.Respir.Dis.* 1988;137(6):1364-70.

Stuber, F., M. Petersen, F. Bokelmann, and U. Schade. "A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis." *Crit Care Med* 1996; 24(3):381-4.

Stuber, F., I. A. Udalova, M. Book, L. N. Drutskaya, D. V. Kuprash, R. L. Turetskaya, F. U. Schade, and S. A. Nedospasov. "-308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter." *J.Inflamm.* 1995-1996;46(1):42-50.

Takashima, K., K. Tateda, T. Matsumoto, Y. Iizawa, M. Nakao, and K. Yamaguchi. "Role of tumor necrosis factor alpha in pathogenesis of pneumococcal pneumonia in mice." *Infect.Immun.* 1997;65(1):257-60.

Tang, G. J., S. L. Huang, H. W. Yien, W. S. Chen, C. W. Chi, C. W. Wu, W. Y. Lui, J. H. Chiu, and T. Y. Lee. 2000b. "Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection." *Crit Care Med* 2000;28(8):2733-6.

Tang, G. J., S. L. Huang, H. W. Yien, W. S. Chen, C. W. Chi, C. W. Wu, W. Y. Lui, J. H. Chiu, and T. Y. Lee. 2000a. "Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection." *Crit Care Med* 2000;28(8):2733-6.

Tartaglia, L. A., T. M. Ayres, G. H. Wong, and D. V. Goeddel. 1993a. "A novel domain within the 55 kD TNF receptor signals cell death." *Cell* 1993;74(5):845-53.

Tartaglia, L. A., D. Pennica, and D. V. Goeddel. 1993b. "Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor." *J.Biol.Chem.* 1993;268(25):18542-8.

Tilghman RC. "Clinical significance of bacteremia in pneumococccic pneumonia." *Arch InternMed*; 1937;59:602–619.

Tong, H. H., J. N. Weiser, M. A. James, and T. F. DeMaria. "Effect of influenza A virus infection on nasopharyngeal colonization and otitis media induced by transparent or opaque phenotype variants of *Streptococcus pneumoniae* in the chinchilla model." *Infect.Immun.* 2001;69(1):602-6.

Torres, J. M., O. Cardenas, A. Vasquez, and D. Schlossberg. "Streptococcus pneumoniae bacteremia in a community hospital." *Chest* 1998;113(2):387-90.

Tracey, K. J., S. F. Lowry, and A. Cerami. "Cachectin/TNF mediates the pathophysiological effects of bacterial endotoxin/lipopolysaccharide (LPS)." *Prog.Clin.Biol.Res.* 1988;272:77-88.

Tsukumo, S. I. and S. Yonehara. "Requirement of cooperative functions of two repeated death effector domains in caspase-8 and in MC159 for induction and inhibition of apoptosis, respectively." *Genes Cells* 1999;4(9):541-9.

Turner, D. M., S. C. Grant, W. R. Lamb, P. E. Brenchley, P. A. Dyer, P. J. Sinnott, and I. V. Hutchinson. "A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients." *Transplantation* 1995;60(10):1113-7.

Twigg, H. L., III. "Pulmonary host defenses." *J.Thorac.Imaging* 1998;13(4):221-33

Utsumi, K., Y. Takai, T. Tada, S. Ohzeki, H. Fujiwara, and T. Hamaoka. "Enhanced production of IL-6 in tumor-bearing mice and determination of cells responsible for its augmented production." *J.Immunol.* 1990;145(1):397-403.

van der, Poll T., C. V. Keogh, W. A. Buurman, and S. F. Lowry. "Passive immunization against tumor necrosis factor-alpha impairs host defense during pneumococcal pneumonia in mice." *Am J.Respir.Crit Care Med* 1997;155(2):603-8.

van der, Poll T., A. Marchant, C. V. Keogh, M. Goldman, and S. F. Lowry. "Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia." *J.Infect.Dis.* 1996; 174(5):994-1000.

Waage, A., A. Halstensen, and T. Espevik. "Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease." *Lancet* 1987;14 (8529):355-7.

Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. "Tumor necrosis factor signaling." *Cell Death.Differ.* 2003;10(1):45-65.

Waterer, G. W. and R. G. Wunderink. "Genetic susceptibility to pneumonia." *Clin.Chest Med* 2005;26(1):29-38.

Watson, D. A. and D. M. Musher. "A brief history of the pneumococcus in biomedical research." *Semin.Respir.Infect.* 1999;14(3):198-208

Watson, D. A., D. M. Musher, and J. Verhoef. "Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them." *Eur.J Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 1995;14(6):479-90.

Weiser, J. N., D. Bae, C. Fasching, R. W. Scamurra, A. J. Ratner, and E. N. Janoff. "Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;100(7):4215-20

Wellmer, A., J. Gerber, J. Ragheb, G. Zysk, T. Kunst, A. Smirnov, W. Bruck, and R. Nau. "Effect of deficiency of tumor necrosis factor alpha or both of its receptors on *Streptococcus pneumoniae* central nervous system infection and peritonitis." *Infect.Immun.* 2001;69(11):6881-6.

Westendorp, R. G., J. A. Langermans, T. W. Huizinga, A. H. Elouali, C. L. Verweij, D. I. Boomsma, and J. P. Vandenbroucke. "Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease." *Lancet* 1997;349(9046):170-3.

Wheeler, A. P. and G. R. Bernard. "Treating patients with severe sepsis." *N.Engl.J.Med* 1999;340(3):207-14.

Wilson, A. G., F. S. di Giovine, A. I. Blakemore, and G. W. Duff. "Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product." *Hum.Mol.Genet.* 1992;1(5):353.

Wilson, A. G., J. A. Symons, T. L. McDowell, H. O. McDevitt, and G. W. Duff. 1997. "Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation." *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1997;94(7):3195-9.

Wyllie, A. H. "Apoptosis and carcinogenesis." *Eur.J.Cell Biol.* 1999;80 Suppl.1:34-7.

Zabel, P., D. T. Wolter, M. M. Schonharting, and U. F. Schade. "Oxpentifylline in endotoxaemia." *Lancet* 1989;23-30(8678-8679):1474-7.

Zambon, C. F., D. Basso, F. Navaglia, C. Belluco, A. Falda, P. Fogar, E. Greco, N. Gallo, M. Rugge, Mario F. Di, and M. Plebani. "Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome." *Cytokine* 2005;29(4):141-52

Zhang, P., W. R. Summer, G. J. Bagby, and S. Nelson. "Innate immunity and pulmonary host defense." *Immunol.Rev.* 2000;173:39-51.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei:

Herrn PD Dr. Bernhard Schaaf für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung und Anleitung zu selbständigem, wissenschaftlichen Arbeiten und Denken.

Herrn Professor Peter Zabel für die Möglichkeit an seiner Klinik wissenschaftlich arbeiten zu können.

Frau Ute Wegner, Frau Simone Ross und Frau Barbara Gogoll für die Einführung in die angewandten Methoden und für ihre Geduld.

Meinen Geschwistern und meiner Mutter für das Vertrauen und die Unterstützung aus der Ferne.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name:	Hamed Esnaashari
Geburtstag:	26.04.1974
Geburtsort:	Teheran (Iran)
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch, Iranisch

### Schulbildung

1980 – 1987	Besuch der Grund- und Orientierungsstufe im Iran
1987 – 1994	Martin Luther Gymnasium / Hannover

### Studium

Februar 1997	Abschluss der Vorklinik in Lübeck
Februar 1998	1. Staatsexamen in Lübeck
September 2001	2. Staatsexamen in Lübeck
Dezember 2003	3. Staatsexamen in Lübeck

### Berufliche Tätigkeit

Februar 2004	Arzt im Praktikum an der Klinik für Chirurgie Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. Bruch)
Oktober 2004	Assistenzarzt an der Klinik für Chirurgie Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. Bruch)