

Aus der medizinischen Klinik III
Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Peter Zabel

Die Rolle von Trem-1 (Triggering receptor expressed on myeloid cells-1)
als Mustererkennungsrezeptor bei der humanen *Escherichia coli* Sepsis

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Sektion Medizin-

vorgelegt von

Tobias van Bremen
aus Dortmund

Bonn 2012

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Bernhard Schaaf
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Peter Beyer

Tag der mündlichen Prüfung: 7.9.2012
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 7.9.2012
-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Für meine liebe Großmutter Cäcilie Jöhren

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Einleitung | 11 |
| Das angeborene und erworbene Immunsystem..... | 12 |
| Pathophysiologie der Sepsis..... | 14 |
| Wichtige Moleküle und Rezeptoren bei der Sepsis | 18 |
| Trem-1 (Triggering receptor expressed on myeloid cells-1) als ein Mustererkennungrezeptor in der bakteriellen Sepsis | 21 |
| Fragestellung und Zielsetzung | 25 |
| Material und Methoden..... | 26 |
| Studiendesign und Untersuchungskollektive..... | 26 |
| Studienablauf und Erfassung der klinischen Daten..... | 26 |
| Probengewinnung | 32 |
| Vorbereitung und Messung der Oberflächenrezeptoren auf den Monozyten und PMN per FACS | 32 |
| Vollblutassay (VBA) | 39 |
| Gewinnung von Serum und Plasma..... | 40 |
| Elisa Messung..... | 41 |
| Statistische Auswertung..... | 42 |
| Ethikantrag..... | 43 |
| Ergebnisse | 44 |
| Klinische Daten | 44 |
| Ergebnisse für Trem-1 auf Monozyten und PMN | 47 |
| Andere PRR in der bakteriellen Sepsis | 49 |
| Immunantwort in der Vollblutstimulation (ELISA) | 51 |
| Korrelation zwischen den Trem-1 Oberflächenrezeptoren auf PMN und der TNF- α und IL-10 Stimulierbarkeit im Vollblutassay | 53 |
| Oberflächen PMN Trem-1 Expression und freie Zytokine | 54 |
| Oberflächen PMN Trem-1 Expression und Entzündungsmarker..... | 55 |
| Löslicher sTrem-1 im Serum | 56 |
| Zusammenfassung der Ergebnisse..... | 58 |
| Diskussion | 59 |

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Zusammenfassung | 65 |
| Literaturverzeichnis | 66 |
| Anhang | 76 |

Abkürzungsverzeichnis:

| | |
|-----------|---|
| APACHE | Acute Physiology, Age, Chronic Health Evaluation |
| APS | Acute Physiology Score |
| CD14 | Cluster of Differentiation |
| CHP | chronic health points |
| DAP | DNXA activation protein |
| DC | Dendritische Zellen |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| ERK | extracellular regulated kinase |
| FACS-Scan | Flourescence Activated Cell Separation |
| FSC | Vorwärtsstreulicht |
| GCS | Glasgow Coma Scale |
| HMGB | high-mobility group box |
| IL | Interleukin |
| IFN | Interferon |
| IP-10 | Interferon-gamma-induced-protein-10 |
| IRAK | IL-1R-associated Kinase |
| kDa | kilodalton |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LTA | Lipoteichonsäure |
| MCP-1 | Monocyte Chemotactic Protein-1 |
| MFI | Mean Flourescence Intensity |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| MNK | Monozyten |
| MIF | Macrophage Migration Inhibitory Factor |
| MODS | Multiorgandysfunktionssyndrom |
| MYD88 | Myeloid Differentiation Primary-Response Protein 88 |
| NFkappaB | Nuclear Factor KappaB |
| NKZ | natürliche Killerzellen |
| PAMP | Pathogen Associated Molecular Patterns |
| PCT | Procalcitonin |
| PMN | Polymorphonukleare Zellen |
| PRR | Pattern Recognition Receptors |
| RPM | Revolutions per minute |

| | |
|------|--|
| SIRS | Systemic Inflammatory Response Syndrome |
| SSC | Seitwärtsstreulicht |
| TAK | Transforming-growth-factor-beta-activated Kinase |
| TGF | Transforming growth factor |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| Trem | Triggering receptor expressed on myeloid cells |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TRAF | Tumor-necrosis-factor-receptor-assoziated Factor |
| VBA | Vollblutassay |

Tabellenverzeichnis:

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Material Zellisolation | 33 |
| Tabelle 2: Material Anikörpermarkierung und FACS Messung | 38 |
| Tabelle 3: Ansatzchema VBA | 39 |
| Tabelle 4: Material VBA | 40 |
| Tabelle 5: Material Serum- und Plasmakonservierung | 41 |
| Tabelle 6: Material Elisa | 42 |
| Tabelle 7 : klinische und demographische Daten der Patienten | 44 |
| Tabelle 8: Sepsisscore/ APACHE/ APS..... | 45 |
| Tabelle 9: Klinische Daten: | 46 |
| Tabelle 10: TLR2, TLR4, HLA-DR Expression auf Monozyten und PMN | 50 |

Abbildungsverzeichnis:

| | |
|--|-----|
| Abbildung 1: | |
| Das angeborene und erworbene Immunsystem | 12a |
| Abbildung 2: | |
| Trem-1 Signalkaskade | 23 |
| Abbildung 3: | |
| Altersberechnung..... | 28 |
| Abbildung 4: | |
| Chronic health points | 28 |
| Abbildung 5: | |
| Glasgow Coma Scale (GCS) | 29 |
| Abbildung 6: | |
| Acute Physiology Score (APS) | 29 |
| Abbildung 7: | |
| Durchflusszytometrische Darstellung von PMN | 37 |
| Abbildung 8: | |
| Durchflusszytometrische Darstellung der Monozyten | 38 |
| Abbildung 9: | |
| Oberflächenexpression Trem-1 auf Monozyten bei allen Patienten und Probanden | 47 |
| Abbildung 10: | |
| Oberflächenexpression Trem-1 auf Monozyten bei Patienten mit schwerer Sepsis, leichter Sepsis und Probanden | 48 |
| Abbildung 11: | |
| Oberflächenexpression Trem-1 auf PMN von Sepsispatienten und Probanden | 48 |
| Abbildung 12: | |
| Oberflächenexpression Trem-1 auf PMN bei Patienten mit schwerer Sepsis, leichter Sepsis und Probanden | 49 |
| Abbildung 13: | |
| TNF- α im Vollblutassay unter LPS und LTA Stimulation..... | 51 |
| Abbildung 14: | |
| IL-10 im Vollblutassay unter LPS und LTA Stimulation..... | 51 |
| Abbildung 15: | |

| | |
|--|----|
| IL-8 im Vollblutassay unter LPS und LTA Stimulation..... | 52 |
| Abbildung 16: | |
| IL-6 im Vollblutassay unter LPS und LTA Stimulation..... | 52 |
| Abbildung 17: | |
| TNF- α Stimulierbarkeit in Abhängigkeit von der PMN Trem-1 | |
| Oberflächenexpression | 53 |
| Abbildung 18: | |
| IL-10 Stimulierbarkeit in Abhängigkeit von der PMN Trem-1 | |
| Oberflächenexpression | 53 |
| Abbildung 19: | |
| Korrelation Serum TNF- α zur PMN Trem-1 Oberflächenexpression | 54 |
| Abbildung 20: | |
| Korrelation der IP-10 Konzentration mit der PMN Trem-1 | |
| Oberflächenexpression | 55 |
| Abbildung 21: | |
| Korrelation der Procalcitoninkonzentration mit der PMN Trem-1 | |
| Oberflächenexpression | 56 |
| Abbildung 22: | |
| Korrelation der CRP Konzentration mit der PMN Trem-1 | |
| Oberflächenexpression | 56 |
| Abbildung 23: | |
| sTREM-1 Konzentration im Plasma..... | 57 |

Einleitung

Sepsis

Erstmals aufgetaucht ist der Begriff „Sepsis“ in den Werken (Corpus Hippocraticum) des griechischen Arztes Hippokrates (ca. 460- 377 v.Chr.). Das Wort leitet sich von dem griechischen Begriff sepidon (σηπω) ab, der als „faul machen“ übersetzt werden kann (Geroulanos et Douka, 12:2077). Erst später mit Robert Koch (1843- 1919), welcher Bakterien als Krankheitserreger identifizierte, und Schottmüller, der 1914 die Toxinwirkung erkannte, konnte langsam ein Verständnis der Pathogenese der Sepsiserkrankung entwickelt werden (Vervölgyi, 2007).

Die bakterielle Sepsis ist weltweit eine weit verbreitete Erkrankung, an der Menschen aller Altersklassen erkranken können. Trotz großer wissenschaftlicher Anstrengungen ist insbesondere die Therapie für die behandelnden Ärzte weiterhin herausfordernd. Gerade durch die lebensbedrohlichen Komplikationen ist die Sepsis die häufigste Todesursache auf Intensivstationen.

Die Inzidenz liegt bei ca. 300 Erkrankungen/ 100000 Einwohnern pro Jahr. Ein Teil der Patienten kann durch eine aufwendige intensivmedizinische Betreuung und spezifische antibiotische Therapien gerettet werden, die Mortalität der schweren Sepsis liegt aber dennoch bei bis zu 40 % und ist die dritthäufigste Todesursache in Deutschland (ca. 60000 Todesfälle) (Brunkhorst 43-44).

Auch die ökonomische und damit volkswirtschaftliche Bedeutung der Sepsiserkrankung ist hervorzuheben. Jedes Jahr entstehen direkte Kosten von 1,1 – 2,5 Milliarden Euro, das sind ca. 30% des gesamten Budgets von Intensivstationen. Die indirekten Kosten für die Gesellschaft liegen weitaus höher (SepNet).

Das angeborene und erworbene Immunsystem

Beim Eindringen von Mikroorganismen in den Körper kommt es zu einer systemischen Entzündungsreaktion. Der Körper reagiert mit einer Immunantwort auf diese Erreger.

Das Immunsystem des Körpers kann man in zwei Systeme unterteilen: ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem (siehe Abbildung 1).

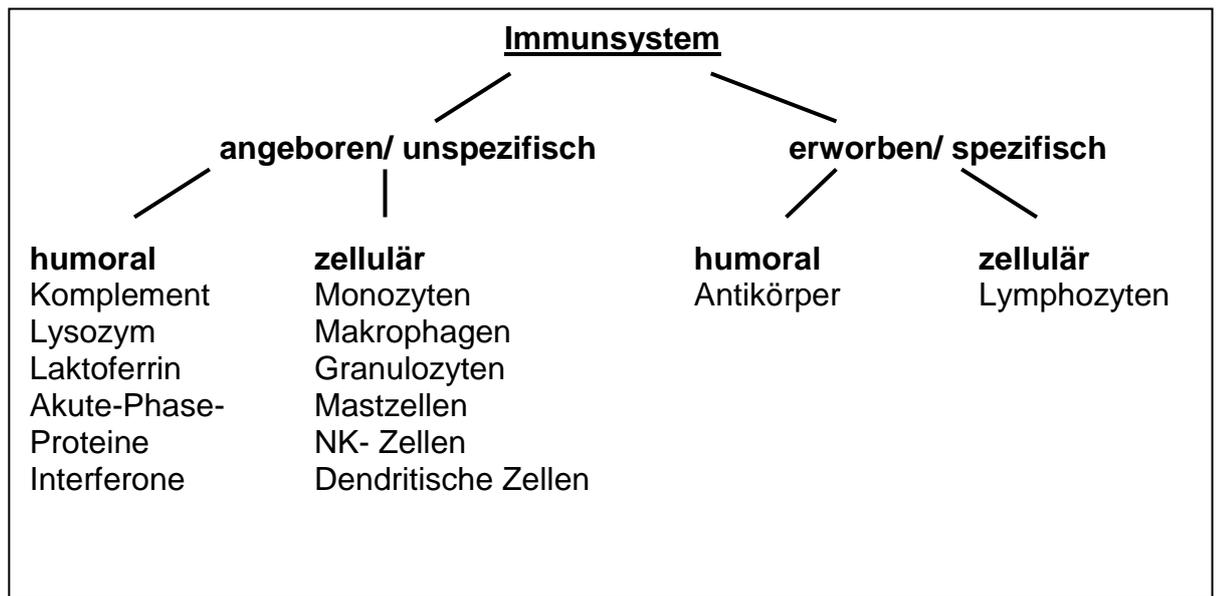


Abbildung 1: Das angeborene und erworbene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem

Bevor das erworbene Immunsystem reagiert, kommt es zu einer Aktivität des angeborenen Immunsystems (Horner et al. 10-28). Es hat die Eigenschaft, zwischen körpereigenen und körperfremden Stoffen zu unterscheiden.

Kennzeichen des angeborenen Immunsystems ist, dass es zu einer sofortigen Reaktion auf Pathogene kommt. Im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem muss kein vorheriger Kontakt stattgefunden haben. Von zentraler Bedeutung des zellulären Teils des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen, Monozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und Leukozyten, die sich aus neutrophilen,

eosinophilen und basophilen Granulozyten zusammensetzen (siehe Abbildung 1).

Monozyten gelangen, angelockt durch Botenstoffe, zum Entzündungsherd und differenzieren dort zum Teil zu Makrophagen. Beide Zellformen sind in der Lage zu phagozytieren, antibakterielle Proteine und Zytokine zu produzieren und als antigenpräsentierende Zelle zu fungieren (Aderem and Underhill 593-623).

Bei einer bakteriellen Infektion haben von den Leukozyten die neutrophilen Granulozyten die größte Bedeutung. Nach ihrer Aktivierung können sie phagozytieren, Sauerstoffradikale generieren und zahlreiche proinflammatorische Zytokine produzieren (Dransfield, Stocks, and Haslett 3264-73).

Eosinophile Granulozyten treten verstärkt bei parasitären Erkrankungen auf, basophile Granulozyten sezernieren IgE vermittelt Histamin.

Natürliche Killerzellen eliminieren Zellen, die eine verringerte Anzahl von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche besitzen. Dies ist besonders bei Tumorzellen oder durch Virus infizierte Zellen der Fall (Groh et al. 255-60).

Das erworbene Immunsystem

Beim erworbenen Immunsystem sind die B- und T- Lymphozyten von besonderer Bedeutung. Hierbei geht es um das Erkennen verschiedener Antigene und um die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses.

Die B- Zellen sind für die Bildung von Antikörpern verantwortlich. Nach Kontakt eines Antigens entwickelt sich die B- Zelle zu einer Plasmazelle, die lösliche Antikörper sezerniert (siehe Abbildung 1).

Im T- Zell System erkennen die zytotoxischen T-Zellen über ihren CD-8 Oberflächenrezeptor fremde Antigene. Diese müssen über ein MHC-Klasse I Protein präsentiert werden. Durch Perforine und Granzyme wird die MHC-I-tragende Zelle in den programmierten Zelltod geschickt.

Antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen oder B-Lymphozyten besitzen ein MHC-II- Molekül an ihrer Oberfläche, über welche sie die Antigene den CD-4 T-Zellen präsentieren. Diese Zellen werden auch T-Helferzellen genannt. Diese Bindung führt zu einer Lymphozytenproliferation.

Pathophysiologie der Sepsis

In der Sepsis kommt es zu einem Zusammenwirken von Infektion und Immunantwort. Im angeborenen Immunsystem kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems durch sogenannte „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs). PAMPs sind Bestandteile von Mikroorganismen bzw. Pathogenen, die immer dasselbe Muster aufweisen. Diese Strukturen sind unabhängig von der genetischen Variabilität des Pathogens, was das Erkennen dieser Strukturen erleichtert (Medzhitov 135-45). Beim Menschen gibt es ganz spezielle Rezeptoren, die die PAMPs erkennen können. Diese Rezeptoren nennt man „Pattern Recognition Receptors“ (PRR), welche auf der Zellmembran von Monozyten, Makrophagen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten und auch im Zellplasma anzutreffen sind (Janeway, Jr. and Medzhitov 349-50).

Als Beispiel für unterschiedliche PAMPs kann man die Zellwandbestandteile von gram-positiven oder gram-negativen Bakterien heranziehen. In der Zellwand von gram-positiven Bakterien, die aus einer Zellmembran und einer dicken Mureinschicht besteht, befinden sich viele verschiedene Moleküle - unter anderem auch die Lipoteichonsäure (LTA). Bei gram-negativen Bakterien besteht die Zellmembran aus zwei Phospholipid- Doppelschichten und einer dünnen Mureinschicht. Der äußere Teil der Zellmembran ist über eine Lipoproteinschicht mit Murein verbunden, in der sich die Lipopolysaccharide (LPS) befinden. Bei einer Infektion mit gram-negativen Bakterien kommt es im Verlauf zu einem Zerfall der Bakterien und es wird das toxische LPS freigesetzt. LPS ist nun als PAMP in der Lage an diversen Zielzellen über PRR zu binden und eine Kaskade in Gang zu setzen. Die PRR tragenden Zielzellen sind Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen.

An der Zellmembran bindet das LPS (als PAMP) einen Komplex, der aus dem LPS Bindungs Protein (LBP) und dem CD14 Rezeptor besteht. Um nun das Signal in das Zellinnere weiterleiten zu können, sind weitere Rezeptoren notwendig. Hierfür sind die Toll- like Rezeptoren verantwortlich (Medzhitov, Preston-Hurlburt, and Janeway, Jr. 394-97).

Nach der Bindung mit dem LBP und dem CD14 ist das LPS nun in der Lage an den TLR4 Rezeptoren zu binden. Intrazellulär befindet sich an dem TLR4 Rezeptor noch ein notwendiges Glykoprotein (MD2)-Adaptermolekül (Schumann et al. 1429-31). Über diesen TLR4 Rezeptor Komplex wird das Signal transmembran in das Zellinnere geleitet. Die intrazelluläre Weiterleitung erfolgt über die MYD 88, die IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK) und den TNF Rezeptor assoziierten Faktor-6 (TRAF-6) (Horng and Medzhitov 12654-58). Von hier aus bestehen mehrere Wege mit weiteren Proteinen, die alle im weiteren Verlauf zur Herstellung von NF κ B im Zellkern und zu einer Transkription von Genen führen, aus denen proinflammatorische Zytokine resultieren. Als Folge wird z.B. TNF- α von der Zielzelle sezerniert.

Es besteht auch ein Weg, der direkt die NF κ B Produktion steigert. Er beginnt beim „toll-IL-1R domain-containing adapter protein“ (TIRAP) (Horng, Barton, and Medzhitov 835-41).

Bei einer Infektion mit gram-positiven Bakterien wird ein ganz ähnlicher Weg aktiviert. Dieser verläuft eher über den TLR2 Rezeptor (als PRR). Ligand (als PAM) ist hier das LTA. Der Signalweg ist dem beschriebenen Weg der TLR4 Aktivierungen ähnlich. Am Ende kommt es ebenfalls zu einem Anstieg von NF κ B. Der Anstieg des NF κ B induziert eine proinflammatorische Zytokinantwort, die zum Beispiel zu einer vermehrten Freisetzung von TNF- α führt (Bohrer et al. 972-85). Weitere proinflammatorische Zytokine sind neben TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IF- γ . An den Zielzellen – das sind unter anderem Fibroblasten, Endothelzellen, T- und B- Zellen oder Granulozyten - führt dies zu einer Entzündungsantwort. Es ist nachgewiesen, dass gerade TNF- α in der Frühphase der Sepsis eine entscheidende Rolle für die Hyperinflammation spielt. Im weiteren Verlauf der Erkrankung sind eher Mediatoren wie High Mobility group box protein-1 (HMGB), IL-1 β , IL-6, IL-8 und Macrophage migration inhibitory factor (MIF) von Bedeutung.

Das oben genannte IF- γ verstärkt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und führt außerdem zu einer Aktivierung von Monozyten und Makrophagen.

Auf den Monozyten ist außerdem der HLA-DR Rezeptor exprimiert. Dieser Rezeptor gehört zu den MHC-Klasse-II Molekülen und spielt für die Immunantwort eine wichtige Rolle. Antigene binden am HLA-DR Rezeptor und führen zu einer Aktivierung mit Lymphozytenproliferation. Im Rahmen einer Sepsiserkrankung ist eine reduzierte Expression des HLA-DR Rezeptors mit einer eingeschränkten Antigenpräsentation assoziiert (Volk et al 9558-63). Eine klinische Relevanz dieser Immunphänomene ist wahrscheinlich, da das Risiko bei reduziertem HLA-DR an opportunistischen Infektionen zu erkranken, erhöht ist (Haverman et al 132-41).

Einige Autoren postulieren eine reduzierte HLA-DR Expression als Marker für den temporären Immundefekt zu nutzen (Döcke 678-81).

Neben den schon genannten proinflammatorischen Zytokinen gibt es auch diverse antiinflammatorische Zytokine. IL-10 und TGF- β haben einen hemmenden Einfluss auf die Zytokinausschüttung (Li, Elliott, and Mosmann 3967-78). IL-10 hemmt direkt die Freisetzung von IFN- γ (Li, Elliott, and Mosmann 3967-78). Zusätzlich bestehen diverse hormonelle und Neurotransmitter vermittelte Regulationsmechanismen für die Antiinflammation. Acetylcholin und Glucokortikoide hemmen z.B. die Synthese proinflammatorischer Zytokine.

Definition und Diagnose der Sepsiserkrankung

Zurzeit wird die Sepsis nach den Kriterien des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine definiert. Sepsis ist demnach definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutkreislauf zusammen mit einer Reaktion des Organismus auf diese Invasion (Bone et al. 1644-55).

Die Reaktion des Körpers wird als Septic inflammatory Response Syndrom beschreiben (SIRS). Die Ursache eines SIRS kann sowohl infektiösen als auch nicht infektiösen Ursprungs sein. Klinisch lässt sich ein SIRS ohne Infektion als Ursache von einer Sepsis häufig nicht unterscheiden.

Bei den infektiösen Ursachen stehen bakterielle und fungale Mikroorganismen im Vordergrund. Operationen, Traumata,

Verbrennungen und die Pankreatitis sind nichtinfektiöse Ursachen des SIRS.

Es hat sich heutzutage ein Gesamtkonzept durchgesetzt, mit dem man die Sepsis klinisch in verschiedene Gruppen und Schweregrade einteilen kann.

Diese werden unterteilt in:

- Sepsis
- schwere Sepsis
- septischer Schock
- multiple organ dysfunction syndrom (MODS)

Die Hyporesponsibilität in der Sepsiserkrankung

Hyporesponsibilität wird auch häufig als Immunparalyse oder Endotoxin-Toleranz bezeichnet. Im Rahmen der Sepsiserkrankung kommt es initial zu einer proinflammatorischen gefolgt von einer antiinflammatorischen Phase. Erhöhte Plasmaspiegel antiinflammatorischer Botenstoffe führen zu Deaktivierung von Immunzellen. Diese Immunparalyse umfasst Monozyten/ Makrophagen, dendritische Zellen und Lymphozyten. Eine zweite Infektion führt nicht zu einer erneuten Entzündungsreaktion. Dieser „second hit“ hat daher eine hohe Letalität. Mit der sekundären Hyporesponsibilität werden die häufigen Sekundärinfektionen im Rahmen der Sepsis erklärt.

Der Mechanismus, der zur sekundären Hyporesponsibilität und somit Immundefizienz führt, ist nicht komplett geklärt. Eine mögliche Ursache kann in der reduzierten Expression der TLR und der Zytokin-Signalkaskade liegen (West et al 64-73; Härter et al 403- 409; Lehner et al 5161-7; Nomura et al 3476-9).

Wichtige Moleküle und Rezeptoren bei der Sepsis

Zytokine

Zytokine sind Glykoproteine, die eine Schlüsselposition bei der Immunabwehr des Körpers einnehmen. Als Mediatoren sind sie an der Proliferation, Aktivierung und Differenzierung von Zellen beteiligt und können im Allgemeinen in pro- und antiinflammatorische Zytokine unterteilt werden.

TNF- α

TNF- α ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, welches an lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Es wurde erstmalig 1975 sequenziert und ist ein 51 kDa schweres Protein, welches von Makrophagen, NK-Zellen, dendritischen Zellen und B- und T- Zellen gebildet wird. Es induziert die Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Zytokine (Vassalli 411-52). TNF- α gehört zu der Gruppe der akute Phase Proteine, welches in der Frühphase Zytokinkaskaden aktiviert, Neutrophile und Makrophagen rekrutiert und zusätzlich die Expression von Adhäsionsmolekülen steigert (Hehlhans and Pfeffer 1-20).

Besonders bei der Entstehung eines septischen Schocks kommt dem TNF- α eine besondere Rolle zu. Hohe Spiegel gehen mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko einher (Rink and Kirchner 199-209).

IL-8

Interleukin-8 ist ein wichtiges Zytokin, welches von Monozyten, Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten produziert wird. Eine der Hauptaufgaben besteht in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Rajarathnam et al. 90-92). Hierbei wird die Chemotaxis gefördert und die Expression von Adhäsionsmolekülen verstärkt.

Die Biosynthese des IL-8 wird durch zahlreiche Zytokine (wie z.B. IL-1, -3, -6, TNF- α , IF- γ) gefördert. IL-4 und IL-10 wirken hemmend auf die Synthese von IL-8 (Baggiolini, Moser, and Clark-Lewis 95S-8S).

IL-10

IL-10 wird von den T-Helferzellen und den regulatorischen T- Zellen gebildet und wirkt antiinflammatorisch (Fiorentino, Bond, and Mosmann 2081-95). Es besitzt ein Molekulargewicht von 17 -21 kDa (Mosmann and Moore A49-A53).

Es ist bekannt, dass es die Zytokinproduktion bei Monozyten, Makrophagen, Th1-Zellen und natürlichen Killerzellen herabsetzt und es so zu einer verminderten Freisetzung von TNF- α , IL-1a, IL-8, IL-12, GM-CSF kommt (Fiorentino et al. 3815-22). Die Signale werden über den Rezeptor IL-10R vermittelt. Über verschiedene Rezeptorkinasen und Transkriptionsfaktoren kommt es zur Hemmung der NF κ B Kaskade, was zu der beschriebenen Verminderung der Zytokinproduktion führt (Wang et al. 9558-63).

Versuche haben gezeigt, dass besonders LPS zu einer IL-10 Produktion führt. Dieses tritt meist zeitlich verzögert, nach Anstieg der proinflammatorischen Zytokine, auf. IL-10 unterdrückt die LPS induzierte Produktion von Zytokinen und Chemokinen in PMN (Kasama et al. 3559-69). Besonders im Rahmen einer bakteriellen Sepsis ist das Verhältnis zwischen Anti- und Proinflammation besonders wichtig für das Überleben der Patienten. Es muss in einer gewissen „Balance“ bestehen. So haben Versuche an IL-10 defizienten Mäusen gezeigt, dass eine LPS Gabe bei Ihnen zum Tod führt. Eine überschießende Entzündungsantwort konnte nicht reguliert werden (Pajkrt et al. 3971-77) (Kuhn et al. 263-74). Andere Versuche wiederum verdeutlichen einen negativen Effekt des IL-10. Eine Neutralisation führte bei Mäusen mit bakteriellen Pneumonien zu einer Verbesserung der Überlebensrate (van der et al. 994-1000).

IL-6

Interleukin-6 wird von zahlreichen Zelltypen wie Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten gebildet und hat pro- und antiinflammatorische Eigenschaften (Jones et al. 43-58). Es induziert Akute-Phase-Proteine, stimuliert B- und T- Zell Funktionen, regt die B-Zellen zur Differenzierung an und führt zur Differenzierung von Makrophagen. IL-6 ist außerdem an

der Regulation der Apoptose von Leukozyten mit pro- und antiapoptotischen Wirkkomponenten beteiligt (Heinrich et al. 1-20).

Procalcitonin

Procalcitonin, das Prohormon des Calcitonins, ist ein in die Klinik eingeführter wichtiger Biomarker für systemisch bakterielle Infektionen (Castelli et al. R234-R242) und von spezieller klinischer Relevanz für die bakterielle Sepsis. Bei einer infektiösen Erkrankung korreliert der PCT Spiegel mit dem Schweregrad der Erkrankung. Nach ca. 6 h, nachdem ein systemischer Entzündungsprozess eingetreten ist, kann PCT nachgewiesen werden. Je höher der Wert, umso schwerer die Sepsis. Es wird auch als Verlaufsparemeter beim infektiologischen Monitoring eingesetzt (Meisner et al. 680-84). Procalcitonin wird vorwiegend in den neuroendokrinen Zellen und den parafollikulären C- Zellen der Schilddrüse exprimiert.

Bei einer Infektion wird das PCT aus extrathyroidalen Quellen wie Leukozyten, Monozyten, Adipozyten und einigen Organen wie der Leber freigesetzt.

TNF- α , und IL-1 β , IL-6 und IL-2 wirken stimulierend auf die PCT Synthese, wohingegen das bei viralen Infektionen induzierte INF- γ einen hemmenden Einfluss besitzt (Oberhoffer et al. 49-55). PCT wirkt chemotaktisch auf Monozyten und fördert die Sekretion von IL-8 und TNF- α .

IP-10

Interferon- γ -induced protein ist ein 10 kDa Chemokin, welches modulierend bei der Immunantwort wirkt und ein Bindungsglied zur adaptiven Immunität darstellt, da es TH1-Zellen aktiviert und somit Einfluss auf die CD8 T-Lymphozyten Aktivierung hat. Es wird von Monozyten, Makrophagen, DC, Endothelzellen, Fibroblasten, neutrophilen Granulozyten und peritonealen Mesothelzellen nach Kontakt mit IFN- γ oder TLR Stimulus gebildet (Cassatella et al. 111-15).

IP-10 wirkt chemotaktisch auf Th1-Lymphozyten, NKZ und DC. NKZ bilden wiederum IFN- γ , was erneut die IP-10 Produktion stimuliert. Ist kein IP-10 vorhanden, werden die TH1-Lymphozyten nicht effektiv rekrutiert (Dufour et al. 3195-204).

Effekte des IP-10 auf Monozyten und Neutrophile sind bisher nicht bekannt. IL-10 unterdrückt die IP-10 Produktion. IFN- γ induziert die Produktion von IP-10. IP-10 hingegen zirkuliert in deutlich höheren Spiegeln im Blut, so dass es ein guter Marker für IFN- γ darstellt. Somit kann die biologische Aktivität und somit die T-Zell Immunaktivierung bestimmt werden (Rotondi et al 26:177-80).

Indikationen für eine IP-10 Bestimmung im klinischen Alltag ist der Nachweis von T- zellulär induzierter Immunaktivierung und als Verlaufskontrolle bei immunmodulierender Therapien (Jinquan et al. 1548-56).

Trem-1 (Triggering receptor expressed on myeloid cells-1) als ein Mustererkennungrezeptor in der bakteriellen Sepsis

Bedeutung

Es gibt eine große Anzahl an löslichen und membrangebundenen Rezeptoren, die an der Entzündungsantwort beteiligt sind. Neben den bekannten Rezeptoren aus der TOLL- Familie wurde vor einiger Zeit der Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (Trem-1) entdeckt. Sein Verhalten in der Sepsis und die Besonderheiten während der Entzündungsantwort gilt es weiter zu erforschen.

Der Trem-1 Rezeptor ist ein relativ neues Protein, das zu der Familie der Immunglobuline gehört. Auf der Suche nach neuen Rezeptoren der direkten Immunantwort, die dem DAP12 Immunrezeptor ähnlich sind, wurde der Trem-1 Rezeptor entdeckt. Trem-1 kommt auf der Oberfläche von Granulozyten, von Monozyten und von Makrophagen vor. Er ist membrangebunden, besitzt eine extrazelluläre Ig-Liganden Bindungsstelle und hat eine kurze intrazelluläre Domäne (Bouchon, Dietrich, and Colonna 4991-95). Trem-1 hat Ähnlichkeiten mit dem NK-Rezeptor NKp44 (Cantoni

et al. 787-96) und dem CMRF-35-Rezeptor auf Leukozyten (Jackson et al. 1157-63).

Das Trem-1 Gen ist auf dem Chromosom 6p21 lokalisiert. Dieser Gen-Cluster beinhaltet außerdem den oben genannten Rezeptor NKp44 und Trem-2. Insgesamt gehören zu der Trem Familie die Rezeptoren Trem-1, -2, -3,-4,-5 und der Trem like transcript Rezeptor (TLT-1).

Trem-1 in der akuten Entzündung

Trem-1 ist ein Rezeptor, der an der akuten Entzündungsantwort beteiligt ist und diese zum Teil initiiert und verstärkt. Versuche haben gezeigt, dass die Trem-1 Expression auf Zellen aus bakteriell entzündlichem Gewebe erhöht ist, nicht aber bei nichtinfektiösen Erkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Vasculitiden (Bouchon et al. 1103-07). Erstmals wurden erhöhte Trem-1 Werte bei Granulozyten und Monozyten bei Patienten mit durch Staphylokokken und Bartonella henselae verursachter Faszitis gemessen.

Laborversuche haben gezeigt, dass eine Stimulation des Trem-1 Rezeptors mit monoklonalen Antikörpern zu einer Sekretion von TNF- α , IL-8 und MCP-1 und zu einem Ca²⁺ Einstrom, einer Tyrosinphosphorylierung und zu einer Degranulation neutrophiler Granulozyten führt (Bouchon, Dietrich, and Colonna 4991-95).

Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten wird hierbei durch das intrazelluläre Adapterprotein DAP12 vermittelt (McVicar et al. 32934-42). Vom transmembranen Trem-1 Rezeptor wird das Signal nichtkovalent an das intrazelluläre Adapterprotein DAP12 weitergeleitet. Nach Aktivierung einer Prokinase mit dem Namen SYK (Splean Tyrosin Kinase) führt die Phosphorylierung weiterer Komplexe (z.B. ERK) am Ende zu einer Calcium-Mobilisation, einer Cytoskelett Neuordnung und einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren mit einer Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen (McVicar et al. 32934-42) (siehe Abbildung 2). In vitro Blockadeexperimente des Trem-1 Rezeptors bei Mäusen mit Gabe von LPS haben gezeigt, dass die starke Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen gemildert werden konnte und es so zu einer vorübergehenden Protektion kam (Bouchon et al. 1103-07). Somit

wird deutlich, dass Trem-1 an der zellulären Vermittlung der Entzündungsantwort beteiligt ist.

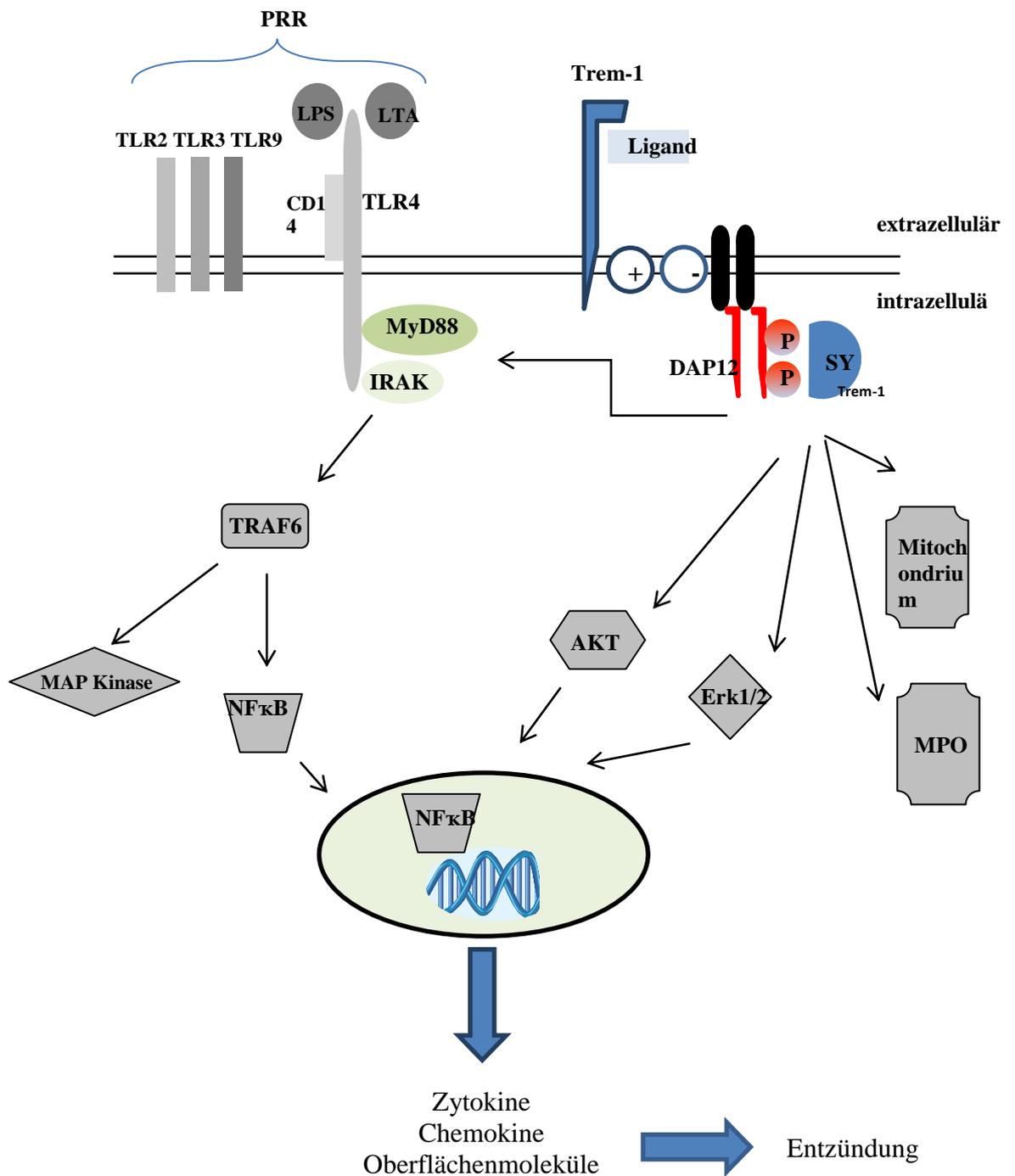


Abbildung 2: Trem-1 Signalkaskade

Soluble-Trem-1 (sTrem-1)

Neben der membrangebundenen Form des Trem-1 wurde in dem Blut von Patienten mit Endotoxämie eine lösliche Form des Trem-1 – auch sTrem-1 genannt- gefunden (Knapp et al. 7131-34). Zusätzlich konnte sTrem-1

auch in den Zellkulturüberständen von stimulierten Monozyten und Neutrophilen nachgewiesen werden (Gibot et al. 9-15). Bisher ist noch nicht bekannt, wie es zu dieser löslichen Form des Trem-1 kommt bzw. welche genaue Funktion ihr zukommt. Eine Arbeitsgruppe konnte bei Neutrophilen unter LPS-Stimulation eine erhöhte sTrem-1 Konzentration messen. Weitere Versuche haben gezeigt, dass die sTrem-1 Erhöhung mit einer gesteigerter Protein de Novo Synthese einhergeht und somit die Neutrophilen sTrem-1 produzieren und es direkt oder bei Bedarf freisetzen können (Mahdy et al. 492-95).

Andere Autoren vermuten, dass das sTrem-1 vielmehr die gelöste Form des membrangebundenen Trem-1 Rezeptors ist. Über einen noch unbekanntem Mechanismus löst sich die extrazelluläre Domäne des Trem-1 Rezeptors und man kann diese Form als sTrem-1 messen (Gingras, Lapillonne, and Margolin 817-24).

Fragestellung und Zielsetzung

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Wie sind die Mustererkennungsrezeptoren (PRR) in der bakteriellen Sepsis im Vergleich zum nichtseptischen Menschen auf PMN und Monozyten exprimiert?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Schwere der Sepsis und Rezeptorexpression?
3. Wie ist die antigen-induzierte Zytokinproduktion im VBA im Vergleich zwischen Sepsis und Gesunden sowie in den verschiedenen Sepsisschweregraden?
4. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Rezeptorexpression und Zytokinproduktion?
5. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Rezeptorexpression und Hyporesponsibilität?
6. Verhalten sich der Trem-1 Rezeptor und s-Trem1 in oben genannten Fragen anders als die anderen PRR?

Material und Methoden

Studiendesign und Untersuchungskollektive

Untersuchungskollektiv

Patienten mit *E-coli* Sepsis:

In die Studie wurden insgesamt 22 Patienten mit bakterieller *E. coli* Sepsis aufgenommen. Eine positive Blutkultur musste vorliegen.

Probandenkollektiv:

Der Studie dienten 6 gesunde Probanden als Kontrolle.

Einschlusskriterien

- der Einschluss erfolgte bei Vorliegen einer Sepsiserkrankung
- Alter >18 Jahre
- kultureller Nachweis einer *E.coli* Bakteriämie
- schriftliche Einwilligung

Ausschlusskriterien

- bekannter Immundefekt
- bekannte Neoplasie
- systemische Glukokortikoidtherapie (mehr als 20mg Prednisonäquivalent)
- systemische Zytostatikatherapie
- HIV- Infektion
- Immunglobulinmangel
- Schwangerschaft
- Alter < 18 Jahre

Studienablauf und Erfassung der klinischen Daten

Die klinischen Parameter wurden am Aufnahmetag, am Tag der Blutentnahme (max. 48 h nach Aufnahme) und 7 Tage nach Aufnahme

dokumentiert. Die Patienten wurden von den internistischen Stationen und der internistischen Intensivstation des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck rekrutiert.

Erfassung des Schweregrades

Klinische Parameter wurden zu allen Zeitpunkten dokumentiert. Hierzu zählten Vitalparameter wie Körpertemperatur, Atemfrequenz, Puls und Blutdruck. Zusätzlich wurden zahlreiche Laborparameter, insbesondere die Entzündungszeichen, notiert. Neben dem Beatmungsstatus gingen weitere Daten, wie die medikamentöse Therapie, die Mortalität, die Komplikationen und die Aufenthaltsdauer im Krankenhaus mit in die Dokumentation ein. Insbesondere die Grundkrankheiten und Risikofaktoren wurden protokolliert.

Verschiedene Scores und Bewertungssysteme wurden verwendet:

- a. APACHE II
- b. APS
- c. Sepsis Score
- d. Mortalität

a. APACHE

Die klinischen Parameter wurden für den APACHE II Score (akute physiology, age, chronic health Evaluation) verwendet. Dieses Bewertungssystem dient dazu den klinischen Schweregrad und die Prognose erkrankter Patienten abzuschätzen. Neben dem Alter (Abbildung 3) fließen auch die Grundkrankheiten anhand eines Punktesystems mit in die Bewertung ein. Diese werden Chronic Health Points genannt (Abbildung 4).

Der APACHE II Score setzt sich nun aus Altersbewertung + CHP + APS zusammen. Der ansteigende Score ergibt einen Wert von 0 bis 71 und kann eine Aussage über die Mortalität intensivpflichtiger Patienten geben.

| Alter | Punkte |
|-------|--------|
| ≤ 44 | 0 |
| 45-54 | 2 |
| 55-64 | 3 |
| 65-74 | 5 |
| ≥ 75 | 6 |
| | |

Abbildung 3: Altersberechnung

| <i>Chronic health points (CHP)</i> | |
|--|---|
| Leber (in Biopsie nachgewiesene Zirrhose und dokumentierte portale Hypertension oder frühere Episode eines hepatischen Leberversagens) | 5 |
| Kardiovaskulär (NYHA IV) | 5 |
| Respiratorisch (schwere COPD, Hyperkapnie, O2 Therapie zuhause, pulmonale Hypertension) | 5 |
| Renal (dialysepflichtige NI) | 5 |
| Immunkompromittiert | 5 |
| Punkte | |

Abbildung 4: Chronic health points

b. APS

Ein weiterer Bestandteil des APACHE II Scores ist der Acute Physiology Score (APS). Hierbei werden einige Parameter erfasst, welchen dann, je nach pathologischer Veränderung, ein bestimmter Punktwert zugeordnet wird. Diese Punktwerte werden mit dem Ergebnis des Glasgow Coma Scale verrechnet und bilden den Acute Physiology Score (siehe Abbildung 6).

| Glasgow Coma Scale (GCS) | | |
|---------------------------------------|--------------------------|---|
| 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 |
| | keine verbale Reaktion | 1 |
| motorische Reaktion (auf Schmerzreiz) | befolgt Aufforderung | 6 |
| | gezielte Schmerzabwehr | 5 |
| | Massenbewegung | 4 |
| | Beugesynergien | 3 |
| | Strecksynergien | 2 |
| | keine Reaktion | 1 |
| | | |

Abbildung 5: Glasgow Coma Scale (GCS)

| APS | | | | | | | | | | |
|---|--------|------|----------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|-----------|-------|
| Parameter | Punkte | +4 | +3 | +2 | +1 | 0 | +1 | +2 | +3 | +4 |
| Temp. | | ≥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 ¹ | | ≥160 | 130-159 | 110-129 | | 70-109 | | 50-69 | | ≥49 |
| Herzfrequenz | | ≥180 | 140-179 | 110-139 | | 70-109 | | 55-96 | 40-54 | ≤39 |
| Atemfrequenz | | ≥50 | 35-49 | | 25-34 | 12-24 | 10-11 | 6-9 | | ≤5 |
| A-aDO ₂ o. PaO ₂ : | | | | | | | | | | |
| a) FiO ₂ ≥0,5 A-aDO ₂ ² | | ≥500 | 350-499 | 200-349 | | <200 | | | | |
| b) FiO ₂ < 0,5 PaO ₂ | | | | | | >70 | 61-70 | | 55-60 | <55 |
| art. 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 |
| Serum HCO ₃ ³ | | ≥52 | 41-51,9 | | 32-40,9 | 22-31,9 | | 18-21,9 | 15-17,9 | <15 |
| Natrium (Serum) | | ≥180 | 160-179 | 155-159 | 150-154 | 130-149 | | 120-129 | 111-119 | ≤110 |
| Kalium (Serum) | | ≥7 | 6-6,9 | | 5,5-5,9 | 3,5-5,4 | 3-3,4 | 2,5-2,9 | | <2,5 |
| Creatinin (Serum) ⁴ | | ≥3,5 | 2-3,4 | 1,5-1,9 | | 0,6-1,4 | | <0,6 | | |
| Hk | | ≥60 | | 50-59,9 | 46-49,9 | 30-45,9 | | 20-29,9 | | <20 |
| Leukozyten | | ≥40 | | 20-39,9 | 15-19,9 | 3-14,9 | | 1-2,9 | | <1 |
| 15 - Glasgow Coma Score | | | | | | | | | | |
| APS (gesamt) | | | | | | | | | | |

Abbildung 6: Acute Physiology Score (APS)

c. Sepsis Score

Zurzeit wird die Sepsis nach den Kriterien des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine definiert. Sepsis ist

demnach definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutkreislauf zusammen mit einer Reaktion des Organismus auf diese Invasion (Bone et al. 1644-55).

Es hat sich heutzutage ein Score System durchgesetzt, mit dem man die Patienten klinisch in verschiedene Gruppen und Schweregrade einteilen kann.

Sepsis:

Die Sepsis ist eine systemische Reaktion auf eine nachgewiesene Infektion des Körpers. Sie ist charakterisiert durch 2 oder mehrere der nachfolgenden Symptome:

- Temperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$
- Tachykardie >90 Schläge/min
- Tachypnoe >20 Atemzüge/min oder
- $\text{PaCO}_2 <32$ mmHg
- Leukozyten $>12\ 000/\text{mm}^3$, $<4000/\text{mm}^3$ oder $>10\%$ Stabkernige

Schwere Sepsis:

Die schwere Sepsis ist definiert als Sepsis (siehe oben) assoziiert mit Organdysfunktion.

Folgende Parameter definieren die Organdysfunktion:

- Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium
- Arterielle Hypotension: Systolischer Blutdruck ≤ 90 mmHg oder mittlerer arterieller Blutdruck ≤ 70 mmHg für mindestens 1 h trotz adäquater Volumenzufuhr; andere Schockursachen ausgeschlossen
- Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30 Prozent innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl $\leq 100\ 000/\text{mm}^3$. Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung muss ausgeschlossen sein.
- Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 75$ mm Hg unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von ≤ 250 mm Hg unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.

- Renale Dysfunktion: Eine Diurese von $\leq 0,5$ ml/kg/h für wenigstens 2 h trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins > 2 fache, oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.
- Metabolische Azidose: Base Excess ≥ -5 mmol/l oder eine Laktatkonzentration $> 1,5$ fache oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.

Septischer Schock:

Eine schwere Sepsis mit einer sepsisinduzierten Hypotonie, die trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution nicht zu therapieren ist, so dass eine Katecholamintherapie notwendig wird, wird als septischer Schock bezeichnet. Die Hypotension ist gekennzeichnet durch einen systolischen Blutdruck von <90 mmHg oder eine Reduktion von >40 mmHg vom Ausgangswert beim Fehlen anderer Ursachen.

MODS (multiple organ dysfunction syndrom):

Bei mehreren Organdysfunktionen bei einem akut erkrankten Patienten liegt ein „multiple organ dysfunction syndrom“ vor. Hauptkomponenten sind:

- akute respiratorische Insuffizienz und akutes Lungenversagen
- akute kardiozirkulatorische Insuffizienz und Herz- Kreislauf- Schock
- akute renale Insuffizienz und akutes Nierenversagen
- akute gastrointestinale Läsionen und Stressblutungen
- akute Cholezystitis und Gallenblasenperforation
- akute Enterokolitis, akute Pankreatitis
- akute Blutgerinnungsstörungen und disseminierte intravasale Gerinnung

c. Mortalität

Daten zur Mortalität wurden erfasst.

Probengewinnung

Für die weiteren Untersuchungen wurde den Patienten innerhalb der ersten 48h nach Aufnahme Blut abgenommen.

Bei der Blutabnahme wurden folgende Proben entnommen:

- 30 ml Natriumcitrat → für die Zellisolation und spätere Antikörpermarkierung
- 2,6 ml Lithiumheparin → für das Vollblutassay
- 5 ml EDTA Vollblut → zur Plasmagewinnung
- 5 ml Serum → zur Serumgewinnung
- 5 ml EDTA Vollblut → zur Konservierung für evtl. spätere Messungen

Vorbereitung und Messung der Oberflächenrezeptoren auf den Monozyten und PMN per FACS

Zellisolation

Monozyten

Die Isolation erfolgt anhand einer Dichtegradientenzentrifugation. Diese wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zur Isolation der Monozyten aus Vollblut wird zuerst PBS 1:10 verdünnt und mit 10 ml Ficoll aufgefüllt. 15 ml des Natriumcitratblutes werden im Verhältnis 1:2 mit 1x PBS verdünnt und vorsichtig zwischen die PBS/ Ficoll Schicht gegeben. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass es zu keiner Durchmischung der Flüssigkeiten kommt. Anschließend Zentrifugation bei 1600 U/min für 20 Minuten. Die sich nun gebildete Schicht aus Monozyten wird anschließend mit einer Pasteurpipette abgenommen und mit 1x PBS auf insgesamt 25ml aufgefüllt. Nach einem erneuten Zentrifugieren bei 1700 U/min für 6 Minuten zeigt sich am Boden ein Pellet, welches zum größten Teil aus Monozyten besteht. Es wird eine definierte Menge RPMI

Medium zugeführt. Danach erfolgt durch mikroskopische Auszählung die Ermittlung der Konzentration.

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten

Bei der MNK Isolation der Monozyten bildet sich nach dem Zentrifugieren ein Zellen/ Erythrozyten-Sediment am Boden der Messröhrchen. In diesem Sediment befinden sich, neben diversen anderen Zellen, auch die Granulozyten. Das Sediment wird in einen 50 ml Messzylinder überführt und mit PVA aufgefüllt. Nachdem es gut durchgemischt wurde, muss es für ca. 15- 30 Minuten unter der Steribank ruhen. Nach diesem Zeitraum pipettiert man den Überstand in ein 50 ml Röhrchen und zentrifugiert diesen bei 1600 rpm für 10 min.. Nach dem Entfernen des Überstandes müssen die restlichen Erythrozyten aus dem PMN Pellet entfernt werden. Dem Pellet wird dafür 5 ml H₂O unter Schwenken zugeführt. Der Prozess der Lyse wird nach 45 sec. durch die Gabe von 5ml 2x D-PBS gestoppt. Danach erfolgt das erneute Zentrifugieren und die Aufnahme des Pellets in eine definierte Menge RPMI Medium.

Tabelle 1: Material Zellisolation

| Zellisolation | |
|----------------------------------|------------------------|
| Geräte | Firma |
| 50ml Zellkulturflaschen | Greiner |
| Brutschrank | Heto, Cell House200 |
| Vortexer | NeoLab |
| Eppendorf-Küvetten | Sarstedt, USA |
| Zentrifuge | Hettich, Rotina 35 |
| Einwegzellkratzer | Sarstedt, USA |
| 50ml Röhrchen | Greiner |
| 15ml Röhrchen | Greiner |
| 10ml Spritzen | Becton Dickinson |
| Zentrifuge | Hetich, Rotina 35 |
| Pipetten | Eppendorf Research |
| Plastikpasteurpipette | Sarstedt, USA |
| Neubauerzählkammer | Brand |
| 24-well tissue plates | Biochrome, Berlin |
| Chemikalien | Firma |
| RMPI- Medium 1640 | Biowhittaker |
| Lipopolysaccharid (LPS), 1µg/ml, | Sigma, St. Louis, |

| | |
|------------------------------|--------------|
| E. coli, Serotyp 026:B6 | USA |
| Bicoll/Ficoll | Biochrome |
| 1*PBS | Dubeccos |
| 2*PBS | Dubeccos |
| Polyvinylalkohol | Merck |
| endotoxinfreies RMPI- Medium | Biowhittaker |
| 1640 | |
| 10µl Triptanblau | Sigma |

Cytospin

Zur Auszählung und Dokumentation wurden sowohl von den Monozyten als auch von den Neutrophilen Cytospinpräparate angelegt. Hierfür wurden 100µl der Zellsuspension verwendet und mit Triptanblau eingefärbt.

Vorbereitung zur Flowzytometrie

Die Antikörpermarkierung und spätere flowzytometrische Messung der Expression wurde sowohl an unstimulierten Zellen, als auch an LPS-stimulierten Monozyten und PMNs durchgeführt. Ein Teil der MNKs und PMNs kann direkt der Antikörpermarkierung zugeführt werden, ein anderer Teil wird erst in eine Zellkultur gegeben, um dort eine LPS Stimulation durchführen zu können.

Anlage einer Zellkultur

Die Zellkultur wurde direkt in den FACS Röhrchen angelegt. Hierzu wurde 100µl Zellsuspension (ca. 10Mio Zellen) in 9890 µl Medium gegeben. Zu der Suspension wurde dann 10µl LPS appliziert und für 3 h bei 37°C bebrütet.

Nach 3 h Entnahme der Zellkultur, gründliches Vortexen und anschließend Zentrifugation für 5 min bei 2200 RPM. Nun sollten sich die bebrüteten Zellen am Boden der FACS Röhrchen befinden. Nach Entfernung des Überstandes aufnehmen der Zellen in 100 µl FACS Puffer. Die Zellen sind nun für die AK-Markierung vorbereitet.

Neben der Versuchsreihe mit LPS Stimulation wurde auch eine Kontrollreihe ohne LPS angelegt.

Antikörpermarkierung

In die FACS Röhren werden 100 µl der MNK und PMN Zellsuspension gegeben (1×10^6 Zellen). Danach erfolgt die Zugabe von 5 µl des entsprechenden Antikörpers. Nach gründlichem Vortexen ist eine Inkubationszeit von 20 Min. bei 4°C notwendig. Die Markierung sollte in abgedunkelten, kühlen Verhältnissen erfolgen. Nach der Inkubation erfolgt eine Zellwaschung mit der Zugabe von 1 ml FACS Puffer. Im Anschluss an eine Zentrifugation (5 min bei 1550 rpm) werden die Zellen in 100 µl FACS Puffer aufgenommen und sind somit für die FACS Messung vorbereitet.

Insgesamt bestehen 3 Versuchsreihen:

- PMNs und MNKs vor Zellkultur
- PMNs und MNKs nach Zellkultur ohne LPS
- PMNs und MNKs nach Zellkultur mit LPS

Folgende Antikörper mit den jeweiligen Isotypen wurden verwendet:

PMN extrazellulär:

- IgG2a PE
- TLR2 AK
- TLR4 AK
- IgG1 PE
- Trem-1 AK

Monozyten extrazellulär:

- IgG2a PE
- TLR2 AK
- TLR4 AK
- CD14 AK
- IgG1 PE
- Trem-1 AK
- IgG2b PE
- HLA-DR AK

Durchflusszytometrie

Anhand einer Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) können die physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen analysiert werden. Durch diese Form der Zellanalyse ist man in der Lage durch eine Antigen- Antikörper Reaktion quantitative Informationen über Zellen zu erlangen.

Der zu untersuchenden Zellsuspension wird ein - mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter - Antikörper hinzugefügt. Es gibt eine direkte und indirekte Färbung. Bei der direkten Färbung sind Antikörper und der Fluoreszenzfarbstoff schon aneinander gebunden und können in einem Schritt den zu untersuchenden Zellen hinzugefügt werden. Bei der indirekten Methode erfolgen zuerst eine Antikörperbindung und später die Zugabe des Farbstoffes.

Die Messungen wurden mit einem FACS Calibur der Firma Becton Dickinson (San Jose, USA) durchgeführt. Die Zellen wurden bei einer Konzentration von 10mio/ml in Facsröhrchen gebracht und nach o.g. Vorgehen markiert. Über einen Ansaugstutzen gelangen die Zellen in eine Kapillare, in der sie einzeln der optischen Bank, in der sich der Laser befindet, zugeführt werden können.

Die nun markierten Zellen laufen einzeln an einem Laserstrahl eines Argonlaser (488nm) vorbei. Durch den Laser werden die Elektroden des Fluoreszenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau gehoben. Danach fallen die Elektroden wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau ab und emittieren Energie in Form von Photonen. Diese kann nun durch einen speziellen Detektor, eine Fotodiode, gemessen werden. Neben der Fluoreszenzintensität werden extra-/intrazelluläre Strukturen und die Zellgröße bestimmt. Dies erfolgt mit dem Foward- Scatter (FSC), der die Streuung des Laserlichtes bei einem Winkel von 0°-10° misst und Aussagen über die Zellgröße macht. Mit einem Side – Scatter (SSC) wird die Ablenkung in einem 90° Winkel erfasst. Es können Informationen über die Granularität gewonnen werden (siehe Abbildung 7 und 8).

Diese Signale können mit einer Software in einem Diagramm graphisch dargestellt werden und erlauben so eine Aussage über die Prozentanteile

einzelner Zellpopulationen. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind ein Maß für die Antigenmenge pro Zelle.

Die Auswertung der Daten erfolgt über spezielle Computerprogramme. In speziellen Histogrammen können für einzelne Zellpopulationen Gates (Fenster) gesetzt werden, von denen man dann gezielt Messwerte erhalten kann.

Insgesamt existiert eine Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoffen. Für diese Messungen wurde Phycoerythrin (PR) verwendet.

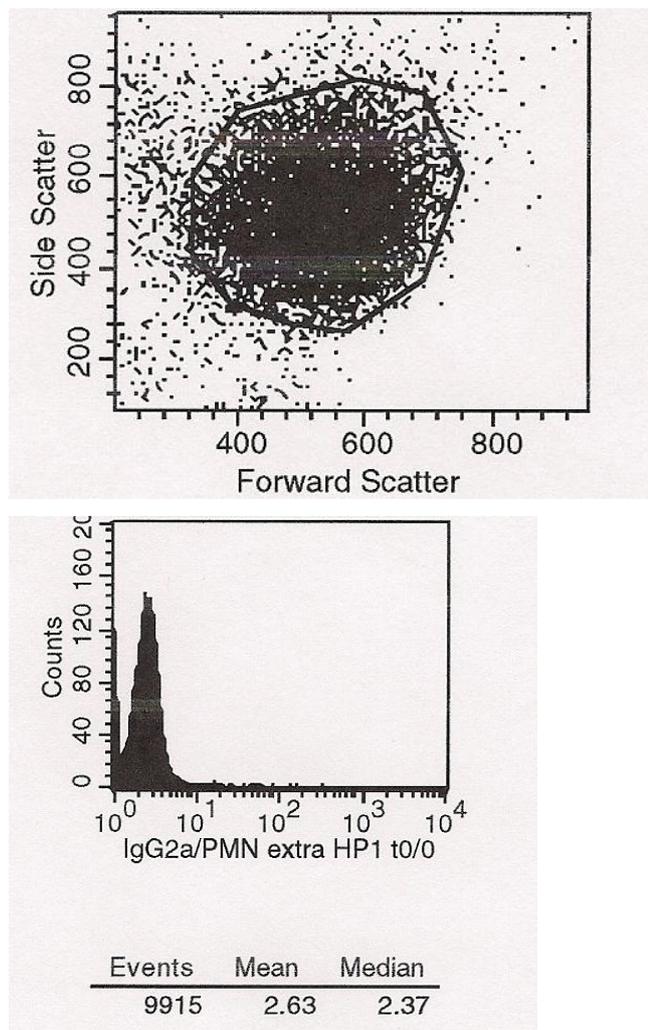


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Darstellung von PMNs im SSC und FSC

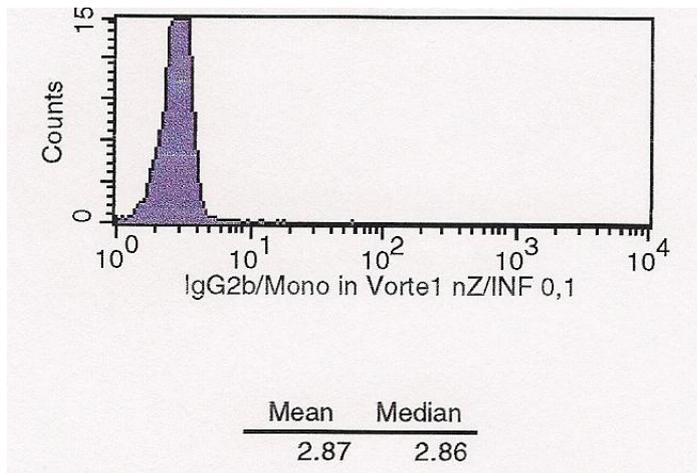
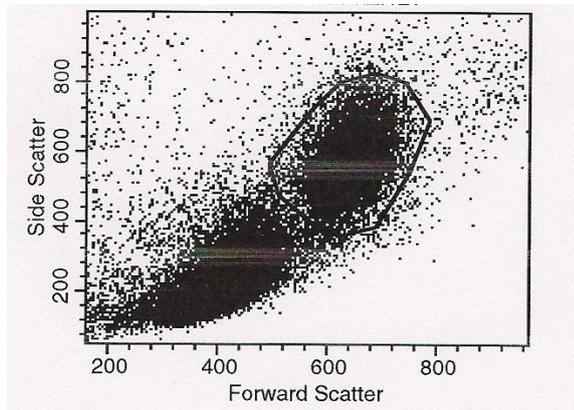


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Darstellung der Monos in SSC und FSC

Tabelle 2: Material Antikörpermarkierung und FACS Messung

| Antikörpermarkierung und FACS-Messung | |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| Geräte | Firma |
| Facs-Röhrchen | Falcon |
| Vortexer | NeoLab |
| Kühlschrank | Bosch |
| Zentrifuge | Hettich, Rotina 35 |
| FACS-Scan | Becton Dickinson, Heidelberg |
| CellQuest Software | Becton Dickinson |
| Chemikalien | Firma |
| Isotyp IgG2a | eBioscience |

| | |
|-------------------|-------------|
| TLR2-Antikörper | eBioscience |
| TLR4-Antikörper | eBioscience |
| CD14-Antikörper | eBioscience |
| Isotyp IgG2b | eBioscience |
| HLADR- Antikörper | eBioscience |
| Isotyp IgG1 | R&D Systems |
| Trem-1 Antikörper | R&D Systems |
| 1*PBS | Dubeccos |
| FACS-Puffer | Sigma |

Vollblutassay (VBA)

Bei einem Vollblutassay wird patienteneigenes Vollblut unter Zuführung von Medium mit einem Stimulus inkubiert. Die im Blut befindlichen Immunzellen werden durch den jeweiligen Stimulus angeregt und führen eine Immunantwort aus. Bei diesen Untersuchungen soll die durch verschiedene Stimuli erzeugte Zytokinausschüttung ermittelt werden. Nach einem definierten Zeitintervall kann die Zytokinkonzentration im Überstand ermittelt werden.

Als Stimuli fungierten

- LPS (1µg)
- LTA (10mg/ml)
- PAM

Der weitere Versuchsaufbau bestand insgesamt aus 4 Ansätzen (unstimuliert, LPS, LTA, PAM), denen jeweils 100 µl heparinisiertes Vollblut zu Grunde lag. Als Medium wurde RPMI mit 1% Pen./Strep. verwendet.

Das Ansatzschema war wie folgt:

Tabelle 3: Ansatzschema VBA

| Ansatz | Medium | Vollblut | LTA | LPS | PAM | UNST. |
|--------|--------|----------|-------|-------|-----|-------|
| 1 | 900 µl | 100 µl | - | - | - | ✓ |
| 2 | 850 µl | 100 µl | - | 50 µl | - | - |
| 3 | 890 µl | 100 µl | 10 µl | | | - |

| | | | | | | |
|---|--------|--------|--|--|------|---|
| 4 | 850 µl | 100 µl | | | 50µl | - |
|---|--------|--------|--|--|------|---|

Nach vorsichtigem Vortexen wurden die Ansätze bei 37°C und 5% CO² inkubiert. Nach 24 h wurde der Überstand entnommen und bei 2200 U/min zentrifugiert, um mögliche Restzellen zu entfernen. Im Anschluss wurde der jeweilige Inhalt in Eppendorf Gefäße (jeweils 210µl) aliquotiert und für eine spätere Zytokinbestimmung bei – 80°C eingefroren.

Tabelle 4: Material VBA

| Vollblut – Assay | |
|---|--------------------------------|
| Geräte | Firma |
| Monovetten, Lithium-Heparin, 5ml | Sarstedt |
| Pipetten, Combitips (100-1000µl) | Eppendorf |
| Polypropylen-Röhrchen, 5 ml | Greiner |
| Brutschrank | Heto, Cell House200 |
| Gefriertruhe Nuaire | Zapf Instrumente |
| Multipipette | Eppendorf |
| Vortexer | NeoLab |
| 15ml Röhrchen | Greiner |
| Eppendorf-Küvetten | Sarstedt, USA |
| Zentrifuge | Hettich, Rotina 35 |
| Chemikalien | Firma |
| RPMI-Medium 1640 | Biowhittaker |
| Penicillin / Streptomycin 1% | Gibco |
| Lipopolysaccharid (LPS), 1µg/ml, E. coli, Serotyp 026:B6 | Sigma, St. Louis, USA |
| Lipoteichoic Acid (LTA), 100 µg/ml, Staph. Aureus | Sigma L2515, St. Louis, USA |

Gewinnung von Serum und Plasma

Für eine spätere Zytokinbestimmung aus Serum und Plasma wurde den Patienten und Probanden ebenfalls Blut entnommen und aufbereitet. Nach Zentrifugation des EDTA Blutes und des Plasmaröhrchens bei 2200 U/min wurde der Überstand in ein 15ml Röhrchen überführt. Um Restzellen zu entfernen, erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 2200 U/min. Zur Aufbewahrung wurden das Plasma und Serum in Eppendorf Gefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Tabelle 5: Material Serum- und Plasmakonservierung

| EDTA-Plasma und Serum Konservierung | |
|--|-----------------------|
| Geräte | Firma |
| EDTA-Röhrchen | Sarstedt, USA |
| Serum-Röhrchen | Sarstedt, USA |
| 15ml Röhrchen | Greiner |
| Zentrifuge | Hettich, Rotina 35 |
| Pipetten | Eppendorf Research |
| Eppendorf-Küvetten | Sarstedt, USA |

Elisa Messung

Eine wichtige Methode zum empfindlichen und quantitativen Nachweis von biologischen Molekülen ist der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Elisa). Moleküle können enzymatisch markiert, durch eine Farbreaktion sichtbar und später mit einem Photometer gemessen werden.

Bei den verwendeten Elisass handelt es sich um „solid phase sandwich Elisa“. Die Mikrotiterplatte ist meist mit dem zu messenden Zytokin vorbeschichtet: diesen nennt man auch coating Antikörper. Die zu messende Probe wird in eine Standardverdünnung aufgenommen – welche meist in Vorversuchen ermittelt werden muss - und auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. In der ersten Inkubationszeit kommt es nun zu einer Bindung zwischen dem Antigen, welches in diesem Fall das Zytokin ist, und dem spezifischen Antikörper. Nach einem Waschschrift wird ein Detection- Antikörper hinzugefügt, an dessen Ende meist noch ein enzym-linked Antikörper hängt. Es entsteht so ein Antikörper- Antigen- Antikörper Komplex. Nach Inkubation und Waschvorgang katalysiert das gebundene Enzym nun nach Zugabe einer Substratlösung eine Farbreaktion. Die Beendigung dieser Reaktion erfolgt durch eine spezielle Säure.

Anhand eines Photometers wird nun die Konzentration in der Probe gemessen. Diese verhält sich proportional zur Intensität der Farbreaktion.

- IL-10 Solid phase sandwich elisa; Durchführung gemäß Arbeitsvorschrift; Biosource Interational
- Il-6 Solid phase sandwich elisa; Durchführung gemäß Arbeitsvorschrift; Biosource Interational
- Il-8 Meßbereich: 15,6 – 1000 pg/ml ;solid phase sandwich elisa; Durchführung gemäß Arbeitsvorschrift; Biosource Interational
- TNF-a Solid phase sandwich elisa; Durchführung gemäß Arbeitsvorschrift; Biosource Interational
- sTrem-1 solid phase sandwich elisa; Durchführung gemäß Arbeitsvorschrift; R & D Pharma
- PCT Messbereich 0,5 – 500 ng/ml ;solid phase sandwich elisa; Durchführung gemäß Arbeitsvorschrift; Brahms
- IP-10 Sensitivität: <5.0 pg/ml ;solid phase sandwich elisa; Durchführung gemäß Arbeitsvorschrift; Biosource Interational

Tabelle 6: Material Elisa

| ELISA | |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Geräte | Firma |
| Elisa-Reader | SLT Instruments |
| Pipetten | Eppendorf Research |
| Eppendorf-Küvetten | Sarstedt, USA |
| Chemikalien | Firma |
| Immunoassay Kit, Human IL-10 | BioSource, Solingen |
| Immunoassay Kit, Human IL-6 | BioSource |
| Immunoassay Kit, Human TNF- α | BioSource |
| Immunoassay Kit, Human IL-8 | BioSource |
| Immunoassay Kit,PCT | Brahms |
| Immunoassay Kit, IP-10 | BioSource |
| Immunoassay Kit, sTrem-1 | R & D |

Statistische Auswertung

Für gepaarte nicht parametrische Stichproben kam der Wilcoxon Test zur Anwendung. Die Signifikanzprüfung für nicht gepaarte, nicht

parametrische Stichproben erfolgte anhand des Mann-Whitney-U-Test. Korrelationen wurden mit der Rangkorrelation nach Spearman errechnet. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Statistica Version 5.1 StatSoft verwendet. Weitere statistische Auswertungen und die graphische Darstellung erfolgten mit Graph Pad Prism 4.03. Die Ergebnisse wurden als Mean \pm Standardabweichung dargestellt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Ethikantrag

Die Studie wurde durch das Ethikkomitee der Universität zu Lübeck gebilligt. Die Patienten haben schriftlich einer Einwilligungserklärung zugestimmt. Zusätzlich wurde ein Informationsbogen ausgehändigt. Als die Patienten nicht bei Bewusstsein waren, erfolgte die Einwilligung durch direkte Angehörige.

AZ:04-157

Ergebnisse

Klinische Daten

In die Studie wurden insgesamt 22 Patienten mit bakterieller *E. coli* Sepsis aufgenommen. Eine positive Blutkultur musste vorliegen. Das Patientenkollektiv wurde in 2 Gruppen aufgeteilt (nach dem Sepsis Score):

1. Patienten mit Sepsis
→ in der Studie als **leichte Sepsis** bezeichnet
2. Patienten mit severer Sepsis, septischen Schock und MODS (n = 11)
→ in der Studie als **schwere Sepsis** bezeichnet

Tabelle 7 : klinische und demographische Daten der Patienten

| | leichte Sepsis | schwere Sepsis |
|--------|----------------|----------------|
| N | 11 | 11 |
| Sex: m | 3 | 4 |
| Sex: w | 7 | 5 |
| Alter | 74,4 | 70 |

Tabelle 8: Sepsisscore/ APACHE/ APS

| | Leichte Sepsis | Schwere Sepsis |
|----------------------------|-------------------|--------------------|
| Sepsisscore: | | |
| Sepsis | 11 | - |
| Severe Sepsis | - | 6 |
| Septischer Schock | - | 4 |
| MODS | - | 1 |
| APACHE II (p<0,05) | 12 (\pm 1,8) | 23,6 (\pm 3,1) |
| APS (p<0,05) | 4,27(\pm 0,73) | 14,5 (\pm 2,18) |
| Mortalität (p<0,05) | - | 7 |

Die klinischen und demographischen Daten der Patienten sind in Tabellen 7-10 zusammengefasst. Die etablierten Score Systeme für Sepsispatienten (APACHE/ APS) zeigen signifikante (p<0,05) Unterschiede in den beiden Patientenkollektiven. Auch konnten unsere Daten den Stellenwert der laborchemischen Entzündungsparameter (CRP, Leukozyten, PCT) für die Schweregradbeurteilung in der bakteriellen Sepsis bestätigen. Diese sind bei schwer erkrankten Patienten signifikant erhöht. Die maximale Körpertemperatur scheint kein geeigneter Parameter zu sein, um auf den Schweregrad eine Sepsiserkrankung zu schließen.

Aus der Gruppe der Patienten mit leichter Sepsis ist kein Patient verstorben.

Patienten mit einer schweren Sepsis haben eine signifikant längere Verweildauer auf Intensivstationen.

Tabelle 9: Klinische Daten:

| | leichte Sepsis | schwere Sepsis |
|--|----------------|----------------|
| Pos. Blutkultur mit <i>E.coli</i> | 11 | 11 |
| Sepsisursache: | | |
| Urosepsis | 11 | 9 |
| Pneumonie | 0 | 1 |
| Gastrointestinal | 0 | 1 |
| Begleiterkrankungen: | | |
| Diabetes mellitus | 3 | 3 |
| KHK | 4 | 3 |
| Hypertonie | 6 | 5 |
| Niereninsuffizienz | 6 | 0 |
| HPL | 3 | 2 |
| COPD | 3 | 3 |
| Temperatur max (°C) | 37,6(±0,8) | 37,8 (±1,2) |
| CRP (mg/l) | 153 (±27,21) | 219 (±30,93) |
| Leukozyten (Tsd/µl) (p<0,05) | 13,5 (±1,6) | 27,5 (±7,5) |
| Procalcitonin (ng/ml) (p<0,05) | 9 (±15,65) | 80 (±89,4) |
| Tage Intensivstation (Durchschnitt) (p<0,05) | 0,09 | 6 |

Probandenkollektiv:

Der Studie dienten 6 gesunde Probanden als Kontrolle.

Die Probanden waren gesunde, nicht rauchende Männer, deren medianes Alter 62 Jahre betrug.

Ergebnisse für Trem-1 auf Monozyten und PMN

Trem-1 Expression auf Monozyten (Flowcytometrie)

Die Trem-1 Expression auf den Monozyten war bei Patienten (MFI: 28,14 \pm 11,6) im Vergleich zu Probanden (MFI: 14,13 \pm 3,8) signifikant erhöht ($p < 0,03$) (Abbildung 9).

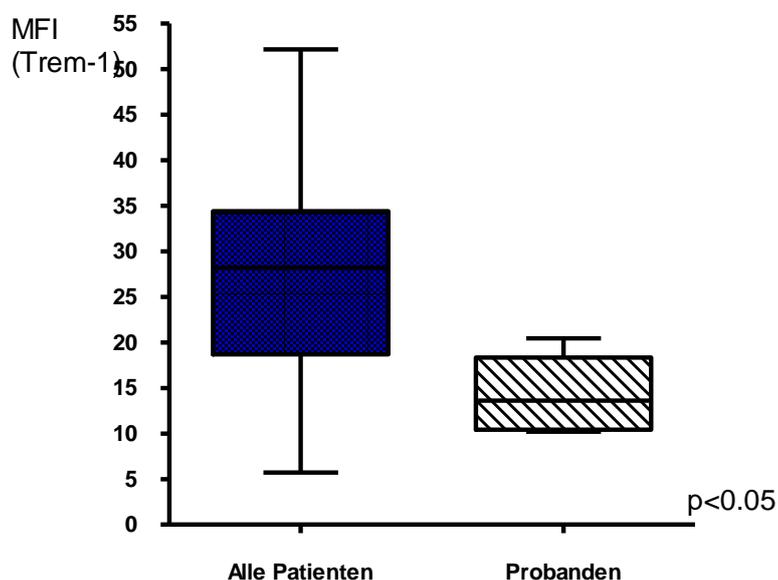


Abbildung 9: Oberflächenexpression Trem-1 auf Monozyten bei allen Sepsispatienten (n=22) und Probanden (n=6)

Patienten mit schwerer Sepsis haben tendenziell eine höhere Trem-1 Expression auf Monozyten als Patienten mit leichter Sepsis. (31,47 \pm 12 vs. 24,54 \pm 19,65 ; $p = 0,07$) (Abbildung10).

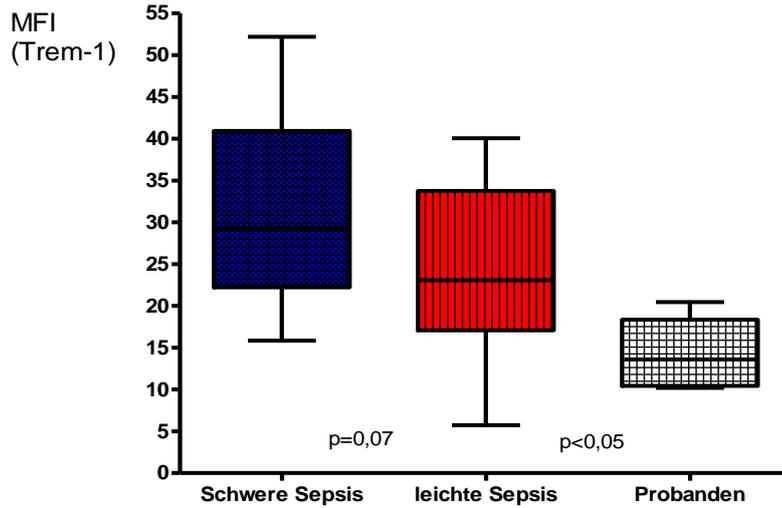


Abbildung 10: Oberflächenexpression Trem-1 auf Monozyten bei Patienten mit schwerer Sepsis (n=11), leichter Sepsis und Probanden (n=6)

Trem-1 Expression auf polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) (Flowcytometrie)

Die Trem-1 Expression auf PMNs war bei Patienten signifikant **höher** als bei Probanden ($p < 0.05$) (MFI: $22,00 \pm 10,09$ vs. $13,56 \pm 3,9$; $p < 0,05$) (s. Abbildung 11).

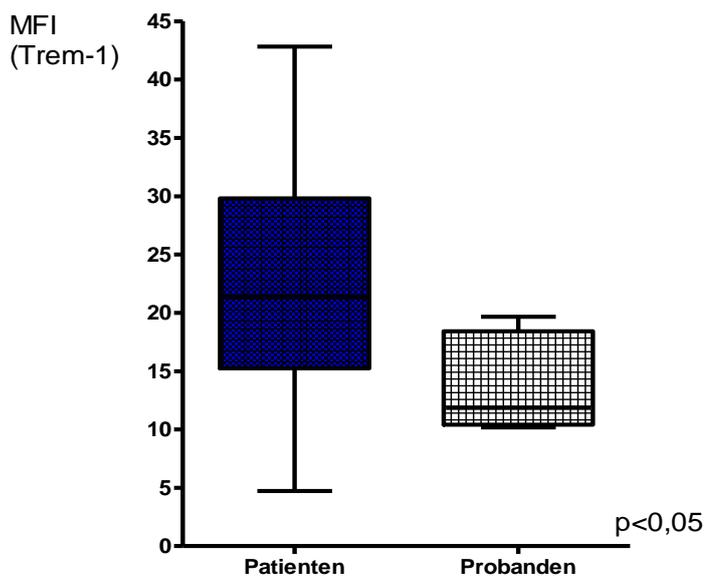


Abbildung 11: Oberflächenexpression Trem-1 auf PMN von Sepsispatienten und Probanden

Patienten mit schwerer Sepsis haben tendenziell eine **niedrigere** Trem-1 Expression auf PMN als Pat. mit leichter Sepsis. (MFI: $19,5 \pm 7,33$ vs $24,00 \pm 11,91$; $p > 0,05$)

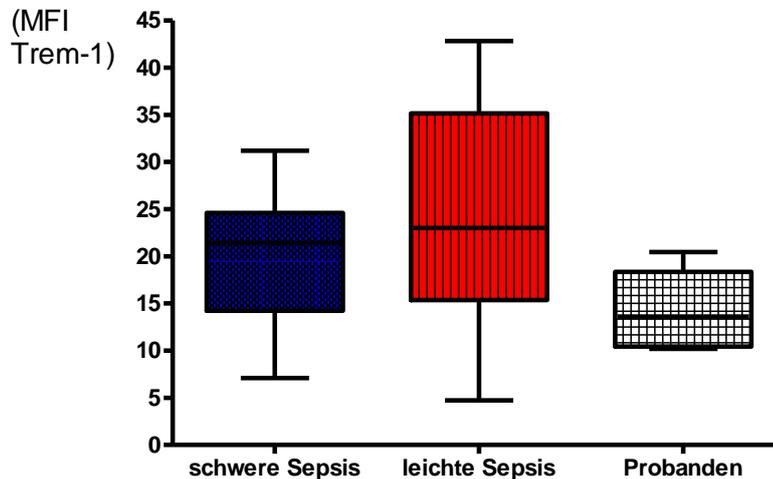


Abbildung 12: Oberflächenexpression Trem-1 auf PMN bei Patienten mit schwerer Sepsis, leichter Sepsis und Probanden

Andere PRR in der bakteriellen Sepsis

Oberflächenexpression auf Monozyten (Flowzytometrie)

Die TLR2 Expression auf Monozyten war bei Sepsispatienten im Vergleich zu Probanden erhöht ($p < 0,05$). Die TLR2 Expression war bei Patienten mit schwerer Sepsis tendenziell **höher** als bei Patienten mit leichter Sepsis ($p > 0,05$).

Die TLR4- Expression auf Monozyten zeigt keine Unterschiede.

Die HLA-DR Expression war bei Sepsis im Vergleich zu Probanden erniedrigt. Patienten mit schwerer Sepsis haben eine signifikant **niedrigere** HLA-DR Expression auf Monozyten als Patienten mit leichter Sepsis ($p < 0,03$).

**Oberflächenexpression auf neutrophilen Granulozyten
(Flowzytometrie)**

Die TLR2 Expression auf PMN war bei Sepsispatienten im Vergleich zu Probanden signifikant erhöht ($p < 0,05$). Patienten mit schwerer Sepsis haben in etwa die gleiche TLR2 Expression auf PMN wie Patienten mit leichter Sepsis.

Die TLR4 Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede.

| | Alle Patienten | Probanden | leichte Sepsis | schwere Sepsis |
|--------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Monozyten | | | | |
| TLR2 | 24,72 ($\pm 7,64$)* | 7,65 ($\pm 0,8$)* | 22,08 (± 83) | 27,57 ($\pm 8,59$) |
| TLR4 | 6,38 ($\pm 1,51$) | 4,5 ($\pm 2,8$) | 6,72 ($\pm 1,62$) | 6,00 ($\pm 1,38$) |
| HLA-DR | 7,79 ($\pm 5,23$) | 9,67 ($\pm 4,4$) | 10,38 ($\pm 5,03$)* | 5,216 ($\pm 4,17$)* |
| Neutrophile | | | | |
| TLR2 | 14,24 ($\pm 6,58$)* | 3,38 ($\pm 1,78$)* | 14,63 ($\pm 6,84$) | 14,15 ($\pm 4,16$) |
| TLR4 | 4,86 ($\pm 1,644$) | 4,5 ($\pm 1,72$) | 5,12 ($\pm 2,09$) | 4,56 ($\pm 0,96$) |

Tabelle 10: TLR2, TLR4, HLA-DR Expression auf Monozyten und PMNs (* = $p < 0,05$)

Immunantwort in der Vollblutstimulation (ELISA)

TNF- α

Die TNF- α Produktion ist bei schwerer Sepsis im Vergleich zu leichter Sepsis im LPS und LTA Stimulationsassay signifikant ($p < 0,043$ und $0,007$) erniedrigt. (LPS: $325,2$ (pg/ml) $\pm 623,8$ vs. $760,6$ (pg/ml) $\pm 745,4$; LTA: $239,5$ (pg/ml) $\pm 381,5$ vs. 1.530 (pg/ml) ± 1.820) ($p < 0,043$ und $0,007$) (siehe Abbildung 13).

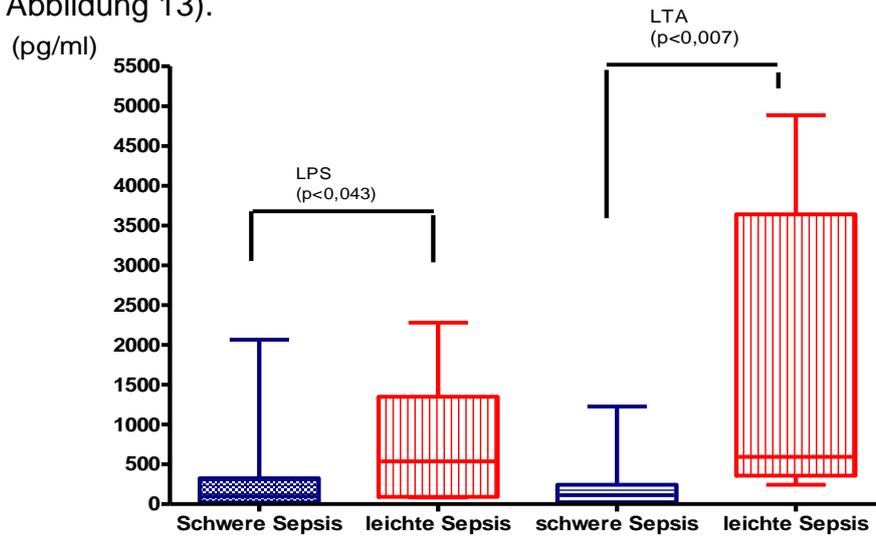


Abbildung 13: TNF- α im VBA unter LPS und LTA Stimulation

IL-10

Die IL-10 Produktion ist bei schwerer Sepsis im Vergleich zu leichter Sepsis im LPS und LTA Stimulationsassay erniedrigt (statistisch keine Signifikanz, bei LTA zeigt sich ein Trend).

(LPS: $12,47$ (pg/ml) $\pm 11,83$ vs. $15,55$ (pg/ml) $\pm 14,13$; LTA: $13,27$ (pg/ml) $\pm 12,50$ vs. $33,83$ (pg/ml) $\pm 17,85$) (siehe Abbildung 14)

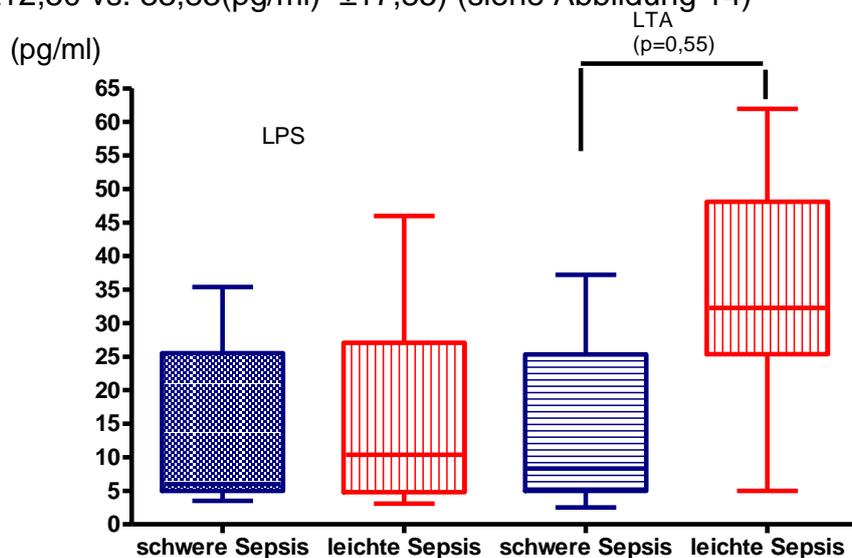


Abbildung 14: IL-10 im Vollblutassay unter LPS und LTA Stimulation

IL-8

Die IL-8 Produktion ist bei schwerer Sepsis im Vergleich zu leichter Sepsis im LTA Stimulationsassay tendenziell erniedrigt (statistisch keine Signifikanz, bei LPS kein Unterschied)

(LPS: 1.217(pg/ml) \pm 1.405 vs. 1.515(pg/ml) \pm 1.026; LTA: 2.002(pg/ml) \pm 2.096 vs. 4.735(pg/ml) \pm 2.925).

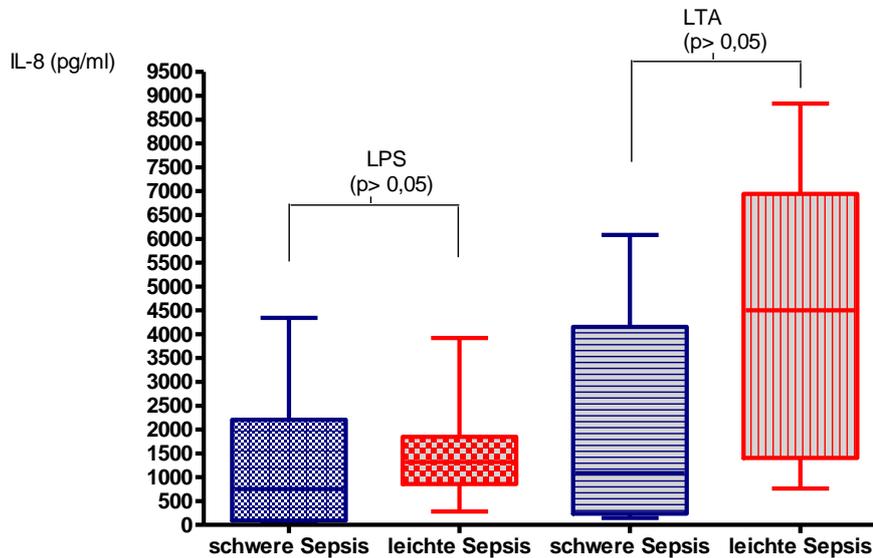


Abbildung 15: IL-8 im VBA unter LPS und LTA Stimulation

IL6

Die IL-6 Produktion ist bei schwerer Sepsis im Vergleich zu leichter Sepsis im LPS und LTA Stimulationsassay tendenziell erniedrigt (statistisch keine Signifikanz). (LPS: 7.200(pg/ml) \pm 6.823 vs. 14.253(pg/ml) \pm 10.714; LTA: 8.871(pg/ml) \pm 12.318 vs. 1.5513(pg/ml) \pm 9.166) (siehe Abbildung 16).

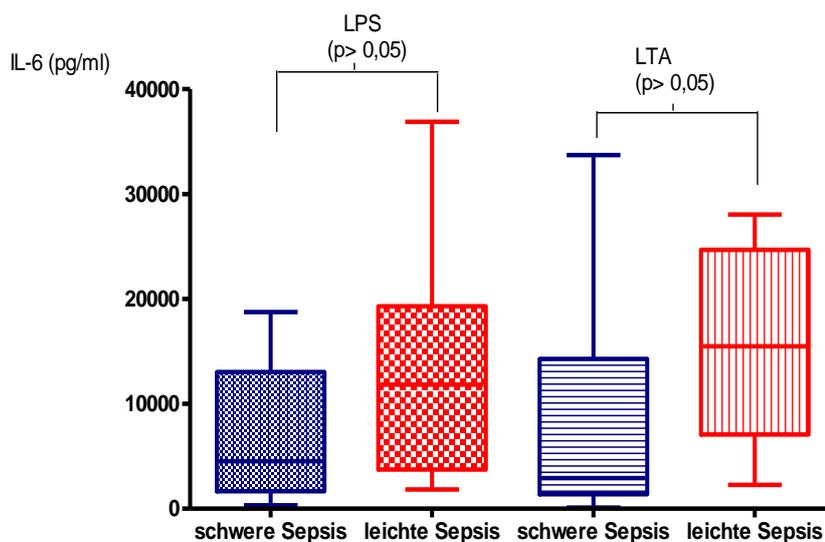


Abbildung 16: IL-6 im VBA unter LPS und LTA Stimulation

Korrelation zwischen den Trem-1 Oberflächenrezeptoren auf PMN und der TNF- α und IL-10 Stimulierbarkeit im Vollblutassay

Unsere Messungen zeigen eine signifikante positive Abhängigkeit der TNF- α und IL-10 Stimulierbarkeit im VBA von der PMN Trem-1 Oberflächenexpression. Je höher die Trem-1 Expression auf PMNs, desto höher ist die Ausschüttung von TNF- α ($p < 0,002$) ($R = 0,78$) und IL-10 ($p < 0,02$) ($R = 0,61$) im VBA (siehe Abbildung 17 und 18).

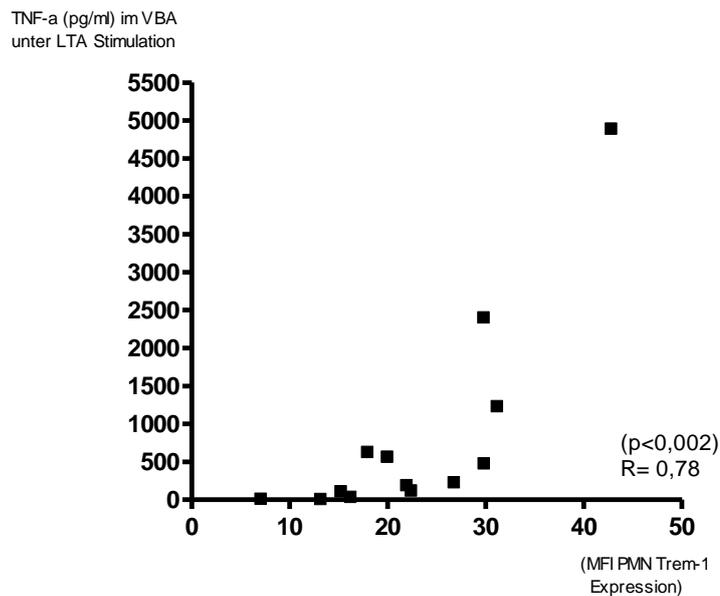


Abbildung 17: TNF- α Stimulierbarkeit in Abhängigkeit von der PMN Trem-1 Oberflächenexpression

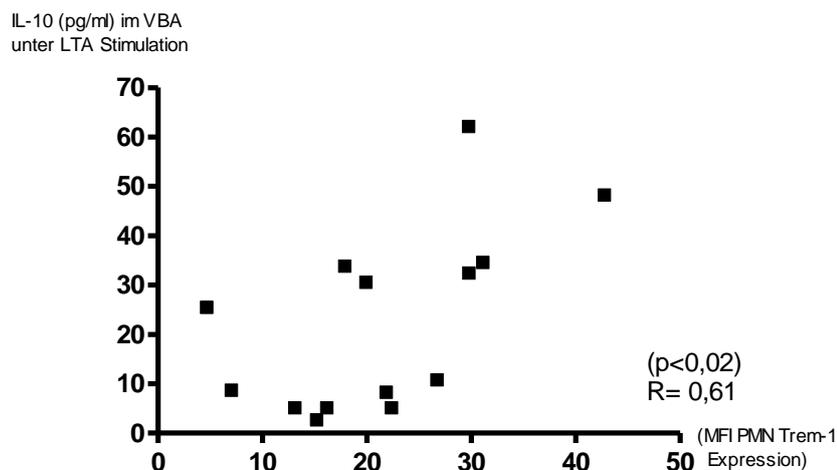


Abbildung 18: IL-10 Stimulierbarkeit in Abhängigkeit von der PMN Trem-1 Oberflächenexpression

Oberflächen PMN Trem-1 Expression und freie Zytokine

Serum TNF- α , IL-10, PCT und IP-10 Konzentration bei Sepsispatienten

Die Messung ergab bei schwerer Sepsis eine signifikant höhere Konzentration von TNF- α und PCT als bei leichter Sepsis (TNF- α : 5,6 pg/ml vs. 28,18 pg/ml) ($p < 0,03$); PCT: 9,05 pg/ml ($\pm 15,65$) vs 80,72 pg/ml ($\pm 89,4$) ($p < 0,05$)). IL-10 und IP-10 wiesen eine Tendenz, jedoch keine Signifikanz auf (IL-10: 8,54 pg/ml ($\pm 7,16$) vs 47,54 pg/ml ($\pm 73,41$); IP-10: 468,6 pg/ml ($\pm 245,6$) vs. 634,8 pg/ml ($\pm 489,8$))

Korrelation der Serum TNF- α Konzentration mit der TREM-1 Expression auf PMNs

Es zeigt sich eine signifikante ($p < 0,05$) negative Korrelation ($R = -0,36$) zwischen der TNF- α und der TREM-1 Oberflächenexpression. Je höher die messbare TNF- α Konzentration im Serum ist, desto niedriger ist die Trem1 Expression auf PMN (siehe Abbildung 19).

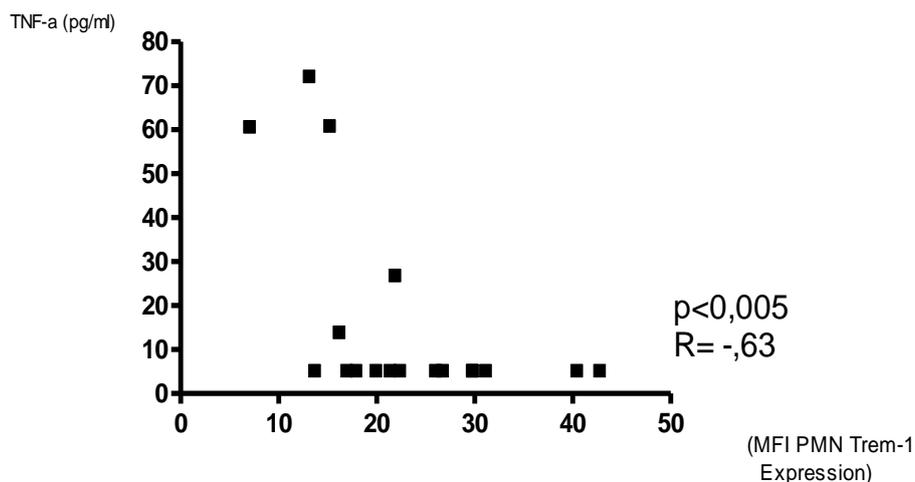


Abbildung 19: Korrelation Serum TNF- α zur PMN Trem-1 Oberflächenexpression

Korrelation der Serum IP-10 Konzentration mit der TREM-1 Expression auf PMNs

Es zeigt sich eine signifikante ($R=-0,5$; $p<0,035$) negative Korrelation zwischen der IP-10 Konzentration und der Trem-1 Oberflächenexpression. Je höher die messbare IP-10 Konzentration im Serum ist, desto niedriger ist die Trem-1 Expression auf PMN (siehe Abbildung 20).

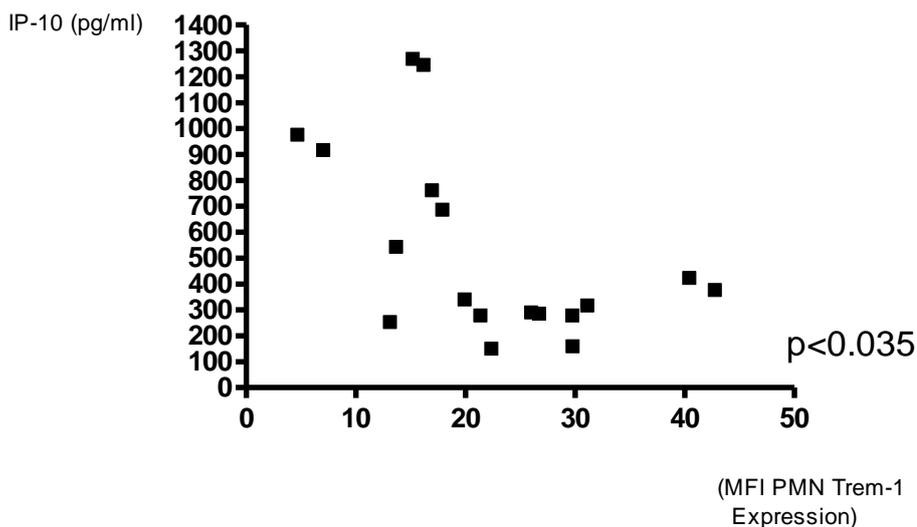


Abbildung 20: Korrelation der IP-10 Konzentration mit der PMN Trem-1 Oberflächenexpression

Oberflächen PMN Trem-1 Expression und Entzündungsmarker

Korrelation der PCT- Konzentration mit der Trem-1 Expression auf PMNs

Es zeigt sich eine signifikante ($p<0,007$, $R=-,59$) negative Korrelation zwischen der Procalcitonin (PCT) Konzentration und der Trem-1 Oberflächenexpression. Je höher die messbare PCT Konzentration im Serum ist, desto niedriger ist die Trem1 Expression auf PMN. Je höher die PCT Werte, umso niedriger ist die Trem-1 Expression (siehe Abbildung 21).

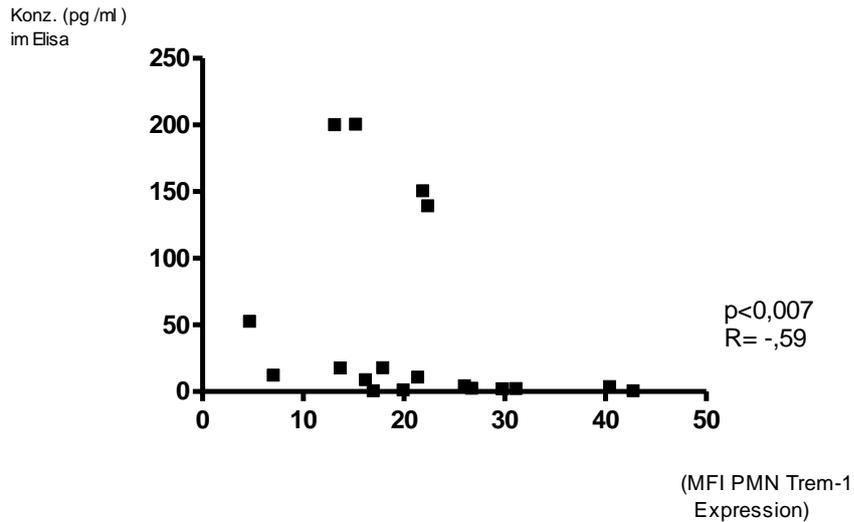


Abbildung 21: Korrelation der Procalcitoninkonzentration mit der PMN Trem-1 Oberflächenexpression

Das klinisch auch unspezifischere CRP korreliert nicht mit der Trem-1 Expression auf PMN (siehe Abbildung 22).

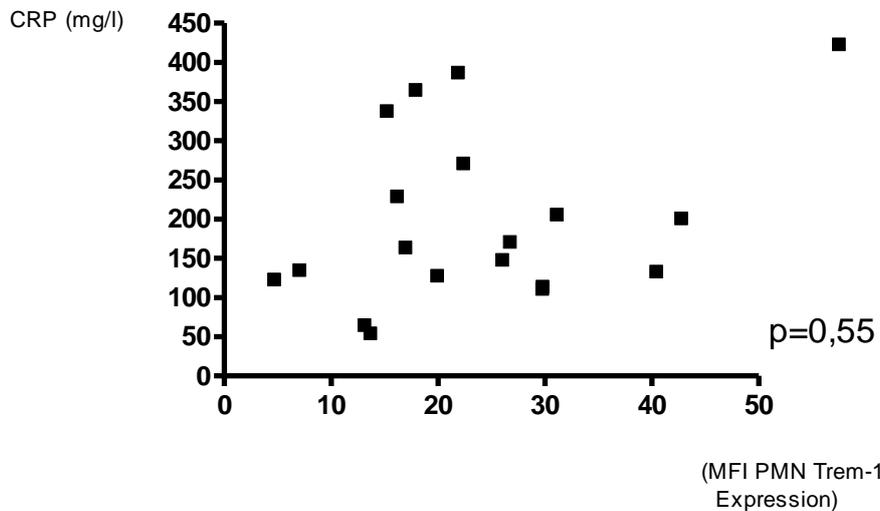


Abbildung 22: Korrelation der CRP Konzentration mit der PMN Trem-1 Oberflächenexpression

Löslicher Trem-1 im Serum (sTrem-1, ELISA)

Patienten mit Sepsis haben höhere s-Trem-1 Werte als Probanden (MFI: 500+- 359 vs. 101,1+- 73,89) ($p = 0,03$).

Patienten mit schwerer Sepsis haben signifikant höhere sTrem-1 Konzentrationen als Patienten mit leichter Sepsis (MFI: 741,1 +- 446,9 vs. 347,9+-182,1) (siehe Abbildung 23)

Eine Korrelation zum Oberflächen Trem-1 Rezeptor und zu den anderen PRR konnte nicht nachgewiesen werden.

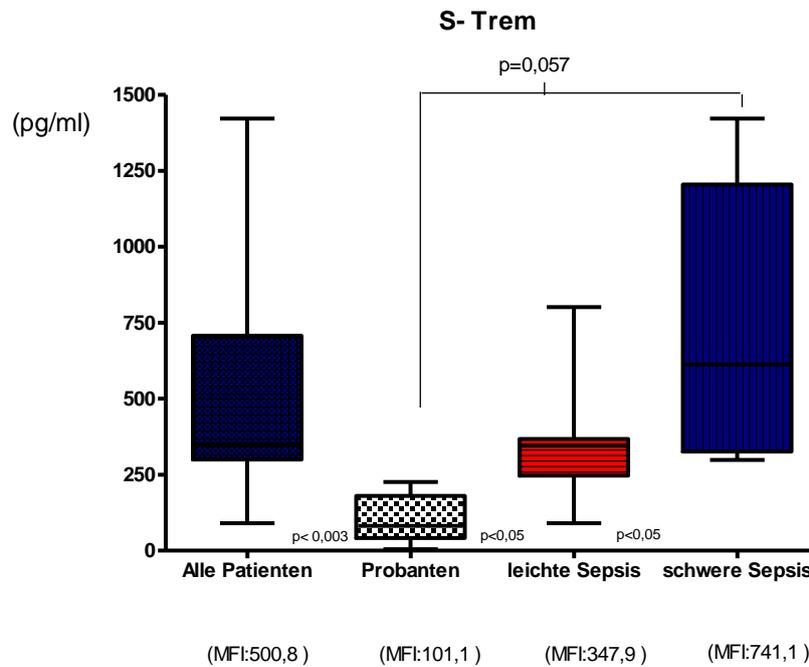


Abbildung 23: sTrem-1 Konzentration im Plasma

Eine Korrelation zwischen Trem-1 auf Monozyten und Zytokinen findet sich nicht. Ebenso findet sich keine Korrelation zwischen anderen PRR auf Monozyten oder PMN und Zytokinen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Oberflächenexpression auf Monozyten

Trem-1, TLR2 und TLR4 sind bei Sepsis im Vergleich zu Probanden signifikant erhöht. Trem-1 und TLR2 sind tendenziell bei schwerer Sepsis höher als bei leichter Sepsis. HLA-DR ist bei schwerer Sepsis signifikant niedriger als bei leichter Sepsis.

Oberflächenexpression auf PMN

Trem-1 und TLR2 sind bei Sepsis im Vergleich zu Probanden signifikant erhöht. Trem-1 ist tendenziell bei schwerer Sepsis **niedriger** als bei leichter Sepsis.

Zytokinstimulierbarkeit im Vollblutassay

Das Blut von Patienten mit schwerer Sepsis ist hyporesponsiv auf LTA und LPS, d.h. es wird weniger TNF- α (signifikant) und IL-6 (tendenziell) durch Antigenstimulation induziert. Die Hyporesponsibilität gilt nicht nur für LPS, einem Oberflächenantigen von *E-coli*, sondern auch für LTA, einem Antigen von gram-positiven Bakterien.

Zytokine im Serum

Patienten mit schwerer Sepsis haben eine signifikant höhere Konzentration von TNF- α und PCT als bei leichter Sepsis.

IL-10, IL-6 und, IP-10 zeigen eine Tendenz, jedoch keine Signifikanz.

Korrelation Zytokinstimulierbarkeit und Oberflächenexpression

Bei Sepsispatienten zeigt sich eine positive Korrelation zwischen Trem-1 auf PMN mit der TNF- α und IL-10 Stimulierbarkeit im VBA.

Korrelation Zytokinspiegel im Serum und Oberflächenexpression

Es zeigt sich eine negative Korrelation zwischen Trem-1 und dem Serum TNF- α , PCT und IP-10.

Diskussion

Die schwere bakterielle Sepsis ist gekennzeichnet durch hohe Zytokinspiegel im Serum (insbesondere IL-10 und TNF- α) und eine sekundäre Hyporesponsibilität auf eine erneute Antigenstimulation (Randow et al., 1887-92; Sessler et al.; 213-35). Die Hyporesponsibilität gilt klinisch als Immunsuppression und als Ursache für die Morbidität und Mortalität steigender noskomialen Zweitinfektionen (Munford, 316-21).

Bekanntes bestätigend, finden sich in unserer Studie bei Patienten mit schwerer *E-coli* Sepsis signifikant erhöhte TNF- α und IL-10 Spiegel im Serum und eine Hyporesponsibilität, dargestellt als erniedrigte TNF- α und IL-10 Stimulierbarkeit des Vollblutes durch Antigen von gram-negativen Bakterien (LPS) und gram-positiven Erregern (LTA).

Als Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit findet sich ein Zusammenhang zwischen Trem-1 auf Blut PMN und den Zytokinen. Es zeigt sich zum einen, dass die TNF- α und IL-10 Stimulierbarkeit des Vollblutes durch LPS und LTA umso schlechter ist (Hyporesponsibilität) je niedriger Trem-1 auf PMN exprimiert wird. Zum anderen zeigt sich bei einer niedrigen Trem-1 Expression auf PMN höhere unstimulierte Serumspiegel von TNF- α , IL-10, IP-10 und PCT.

Das bedeutet, dass in der schweren Sepsis, sowohl die erhöhten Zytokinspiegel, als auch die Hyporesponsibilität in Zusammenhang zur Trem-1 Expression auf PMN steht. Trem-1 auf PMN ist somit ein Molekül, dem möglicherweise eine entscheidende pathophysiologische Rolle in der schweren Sepsis zukommt.

Klinisch könnte Trem-1 auf PMN zudem als Marker für die schwere Sepsis genutzt werden.

Unser Patientenkollektiv bestand aus 22 Patienten, die an einer *E.coli* Sepsis erkrankt waren. Zur späteren Auswertung der experimentellen Daten wurden die Patienten in Patienten mit „leichter Sepsis“ und Patienten mit „schwere Sepsis“ unterteilt (siehe „Klinische Daten“). Entsprechend waren die Morbidität, die Mortalität und die klinischen

Parameter in der Gruppe der schweren Sepsis Patienten deutlich höher (Siehe Tabelle 7,8,9).

Monozyten und Neutrophile haben eine wichtige Rolle in der direkten Immunantwort. Eine Reihe von Oberflächenrezeptoren, die „Pathogen Recognition Rezeptors“ (PPR), initiieren und regulieren die Immunantwort (Robinson et al., 507-14; Banerjee and Gerondakis,; Krishnan et al., 421-38) mit Ausschüttung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen. Die schwere Sepsis ist gekennzeichnet durch erhöhte Zytokinspiegel und eine sekundäre Immunparalyse (Randow et al., 1887-92). In Studien konnte insbesondere die reduzierte TNF- α Stimulierbarkeit mit dem klinischen Outcome assoziiert werden. (Heagy W et al 271-277). Vorstudien aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass für TNF- α die Ausschüttung im Verlauf wieder induzieren lässt. Auch hier konnte eine verzögerte Stimulierbarkeit für schwer erkrankte Patienten nachgewiesen werden (Schaaf et al. 4-12).

Pathophysiologisch und klinisch sind beide Phänomene während der schweren Sepsis ein wesentlicher Faktor für die Schwere der Erkrankung. Erhöhte Zytokinspiegel führen zu dem klinischen Erscheinungsbild der schweren Sepsis mit Multiorganversagen (Tracey et al., 662-4; Horner c. et al., 10-28; Sessler et al.; 213-35). So führt die experimentelle Gabe von TNF- α zu Fieber und einem Entzündungssyndrom (Tracey et al., 470-474). Die initialen Stimulationen der Immunzellen führen sekundär zur Hyporesponsibilität (Randow et al., 1887-92). Bei Patienten mit schwerer Sepsis, können Antigene von Sekundärinfektionen keine erneute Inflamationsreaktion auslösen. Patienten mit schwerer Sepsis sind klinisch durch diese sekundäre Immunsuppression gefährdet häufiger Sekundärinfektionen zu erleiden und an den Folgen schwerer Sekundärinfektionen zu versterben (Haverman et al 132-41). Die molekularen Mechanismen, die zu einer Immunparalyse führen sind bisher nur unvollständig verstanden. Eine Exposition gegenüber bakteriellen Antigenen führt initial zu einer proinflammatorischen Zytokinantwort, erst nach wiederholter Stimulation kommt es nur noch zu einer Ausschüttung geringer Zytokinmengen (Randow et al 1887-92). Dieser Effekt wird

Endotoxin- Toleranz oder auch Hyporesponsibilität genannt. In der vorliegenden Arbeit zeigt das Blut von Patienten mit schwerer Sepsis eine reduzierte Zytokinstimulierbarkeit.

Die molekulare Ursache der Endotoxintoleranz ist bisher nicht eindeutig geklärt (Schaaf et al. 4-12). Einige Autoren vermuten eine Downregulation der Toll-like Rezeptoren (Härter et al 403-409) als mögliche Ursache. Droemann et al. konnten dies nach LPS Stimulation von Macrophagen nachweisen. Nahid et al vermuten, dass eine Modulation der microRNA einen Effekt auf die Endotoxin Toleranz hat (Nahid et al, 388-403). In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass Patienten mit septischem Schock oder MODS erst nach 7d eine signifikante Downregulation von TLR2 haben (Schaaf et al. 4-12).

In der vorliegenden Arbeit findet sich bei Sepsispatienten eine im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöhte Expression von TLR2, TLR4 und Trem-1 auf Monozyten, ein signifikanter Unterschied zwischen schwerer und leichter Sepsis findet sich nicht.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich jedoch ein Zusammenhang zwischen Trem-1 und schwerer Sepsis. TLR2 und Trem-1 sind auf PMN von Sepsispatienten zwar höher als bei Gesunden, bei Patienten mit schwerer Sepsis findet sich jedoch tendentiell eine niedrigere Expression von Trem-1 und TLR2. Entscheidend ist jedoch der Befund, dass die Höhe der Trem-1 Expression auf PMN mit der Stimulierbarkeit des Vollblutes und der zirkulierenden Zytokinkonzentration assoziiert ist: je niedriger Trem-1, umso schlechter ist die Zytokinstimulierbarkeit und umso höher sind die zirkulierenden Zytokinspiegel.

Der Triggering receptor expressed on myeloid cell - 1 ist ein Oberflächenrezeptor und hat vermutlich eine wichtige Funktion in der angeborenen Immunantwort. Die genaue Rolle des gebundenen und des löslichen Trem-1 ist noch unklar.

Bisher ist nicht klar, ob Trem-1 direkt, wie die Toll-like Rezeptoren, auf Bakterienbestandteile reagiert oder durch andere Moleküle aktiviert wird (Sharif et Knapp, 701-713). Ebenso ist nicht geklärt, ob Liganden an den Rezeptor binden oder ob endogene Moleküle für eine Aktivierung des Trem-1 sorgen. Einige Versuche haben gezeigt, dass zwischen den TLR2,

TLR4 und Trem-1 Rezeptoren ein Zusammenhang besteht. Die Aktivierung von Trem1 bei gleichzeitigem Vorhandensein von TLR Liganden wie LTA oder LPS hat zu einer vermehrten Produktion von TNF- α , IL-1 β geführt. In der Frühphase der Entzündung führt dies zu einer vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. TNF- α (Tessarz et al 1991-9.; Bleharskie et. Al 2003). Zum Beispiel konnte eine Reduktion von IL-10 durch eine gleichzeitige Stimulation von Trem-1 und TLR4 beobachtet werden (Bleharski, J. R. et al. 3812-18). Proteine des TLR Signalweges wurden durch eine Trem-1 Stimulation induziert (Ornatowska M et al 3377-18). Dieses führt dann im Rahmen einer positiven Rückkopplung wieder zu einer vermehrten Expression von Trem-1 auf den Monozyten (Murakami et al 2007). Eine direkte Aktivierung über die IRAK konnte nachgewiesen werden. Die IL-10 Ausschüttung war bei Trem-1 Aktivierung dagegen vermindert (Bleharski et al. 3812-18).

Die Synergie zwischen den TLR Rezeptoren und dem Trem-1 Rezeptor führt zu einer effektiveren Entzündungsantwort. In unserer Arbeit konnte eine signifikant erhöhte TLR2 Expression auf Monozyten und PMNs beim Patientenkollektiv zum Probandenkollektiv gemessen werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kollektiven und somit auch zum klinischen Outcome konnte bei TLR2 und TLR4 nicht nachgewiesen werden. Im Rahmen unserer Messungen haben wir die Oberflächenexpression von Trem-1 auf Monozyten und Neutrophilen mit der Oberflächenexpression einiger PRRs (TLR2, TLR4, CD14) korreliert. Hier konnte keine Korrelationen hinsichtlich der Expression festgestellt werden.

Wir finden einen möglichen Einfluss von Trem-1 bei PMN auf die Stimulierbarkeit von Vollblut.

Eine Sepsis mit E-coli Bakterien scheint die Expression des PMN Trem-1 direkt (über LPS) oder indirekt (über z.B. TNF) zu reduzieren. Versuche bei gesunden Probanden haben gezeigt, dass es unter intravenöser LPS Gabe zu einer Abnahme der PMN Trem-1 Expression kam. Im Gegensatz dazu kam es bei Monozyten zu einem Anstieg (Knapp et al. 7131-34). In einer anderen Studie konnte dargestellt werden, dass Patienten mit einem septischen Schock eine signifikant höhere Monozyten Trem-1 Expression hatten als Patienten mit nicht-infektiösem Schock oder gesunde

Probanden (Gibot et al. 594-97). Auch bei *E-coli* sepsis findet sich in unserer Studie eine tendenziell höhere Trem-1 Expression auf Monozyten von Patienten mit schwerer Sepsis.

Neben der Hyporesponsibilität haben Patienten mit schwerer Sepsis hohe Zytokinspiegel. In unseren Untersuchungen zeigt sich eine signifikante neg. Korrelation zwischen der Trem-1 Expression auf Neutrophilen und der Serum TNF- α Konzentration. Je niedriger die Expression, desto höher die TNF- α Konzentration. Ob LPS direkt Trem-1 auf PMN beeinflusst, oder ob Zytokine wie TNF- α als negative Rückkopplung die Trem Expression auf PMN beeinflusst, ist nicht geklärt.

IP-10 spielt eine wichtige Rolle bei Modulation des erworbenen Immunsystems. Es aktiviert die TH-1 Zellen und hat somit Einfluss auf die T- Lymphozyten Aktivierung. Wir konnten zeigen, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Serum IP-10 und der PMN Trem-1 Expression besteht. Je niedriger die Expression von Trem-1, desto höher die IP-10 Serumkonzentration. Auch die HLA-DR Expression als Teil der erworbenen Immunität war bei den Patienten mit schwerer Sepsis reduziert.

Als weiterer Punkt wurde die Assoziation von Trem-1 zu klinisch relevanten Entzündungsmarkern untersucht. Hierbei zeigte sich besonders zur Serumkonzentration von Procalcitonin eine signifikante negative Korrelation. Je niedriger die PMN Trem-1 Expression ist, desto höher ist die PCT Konzentration. Beim CRP konnte eine Korrelation nicht nachgewiesen werden. Trem-1 auf PMN kann eventuell wird PCT als Sepsisschweregradmarker genutzt werden.

Neben den freien Zytokinen und Entzündungsmarkern aus dem Serum wurde die lösliche Form des Trem-1, das sTrem-1, untersucht. Es konnte bisher gezeigt werden, dass es bei Patienten mit bakterieller Sepsis zu erhöhten sTrem-1 Spiegel im Serum und Plasma gekommen ist. Bei Patienten mit einem septischen Schock waren die Werte höher als bei Patienten mit severer Sepsis oder Sepsis. Zusätzlich zeigen erste Ergebnisse, dass die sTrem-1 Spiegel Hinweise über die Prognose der erkrankten Patienten geben. Hohe Ausgangswerte weisen auf ein

schlechtes Outcome hin. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sTrem-1 ein wichtiger Mediator für die Ausbildung einer schweren Sepsis ist (Routsi et al. 62-67). Weitere Untersuchungen haben zusätzlich die sTrem-1 Spiegel im Verlauf von Sepsiserkrankungen untersucht. Hierbei kam es bei den verstorbenen Patienten im Verlauf zu einem Anstieg, bei denjenigen, die überlebt haben, zu einem Abfall.

Bisher konnten jedoch noch keine genauen Erkenntnisse über die exakte Funktion des sTrem-1 gefunden werden. In vitro Untersuchungen weisen darauf hin, dass erhöhte sTrem-1 Werte bei Endotoxämie in Form eines negativen Feedbacks die Entzündungsantwort regulieren (Knapp et al. 7131-34). In vivo Untersuchungen bei Patienten aus Intensivstationen zeigen, dass sTrem-1 Marker und Verlaufsparemeter für eine bakterielle Sepsiserkrankung sein könnte. Gerade bei der Unterscheidung von Patienten, die an einer bakteriellen SIRS leiden, zu Patienten, die z.B. nach Operationen oder Traumata Zeichen einer SIRS aufweisen, könnte der sTrem-1 Wert ein wichtiges Diagnosehilfsmittel werden (Gibot et al. 9-15). Unsere Messungen zeigten bei dem gesamten Patientenkollektiv signifikant erhöhte Werte in Vergleich zu den gesunden Probanden. Bei schwerer Sepsis fand sich signifikant höhere Konzentrationen im Verhältnis zu Patienten mit leichter Sepsis. Eine Assoziation zu Trem-1 auf PMN oder Monozyten fand sich nicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Trem-1 auf PMN eine Schlüsselstelle in der bakteriellen E-coli Sepsis zukommt. Bei Patienten mit schwerer Sepsis ist der Trem-1 Rezeptor auf PMN reduziert, assoziiert damit ist eine reduzierte Zytokinstimulierbarkeit (Hyporesponsibilität). Gleichzeitig findet sich eine negative Assoziation zu den Zytokinspiegeln, dem PCT und IP-10 als Marker für die erworbene Immunität. Die schwere Sepsis ist somit möglicherweise Ausdruck einer Störung der Neutrophilenfunktion.

Der Trem-1 Rezeptor nimmt in der Signaltransduktion und Aktivierung der Neutrophilen und Monozyten eine wichtige Rolle ein. Hier ergeben sich eventuell neue Möglichkeiten der therapeutischen Intervention.

Zusammenfassung

Die schwere bakterielle Sepsis ist eine häufige Erkrankung auf Intensivstationen und herausfordernd in Diagnostik und Therapie. Sie ist gekennzeichnet durch hohe Zytokinspiegel im Serum und einer sekundären Hyporesponsibilität auf eine erneute Antigenstimulation, was zu einer Immunsuppression führt und klinisch als Ursache für Zweitinfektionen angesehen wird.

Diese Arbeit untersucht die Rolle des Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (Trem-1) auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten in der bakteriellen humanen *E.coli* Sepsis und seine Rolle bei der Endotoxintoleranz. Hierzu wurden das Blut und die klinischen Daten von 22 Patienten und 6 Probanden untersucht und ausgewertet.

Bei den schwer erkrankten Sepsispatienten konnte eine Hyporesponsibilität, dargestellt als erniedrigte TNF- α und IL-10 Stimulierbarkeit des Vollblutes durch Antigen von gram-negativen Bakterien (LPS) und gram-positiven Erregern (LTA), nachgewiesen werden. Korrelationen zur Trem-1 Oberflächenexpression auf Neutrophilen wurden festgestellt. Gleichzeitig findet sich eine negative Assoziation zu den freien Zytokinspiegeln, dem PCT und IP-10 als Marker für die erworbene Immunität. Lösliches Trem-1 (sTrem-1) ist bei Sepsispatienten erhöht.

Die schwere bakterielle *E.coli* Sepsis ist im Vergleich zu einer leichten Sepsis charakterisiert durch eine verminderte Trem-1 Expression auf Neutrophilen, welche mit einer Endotoxintoleranz und Hyporesponsibilität assoziiert ist. Trem-1 scheint demnach eine funktionelle Aktivität in der Signaltransduktion und Aktivierung der Neutrophilen und Monozyten einzunehmen.

Die präzise Rolle der Trem-1 Funktion in der bakteriellen Sepsis gilt es in weiteren experimentellen und klinischen Studien zu untersuchen. Ein Eingreifen, z.B. mit einer gezielten Stimulation oder Blockade, erscheint vielversprechend. Die Verwendung als Marker ist aussichtsreich.

Literaturverzeichnis

- Aderem, A. and D. M. Underhill. "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu.Rev.Immunol. 17 (1999): 593-623.
- Baggiolini, M., B. Moser, and I. Clark-Lewis. "Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. The Giles Filley Lecture." Chest 105.3 Suppl (1994): 95S-8S.
- Banerjee A, Gerondakis S.;Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. Immunol Cell Biol. 2007 Aug-Sep;85(6):420-4. Epub 2007 Jul 17. Review.
- Bleharski, J. R. et al. "A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response." J.Immunol. 170.7 (2003): 3812-18.
- Bohrer, H. et al. "Role of NFkappaB in the mortality of sepsis." J.Clin.Invest 100.5 (1997): 972-85.
- Bouchon, A., J. Dietrich, and M. Colonna. "Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes." J.Immunol. 164.10 (2000): 4991-95.
- Bouchon, A. et al. "TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock." Nature 410.6832 (2001): 1103-07.

- Brunkhorst, F. M. "[Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]." Anesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther. 41.1 (2006): 43-44.
- Cantoni, C. et al. "NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily." J.Exp.Med. 189.5 (1999): 787-96.
- Cassatella, M. A. et al. "Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils." Eur.J.Immunol. 27.1 (1997): 111-15.
- Castelli, G. P. et al. "Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction." Crit Care 8.4 (2004): R234-R242.
- Geroulanos S, Douka ET;"Historical perspective of the word "sepsis". Intensive Care Med. 2006 Dec;32(12):2077. Epub 2006 Oct 13.
- Dransfield, I., S. C. Stocks, and C. Haslett. "Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis." Blood 85.11 (1995): 3264-73.
- Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. Nat Med. 1997 Jun;3(6):678-81.

- Dufour, J. H. et al. "IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking." J.Immunol. 168.7 (2002): 3195-204.
- Fan, J. and A. B. Malik. "Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors." Nat.Med. 9.3 (2003): 315-21.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond, and T. R. Mosmann. "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." J.Exp.Med. 170.6 (1989): 2081-95.
- Fiorentino, D. F. et al. "IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages." J.Immunol. 147.11 (1991): 3815-22.
- Gibot, S. et al. "Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis." Ann.Intern.Med. 141.1 (2004): 9-15.
- Gibot, S. et al. "Surface triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression patterns in septic shock." Intensive Care Med. 31.4 (2005): 594-97.
- Gingras, M. C., H. Lapillonne, and J. F. Margolin. "TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development." Mol.Immunol. 38.11 (2002): 817-24.
- Groh, V. et al. "Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells." Nat.Immunol. 2.3 (2001): 255-60.

Haveman JW, Muller Kobold AC, Tervaert JW, van den Berg AP, Tulleken JE, Kallenberg CG, The TH. The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. Neth J Med. 1999 Sep;55(3):132-41.

Härter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. Shock 2004; 22(5):403-409.

Heagy W, Hansen C, Niemann K, et al: Impaired ex vivo lipopolysaccharid-stimulated whole blood tumor necrosis factor production may identify "septic" intensive care unit patients. Schock 2000; 14:271-277

Hehlgans, T. and K. Pfeffer. "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games." Immunology 115.1 (2005): 1-20.

Heinrich, P. C. et al. "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." Biochem.J. 374.Pt 1 (2003): 1-20.

Horner, C. et al. "[Role of the innate immune response in sepsis]." Anaesthetist 53.1 (2004): 10-28.

Hornig, T., G. M. Barton, and R. Medzhitov. "TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway." Nat.Immunol. 2.9 (2001): 835-41.

Hornig, T. and R. Medzhitov. "Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.22 (2001): 12654-58.

- Jackson, D. G. et al. "Molecular cloning of a novel member of the immunoglobulin gene superfamily homologous to the polymeric immunoglobulin receptor." Eur.J.Immunol. 22.5 (1992): 1157-63.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov. "Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response." Semin.Immunol. 10.5 (1998): 349-50.
- Jinquan, T. et al. "CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN-gamma-inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma." J.Immunol. 165.3 (2000): 1548-56.
- Jones, S. A. et al. "The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease." FASEB J. 15.1 (2001): 43-58.
- Kasama, T. et al. "Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10." J.Immunol. 152.7 (1994): 3559-69.
- Knapp, S. et al. "Cutting edge: expression patterns of surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in human endotoxemia." J.Immunol. 173.12 (2004): 7131-34.
- Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. Toll-like receptor signal transduction.; Exp Mol Med. 2007 Aug 31;39(4):421-38.
- Kuhn, R. et al. "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell 75.2 (1993): 263-74.
- Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified

lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. J Immunol. 2001 Apr 15; 166(8):5161-7.

Li, L., J. F. Elliott, and T. R. Mosmann. "IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity." J.Immunol. 153.9 (1994): 3967-78.

Mahdy, A. M. et al. "Production of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells by lipopolysaccharide-stimulated human neutrophils involves de novo protein synthesis." Clin.Vaccine Immunol. 13.4 (2006): 492-95.

McVicar, D. W. et al. "DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase." J.Biol.Chem. 273.49 (1998): 32934-42.

Medzhitov, R. "Toll-like receptors and innate immunity." Nat.Rev.Immunol. 1.2 (2001): 135-45.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature 388.6640 (1997): 394-97.

Meisner, M. et al. "Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery." Intensive Care Med. 24.7 (1998): 680-84.

Mosmann, T. R. and K. W. Moore. "The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses." Immunol.Today 12.3 (1991): A49-A53.

- Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. Am J Respir Crit Care Med. 2001, 163(2):316-21.
- Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. Cell Mol Immunol. 2011 Sep;8(5):388-403. doi: 10.1038/cmi.2011.26.
- Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. J Immunol. 2000 Apr 1; 164(7):3476-9.
- Oberhoffer, M. et al. "Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro." J.Lab Clin.Med. 134.1 (1999): 49-55.
- Ornatowska M, Azim AC, Wang X, Christman JW, Xiao L, Joo M, Sadikot RT. Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007 Dec;293(6):L1377-84.
- Pajkrt, D. et al. "Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL-10 in human endotoxemia: effect of timing of recombinant human IL-10 administration." J.Immunol. 158.8 (1997): 3971-77.
- Rajaratnam, K. et al. "Neutrophil activation by monomeric interleukin-8." Science 264.5155 (1994): 90-92.

- Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, Volk HD. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. J Exp Med. 1995 May 1;181(5):1887-92.
- Rink, L. and H. Kirchner. "Recent progress in the tumor necrosis factor-alpha field." Int.Arch.Allergy Immunol. 111.3 (1996): 199-209.
- Robinson EK, Seaworth CM, Suliburk JW, Adams SD, Kao LS, Mercer DW. Effect of NOS inhibition on rat gastric matrix metalloproteinase production during endotoxemia. Shock. 2006 May;25(5):507-14.
- Rotondi M, Lazzeri E, Romagnani P, Serio M. J Endocrinol Role for interferon-gamma inducible chemokines in endocrine autoimmunity: an expanding field. Invest. 2003;26:177-80.
- Routsis, C. et al. "Does soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 play any role in the pathogenesis of septic shock?" Clin.Exp.Immunol. 142.1 (2005): 62-67.
- Schaaf B, Luitjens K, Goldmann T, van Bremen T, Sayk F, Dodt C, Dalhoff K, Droemann D. Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. Diagn Pathol. 2009 Apr 16;4:12.
- Sessler CN, Bloomfield GL, Fowler AA. Current Concepts of Sepsis and Acute Lung Injury. Clin Chest Med. 1996, 12(2):213-35.
- Schumann, R. R. et al. "Structure and function of lipopolysaccharide binding protein." Science 249.4975 (1990): 1429-31.

Sharif O, Knapp S. "From expression to signaling: roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection." Immunobiology. 2008;213(9-10):701-13.

Tessarz AS, Weiler S, Zanzinger K, Angelisová P, Horejsí V, Cerwenka A. Non-T cell activation linker (NTAL) negatively regulates TREM-1/DAP12-induced inflammatory cytokine production in myeloid cells. J Immunol. 2007 Feb 15;178(4):1991-9.

Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. "Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia." Nature. 1987 Dec 17-23;330(6149):662-4.

Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ 3rd, Zentella A, Albert JD, et al. "Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin." Science. 1986 Oct 24;234(4775):470-4.

Tsiotou, A. G. et al. "Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective." Med.Sci.Monit. 11.3 (2005): RA76-RA85.

van der, Poll T. et al. "Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia." J.Infect.Dis. 174.5 (1996): 994-1000.

Vassalli, P. "The pathophysiology of tumor necrosis factors." Annu.Rev.Immunol. 10 (1992): 411-52.

Vervölgyi Volker "Die Wirkung der bakteriellen Sepsis auf dieelektromechanische Koppelung und dieHypertrophieentwicklung des Herzens" Dissertation 2007

Volk HD, Thieme M, Heym S, Döcke WD, Ruppe U, Tausch W, Manger D, Zuckermann S, Golosubow A, Nieter B, et al. Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease-- predictive value and new therapeutic strategies. Behring Inst Mitt. 1991 Feb;(88):208-15.

Wang, P. et al. "Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms." J.Biol.Chem. 270.16 (1995): 9558-63.

West MA, Heagy W. Related Articles, Links Endotoxin tolerance: A review. CritCare Med. 2002 Jan; 30(1 Supp):S64-S73.

Wong-Baeza, I. et al. "Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) is regulated post-transcriptionally and its ligand is present in the sera of some septic patients." Clin.Exp.Immunol. 145.3 (2006): 448-55.

Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tobias van Bremen
Geburtsdatum: 07.05.1982
Geburtsort: Dortmund

Ausbildung

Schulausbildung:

1988 - 1992 Hohwart Grundschule in Dortmund
1992 - 2001 Käthe-Kollwitz- Gymnasiums in Dortmund
Aug. – Dez. 1998 Williamsville North High School Buffalo, N.Y. (USA)

Studium:

Ab Oktober 2001 Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
September 2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Juni 2008 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Erhalt der Approbation

Praktisches Jahr:

1. Tertial Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang Univerität, China; Klinik für Herz-, Thorax- und Allgemeinchirurgie
2. Tertial Kantonsspital Luzern, Lehrkrankenhaus der Universität Zürich; Klinik für Hals-, Nasen-, Ohren und Gesichtschirurgie
3. Tertial Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Lübeck; Medizinische Klinik II

Beruf

ab Nov. 2008 Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde/Chirurgie; UK Bonn

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. B. Schaaf für die Überlassung des Themas, den Anregungen zu dieser Arbeit und für die kontinuierliche Betreuung. Für die Mitarbeit im Labor, die hilfreiche Ideengebung mit zahlreichen Vorschlägen bin ich außerdem Herrn Prof. Dalhoff und PD Dr. Daniel Drömann sehr dankbar.

Mit Freude und Dankbarkeit blicke ich auf die langen Tage im Labor der Medizinischen Klinik III des UKSH Campus Lübeck zurück, bei denen ich besonders von Heike Richartz und Ute Wegener fachkundig und tatkräftig unterstützt wurde.

Weiterhin gebührt meiner Familie ein herzlicher Dank, für alle Unterstützung, die ich bisher erfahren habe bis hin zur Ermöglichung des Medizinstudiums und der damit verbundenen Anfertigung einer Dissertation.

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

„Triggering receptor expressed on myeloid cells -1 (Trem-1) on polymorphonuclear neutrophils is associated with endotoxin tolerance in human *E.coli* sepsis”

van Bremen T., Drömann D., Luitjens K., Goldmann T, Rupp J., Dodt C., Dalhoff K., Schaaf B.

-Co- Autor Revision-

“Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes.”

Schaaf B, Luitjens K, Goldmann T, van Bremen T, Sayk F, Dodt C, Dalhoff K, Droemann D.;

Diagn Pathol. 2009 Apr 16;4:12.

Abstracts

„Aktivität von Triggering receptor expressed on myeloid cells -1 (Trem-1) auf Blutmonozyten und Neutrophilen bei bakterieller Sepsis“

van Bremen T., Droemann D., Rupp J., Dalhoff K., Schaaf B.,
am 49. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und
Beatmungsmedizin, April 2008, Lübeck

“Shock in human sepsis is associated with Toll-like receptor 2 downregulation on blood monocytes during the course of the disease”

Daniel Droemann, Karen Luitjens, Tobias van Bremen, Jan Rupp, Peter Zabel, Christoph Dodt, Klaus Dalhoff, Bernhard Schaaf

36. Annual Meeting of the German Society of Immunology (DGfI), Kiel,
September 21 - 24, 2005

**Porphyria erythropoetica congenita mit einem ulzerierenden
spinozellulären Karzinom des Halses**

T. van Bremen, A. Schröck; F. Bootz

82. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-
Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. Juni 2011; Freiburg

**Embryonales Rhabdomyosarkom des Hypopharynx einer 22-
jährigen Frau**

T. van Bremen, H.-J. Straehler-Pohl, S. Keiner, A. Gerstner, F. Bootz

81. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-
Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. Mai 2010; Wiesbaden