

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

Einfluß des
Interleukin-10 –1082-Promotorgen-Polymorphismus
auf invasive Pneumokokkeninfektionen

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Florian Böhmke
geboren in Remscheid

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus Dalhoff

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Peter Schlenke

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2006

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 29.11.2006

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	5
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	6
1.1. Streptococcus pneumoniae	6
1.1.1. Streptococcus pneumoiae Infektionen und Epidemiologie	6
1.1.2. Ätiologie und Pathogenese	8
1.2. Sepsis und ihre Folgeerscheinungen	11
1.2.1. Definition der Sepsis	11
1.2.2. Anti- und Proinflammation, Pathogenese.....	11
1.3. Interleukin-10	15
1.3.1. Struktur, Produktion und Regulation von IL-10.....	15
1.3.2. IL-10-Rezeptor, Signaltransduktion	16
1.3.3. Die Rolle von IL-10 im Immunsystem.....	16
1.3.4. Einfluß genetischer Faktoren auf die IL-10-Produktion: Der IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus	19
1.4. Fragestellung.....	21
2. MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1. Materialien	23
2.2. Methoden.....	25
2.2.1. Patienten der Studie, Ein- und Ausschlußkriterien.....	25
2.2.2. Probanden der Studie, Ein- und Ausschlußkriterien	26
2.2.3. Ethik.....	26
2.2.4. Erfassung klinischer Daten	26
2.2.4.1. Schweregrad der Sepsis/ Einteilung der Patientengruppen	27
2.2.4.2. APACHE II und APS	28
2.2.4.3. Komplikationen und Mortalität	28
2.2.5. Blutentnahme.....	30

2.2.6. Bestimmung des IL-10-Spiegels im Vollblutüberstand nach Stimulation	30
2.2.6.1. Vollblut-Assay	30
2.2.6.2. Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA).....	31
2.2.7. Analyse des IL-10 -1082-Promotorgenpolymorphismus.	31
2.2.7.1. Polymerasekettenreaktion.....	32
2.2.7.2. IL-10-ARMS-PCR zur Identifizierung des IL-10 –1082-Promotorgenpoly- morphismus	33
2.3. Statistische Auswertung	36
3. ERGEBNISSE.....	37
3.1. Klinische und demographische Daten der Patienten	37
3.2. Klinische Daten in Bezug auf den Schweregrad der Sepsis und den klinischen Verlauf	39
3.3. Genotypenhäufigkeit des IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus der Patienten verglichen mit einer Kontrollgruppe	42
3.4. Einfluß des IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus auf den Schweregrad der Sepsis	43
3.5. Einfluß des IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus auf den klinischen Verlauf.....	45
3.6. Einfluß weiterer Faktoren auf den Schweregrad der Sepsis.....	46
3.7. Einfluß des IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus auf die In-vitro-Zytokinproduktion.	48
4. DISKUSSION	50
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	58
6. LITERATURVERZEICHNIS	59
7. PUBLIKATION.....	74

8. DANKSAGUNG75

9. LEBENSLAUF76

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Durch Interleukin-10 herunterregulierte pro-inflammatorische Zytokine.	17
Tabelle 2: Demographische Daten der Patienten.	38
Tabelle 3: Klinische Daten der Patienten.	39
Tabelle 4: Alter und klinische Daten der einzelnen Patientengruppen.	40
Tabelle 5: Vergleich der klinische Daten von Patienten mit und ohne septischem Schock.	41
Tabelle 6: Komplikationen in den einzelnen Patientengruppen.	41
Tabelle 7: Absolute und relative Genotypenverteilung der Patienten, verglichen mit der Kontrollgruppe.	42
Tabelle 8: Genotypenverteilung des IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus.	43
Tabelle 9: Fisher exact Test: Genotypenverteilung bei Patienten mit septischem Schock und ohne septischem Schock.	44
Tabelle 10: Chancenverhältniss (Odds Ratio) für den IL-10-Genotyp in Assoziation zum Schweregrad der Sepsis. Cochran Armitage trend test.	45
Tabelle 11: APACHE II Score, septische Komplikationen und Mortalität im Vergleich für den IL-10-Genotypen.	46
Tabelle 12: Risikofaktoren innerhalb der vier Patientengruppen.	47
Tabelle 13: IL-10-In-vitro-Produktion der Patienten aufgeteilt auf die drei IL-10-Genotypen nach Stimulation von Vollblut mit LPS.	48
Tabelle 14: IL-10-In-vitro-Produktion der Patienten aufgeteilt auf die drei IL-10-Genotypen nach Stimulation von Vollblut mit LTA.	49
Abbildung 1: Schematische Darstellung, Verlauf einer septischen Erkrankung.	13
Abbildung 2: APACHE II Score.	29
Abbildung 3: Ergebnis einer IL-10 ARMS-PCR auf einem Agarosegel unter UV-Licht.	35
Abbildung 4: APS / APACHE II Score und der Sepsis-Schweregrad der Patientengruppen.	40
Abbildung 5: Darstellung der prozentualen Genotypenverteilung bei Patienten mit invasiven Pneumokokkeninfektionen.	44
Abbildung 6: IL-10-In-vitro- Produktion aufgeteilt auf die drei IL-10-Genotypen nach Stimualtion von Vollblut mit LPS.	48
Abbildung 7: IL-10- In-vitro-Produktion aufgeteilt auf die drei IL-10-Genotypen nach Stimulation von Vollblut mit LTA.	49

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Streptococcus pneumoniae

1.1.1. Streptococcus pneumoniae Infektionen und Epidemiologie

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*, Pneumokokken) sind grampositive Kokken mit einer Kapsel, die in Paaren oder kurzen Ketten vorkommen. Aufgrund ihres Hämolyseverhaltens auf bluthaltigen Kulturmedien werden sie zu den α -hämolisierenden (vergrünenden) Streptokokken gerechnet. Anhand der unterschiedlichen chemischen Feinstruktur der Kapselpolysaccharide, die als Antigen dienen, werden die Pneumokokken in 90 Serovaren unterteilt. Prinzipiell sind für den Menschen alle Serotypen pathogen, jedoch treten gegenwärtig vor allem die Gruppen 3, 4, 6, 7, 9, 12, 14, 18, 19 und 23 klinisch am häufigsten auf (Johnston, Jr., 1991; Musher, 2003). Dabei variiert die Häufigkeit der verschiedenen Serotypen in verschiedenen Ländern und ist altersabhängig. Insbesondere Kleinkinder und ältere Menschen zeigen abweichende Serotypenverteilungen bei Pneumokokkeninfektionen.

Erstmals wurden Pneumokokken 1881 als Krankheitserreger des Respirationssystems isoliert (Austrian, 1981). Pneumokokken können weniger gefährliche Infektionserkrankungen verursachen, wie Infektionen des oberen Respirationstraktes oder eine Otitis media. Häufig findet man sie als Erreger lebensbedrohender, invasiver Infektionen wie Pneumonien oder Meningitiden. Der größte Anteil invasiver Pneumokokkeninfektionen präsentiert sich dabei als Pneumonie. Seltener findet man Pneumokokken als Erreger einer Endokarditis oder einer Peritonitis.

S. pneumoniae sind die häufigsten Erreger ambulant erworbener Pneumonien, die einer Behandlung im Krankenhaus bedürfen (Marrie, 1998). Mit herkömmlichen, mikrobiologisch-kulturellen Nachweismethoden liegt der Anteil von Pneumokokkenpneumonien in aktuellen Untersuchungen bei 10-30% (Bartlett und Mundy, 1995; Marrie, 1998; Ruiz et al., 1999). In Studien, bei denen mittels immunologischer Nachweismethoden Antikörper gegen Pneumolysin bzw. Immunkomplexe, bestehend aus Pneumolysin und Antikörpern, nachgewiesen wurden, konnten Pneumokokken in 32% - 55% der Fälle als Erreger einer ambulant erworbenen Pneumonie festgestellt werden (Burman et al., 1991; Kauppinen et al., 1995; Porath et al., 1997). Eine kritische Datenanalyse der *British Thorax Society* von 148

Patienten, bei denen der mikrobiologisch-kulturelle Erregernachweis kein Ergebnis erbrachte, kam zu dem Schluß, dass die Mehrzahl dieser Fälle durch *S. pneumoniae* hervorgerufen wurde (Farr et al., 1989). In den 1993 veröffentlichten Richtlinien geht die *British Thorax Society* daher davon aus, dass ca. 60-75% der ambulant erworbenen Pneumonien durch *S. pneumoniae* hervorgerufen werden (Bartlett und Mundy, 1995). Verschiedene neuere Studien zeigen einen Anstieg von invasiven Pneumokokkeninfektionen (Giesecke und Fredlund, 1997; de Neeling et al., 1999).

Die Morbidität und Mortalität invasiver Pneumokokkeninfektionen ist, trotz Einführung moderner Antibiotikatherapie und intensivmedizinischer Maßnahmen, nach wie vor hoch (Afessa et al., 1995; Plouffe et al., 1996; Brandenburg et al., 2000; Kalin et al., 2000). Fine et al. fanden in einer Meta-Analyse von ambulant erworbenen Pneumonien bei Pneumokokkenpneumonien eine Mortalität von 6,4% (Fine et al., 1996). Pneumokokken sind die häufigsten Erreger schwerer Pneumonien, die eine Behandlung auf einer Intensivstation notwendig machen (Rello et al., 1993; Ruiz et al., 1999). Dabei zeigen schwere Pneumokokkenpneumonien, eine Mortalität von 37% (Fine et al., 1996). Außerdem sind Pneumokokkenpneumonien häufiger mit einer Bakteriämie verbunden als andere Pneumonien (Fang et al., 1990). So sind ca. 60% aller Pneumonien, die mit einer Bakteriämie einhergehen, durch Pneumokokken verursacht. Eine Bakteriämie ist ein prognostisch ungünstiges Zeichen, da sie die Unfähigkeit des Körpers widerspiegelt, den Primärherd einer Infektion zu lokalisieren und so die Gefahr einer disseminierten Infektion birgt.

S. pneumoniae ist neben *N. meningitidis* die häufigste Ursache einer bakteriellen Meningitis im Erwachsenenalter (Schuchat et al., 1997; Koedel et al., 2002). Meningitiden machen ca. 4% aller invasiven Pneumokokkeninfektionen aus. Verglichen mit Meningitiden durch andere Erreger entwickeln Patienten mit Pneumokokkenmeningitiden häufiger intrakranielle und systemische Komplikationen und haben dementsprechend eine hohe Sterblichkeit von 20-30% (Hoen et al., 1993; Schuchat et al., 1997; Kastenbauer und Pfister, 2003; Auburtin et al., 2002). Fast Zweidrittel der Patienten, die an einer Pneumokokkenmeningitis erkranken, entwickeln schwerwiegende intrakranielle Komplikationen mit Hirnödem, Hydrozephalus, Vaskulitis, ischämischen Infarkten, Sinusvenenthrombosen oder intrazerebralen Blutungen (Kastenbauer und Pfister, 2003). Von den Überlebenden zeigen bis zu 30% neurologische und neuropsychologische Langzeitfolgeschäden (Koedel et al., 2002).

Ein zunehmendes Problem ist die weltweit ansteigende Anzahl von Penicillin- und Makrolidresistenzen. Der Anteil resistenter Stämme variiert dabei deutlich zwischen den verschiedenen Ländern. In einer weltweit durchgeführten, multizentrischen Studie zur

Prävalenz von Antibiotikaresistenzen von *S. pneumoniae* fand sich im europäischen Raum eine Resistenz für Penicillin (MIC, $\geq 2\mu\text{g/ml}$) in 10% und für Makrolide in 20% der Fälle. Weltweit wurde dabei eine ansteigende Tendenz bereits für den Beobachtungszeitraum von 1997-1999 nachgewiesen (Minton und Macfarlane, 1996; Hoban et al., 2001). In Deutschland reagiert nach neueren Studien immer noch die Mehrzahl der Pneumokokkenstämme sensibel auf Penicillin (92% – 98% der *S. pneumoniae*-Stämme sind voll sensibel). Jedoch konnten Reinert und Mitarbeiter in ihrer Studie eine signifikante Zunahme penicillin- und makrolidresistenter Stämme in Deutschland feststellen. Sie beobachteten einen deutlichen Anstieg makrolidresistenter Pneumokokkenstämme von 3,0% in 1992 auf 15,3% in 2000. Der Anteil der auf Penicillin intermediär sensiblen Pneumokokkenstämme stieg im Beobachtungszeitraum von 1,8% (1992) auf 5,8% (2000) (Reinert et al., 2002). In Frankreich und Spanien sind bereits 66% der *S. pneumoniae*-Stämme intermediär sensibel oder resistent auf Penicillin (Sahm et al., 2000; Reinert et al., 2002).

Die weltweit steigenden Fälle von Penicillinresistenzen, die ansteigenden Zahlen von Menschen mit einem kompromittierten Immunsystem (z.B. infolge einer HIV-Infektion, immunsuppressiven Therapie usw.) und das zunehmenden Alter der Patienten mit entsprechend erhöhtem Infektionsrisiko deuten an, dass Morbidität und Mortalität von Pneumokokkenerkrankungen ein zunehmendes Problem darstellen werden.

1.1.2. Ätiologie und Pathogenese

Eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung einer Pneumokokkeninfektion ist die Adhäsion und Kolonisation der Erreger an die Schleimhaut des oberen Respirationstrakts. Ungefähr 40-70% gesunder Erwachsener sind Keimträger (Kayser, 1998). Entsprechend gehen Pneumokokkeninfektionen häufig von der eigenen Flora aus (endogene Infektion). Bei Patienten, die an einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung leiden, hat man festgestellt, dass die sonst sterilen Bronchi des tiefen Respirationstraktes auch außerhalb einer akuten Exazerbation bereits mit Pneumokokken und anderen Erregern kolonisiert sind (Catterall, 1999). Die Kolonisation der Schleimhaut wird durch verschiedene Virulenzfaktoren begünstigt. Die Adhärenz der Pneumokokken an nasopharyngeale Zellen erfolgt durch die Interaktion von Oberflächenproteinen der Erreger mit Teilen eines auf Epithelzellen befindlichen Glycolipid-Rezeptors (Feldman et al., 1992).

Weitere Virulenzfaktoren sind das sogenannte Pneumolysin sowie eine IgA Protease (Paton et al., 1993). Pneumolysin ist in der Lage zilienträgende Epithelien des Respirationstraktes

und Abwehrzellen funktionell zu beeinträchtigen und durch Porenbildung zu lysieren (Rubins et al., 1996; Mitchell und Andrew, 1997). Dies führt unter anderem zu einer Störung der mukociliären Clearance. Pneumokokkenvarianten, die kein Pneumolysin bilden, sind in ihrer Virulenz deutlich abgeschwächt (Rayner et al., 1995). Die von Pneumokokken abgegebene IgA-Protease baut IgA-Antikörper ab. Pneumolysin und die IgA-Protease unterstützen die Kolonisation der Pneumokokken auf der Schleimhaut und ermöglichen so das Überleben der Pneumokokken in vivo.

An der Invasion der Erreger ist das sogenannte „Cholinbindende Protein A“ (Cbp A) auf der Oberfläche der Pneumokokken beteiligt. Cbp A bindet an Immunglobulin (Ig) - Rezeptoren auf der Oberfläche der Schleimhaut des Respirationstrakts. Diese Ig-Rezeptoren spielen normalerweise eine wichtige Rolle beim Transport von Antikörpern über die Schleimhautbarriere. Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass *S. pneumoniae* mittels Cbp A, welches an die Ig-Rezeptoren der Schleimhautepithelien bindet, sich den Transcytoseapparat der Epithelzellen zu Nutze machen und so die Schleimhautbarriere überwinden können (Zhang et al., 2000; Kaetzel, 2001).

Ein besonders wichtiger Virulenzfaktor der Pneumokokken ist die Kapsel, welche den Erreger vor der Phagozytose schützt. Die Kapsel setzt sich aus einem von insgesamt 90 serologisch unterschiedlichen Polysacchariden zusammen. Anhand des jeweiligen Kapselpolysaccharids können Pneumokokken in 90 Serovare unterteilt werden. Die Kapsel der Erreger, die diese vor der Phagozytose schützt, das Pneumolysin sowie weitere zu der Familie der Cbp gehörende Virulenzfaktoren spielen für das Überleben der Erreger im Blut und damit für die Ausbreitung und Absiedlung der Pneumokokken im Wirt eine entscheidende Rolle (Rubins et al., 1996; Mitchell und Andrew, 1997). Kapsellose Varianten sind weitgehend apathogen.

Klinisch ebenfalls relevante Proteine in der Zellwand der Pneumokokken sind die sogenannten „Penicillinbindenden Proteine“ (PBP). Hierbei handelt es sich um Transcarboxypeptidasen, die essentiell an der Biosynthese der Zellwand beteiligt sind. Penicilline können an diese Proteine binden und bewirken dadurch eine Störung der Zellwandbiosynthese. Die Penicillinresistenz von Pneumokokken beruht auf modifizierten PBPs, die eine geringere Affinität und Empfindlichkeit zu Penicillinen aufweisen. Veränderungen der Struktur der PBP, die mit einer verminderten Affinität zu Penicillin einhergehen, können durch Transfer von genetischem Material, welches für Teile der penicillinbindenden Proteine kodiert, von Keim zu Keim übertragen werden (Watson et al., 1995).

Die Zellwand-Teichonsäure der Bakterien induziert die entzündliche Reaktion im Wirt. Sie aktiviert das Monozyten / Makrophagen- und das Komplementsystem.

Neben den Virulenzfaktoren des Erregers beeinflussen verschiedene Wirtsfaktoren die Entstehung von Pneumokokkeninfektionen. Die Ausbreitung der Erreger in der Lunge erfolgt durch (Mikro-)Aspiration infizierten Materials. Dieses wird durch Abschwächung des Hustenreflexes, eine gestörte Innervation des Larynx, vermehrte Schleimproduktion und eine gestörte mukociliäre Clearance gefördert; Alkoholismus, Nikotinabusus oder Krampfleiden prädisponieren daher zur Entwicklung einer Pneumonie. Die Wirtsabwehr kann auf unterschiedlichste Weise gestört sein und so die Entstehung einer Infektion begünstigen. Virale Infektionen schwächen die epitheliale Integrität und die mukociliäre Clearance. Virale Produkte und die Immunantwort des Wirts auf eine virale Infektion schaffen ein günstiges Milieu für die Adhäsion und Invasion der Pneumokokken, unter anderem durch eine vermehrte Exposition von epithelialen Oberflächenrezeptoren (Tong et al., 2001). Dieses führt zu einer hohen Inzidenz von Pneumokokkenpneumonien während Influenzaepidemien.

In der Literatur finden sich verschiedene Risikofaktoren für Pneumokokkeninfektionen; zu diesen zählen: Rauchen, Alkoholismus, chronische Herz- und Lungenerkrankungen wie Herzinsuffizienz und COPD, neurologische Erkrankungen wie Demenz, Anfallsleiden und zerebrovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus, vorausgegangene Virusinfektion, Alter > 70 Jahre, angeborene oder erworbene Immundefekte wie HIV-Infektion und immunsuppressive Therapie sowie die Splenektomie (Lipsky et al., 1986; Marrie, 2000; Koivula et al., 1994; Thomsen et al., 2004). Diese Risikofaktoren begünstigen auf verschiedene Weise die Entstehung einer Pneumokokkeninfektion.

Eine Infektionserkrankung - so auch eine Pneumokokkeninfektion - führt in der Regel zu einer „Verletzung“ der Integrität des Wirtsorganismus. Das Immunsystem des Wirts reagiert auf den Krankheitserreger mit einer sogenannten Immunantwort, die dazu dient, den Infektionserreger zu eliminieren und die Integrität des Wirts wiederherzustellen. Dabei kann es zu verschiedenen lokalen und systemischen Immunreaktionen kommen. Das klinische Erscheinungsbild der systemischen Immunantwort ist die Sepsis.

1.2. Sepsis und ihre Folgeerscheinungen

1.2.1. Definition der Sepsis

Sepsis und ihre Folgeerscheinungen sind die systemisch entzündliche Antwort auf eine Infektion. Das *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine* hat in einer Konsens-Konferenz 1992 standardisierte Definitionen und Richtlinien für den Begriff Sepsis und ihre Folgeerscheinungen gegeben. Diese wurden durch Bone und Mitarbeiter ergänzt und erweitert, sind mittlerweile allgemein akzeptiert und haben zur Einteilung unserer Patienten gedient (Bone et al., 1992; Bone et al., 1997). Die Standardisierung der Terminologie war aufgrund der uneinheitlichen klinischen Verwendung dieser Begriffe notwendig. Die genauen Definitionen, wie sie zur Einteilung unserer Patientengruppen gedient haben, sind unter Punkt 2.2.3.1. aufgeführt

1.2.2. Anti- und Proinflammation, Pathogenese

Die Begriffe Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock repräsentieren fortschreitende Stadien bzw. verschiedene Schweregrade derselben Erkrankung einer systemisch entzündlichen Antwort auf eine Infektion. Vermittelt wird diese systemische entzündliche Antwort durch Zytokine. Zytokine sind Glykoproteine, die regelnd in Immun- und Entzündungsreaktionen sowie in die Hämatopoese eingreifen können. Sie bilden ein hochkomplexes Netzwerk innerhalb des Immunsystems. Zytokine, die an der Regulation von Entzündungsreaktionen beteiligt sind können funktionell in pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine unterteilt werden. Wichtige pro-inflammatorische Zytokine sind IL-1, IL-6 und TNF- α sowie IFN- γ . Diese fördern durch unterschiedliche Wirkungen den entzündlichen Prozess. Als Beispiel sei hier der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) als wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin genannt. TNF- α aktiviert verschiedene Immunzellen, stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche, fördert die Freisetzung weiterer Zytokine, führt zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems und verstärkt den Arachidonsäure-Stoffwechsel. Die bei seiner Entdeckung beobachtete zytotoxische Wirkung, die u.a. zur Lyse von Tumorzellen führt, hat zur Namensgebung des Zytokins geführt. TNF- α löst bei intravenöser Verabreichung viele typische Symptome einer systemischen Entzündungsreaktion aus: Fieber, Tachykardie, Tachypnoe, Leukozytose, Myalgien und Vigilanzstörung.

Anti-inflammatorische Zytokine - zu diesen gehört Interleukin-10 (IL-10) - hemmen dagegen Entzündungsreaktionen. Über unterschiedliche Mechanismen führen sie zu einer Herunterregulierung der Immunreaktion, z.B. durch Hemmung der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, Deaktivierung von Leukozyten oder einer verminderten Antigenpräsentation.

Eine zentrale Rolle für die Zytokinfreisetzung als Antwort auf eine Infektion hat das Makrophagen/ Phagozytensystem (MPS). Zu Beginn einer Sepsis kommt es, ausgelöst durch den Erreger, zunächst zu einer ausgeprägten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen. Das sich entwickelnde klinische Bild wird unter den Begriff *Systemic Inflammatory Response Syndrome* - kurz *SIRS* - zusammengefasst. Der pro-inflammatorischen Antwort folgt eine Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen z.B. IL-4, IL-10, IL-1ra, TGF-beta (Zanotti et al., 2002). Diese Reaktion bezeichnet Bone, der *SIRS* gegenüberstellend, als *Compensatory Antiinflammatory Reaction Syndrom (CARS)* (Bone et al., 1997). Die kompensatorische anti-inflammatorische Reaktion hemmt die pro-inflammatorische Reaktion im Sinne eines autokrinen „Feedbacks“. Das physiologische Ziel der anti-inflammatorischen Reaktion ist es, die pro-inflammatorischen Reaktionen herunterzuregeln und den Organismus vor schädlichen Wirkungen der pro-inflammatorischen Reaktion zu schützen. Der Organismus muss dabei eine Homöostase zwischen Pro-inflammation und Anti-inflammation einstellen. Sowohl eine gesteigerte Pro-inflammation wie auch eine überschießende anti-inflammatorische Reaktion können schwerwiegende Folgen für den Verlauf der Erkrankung haben.

Bone und Mitarbeiter haben für die Pathogenese und den Verlauf von septischen Erkrankungen das folgende Schema erarbeitet:

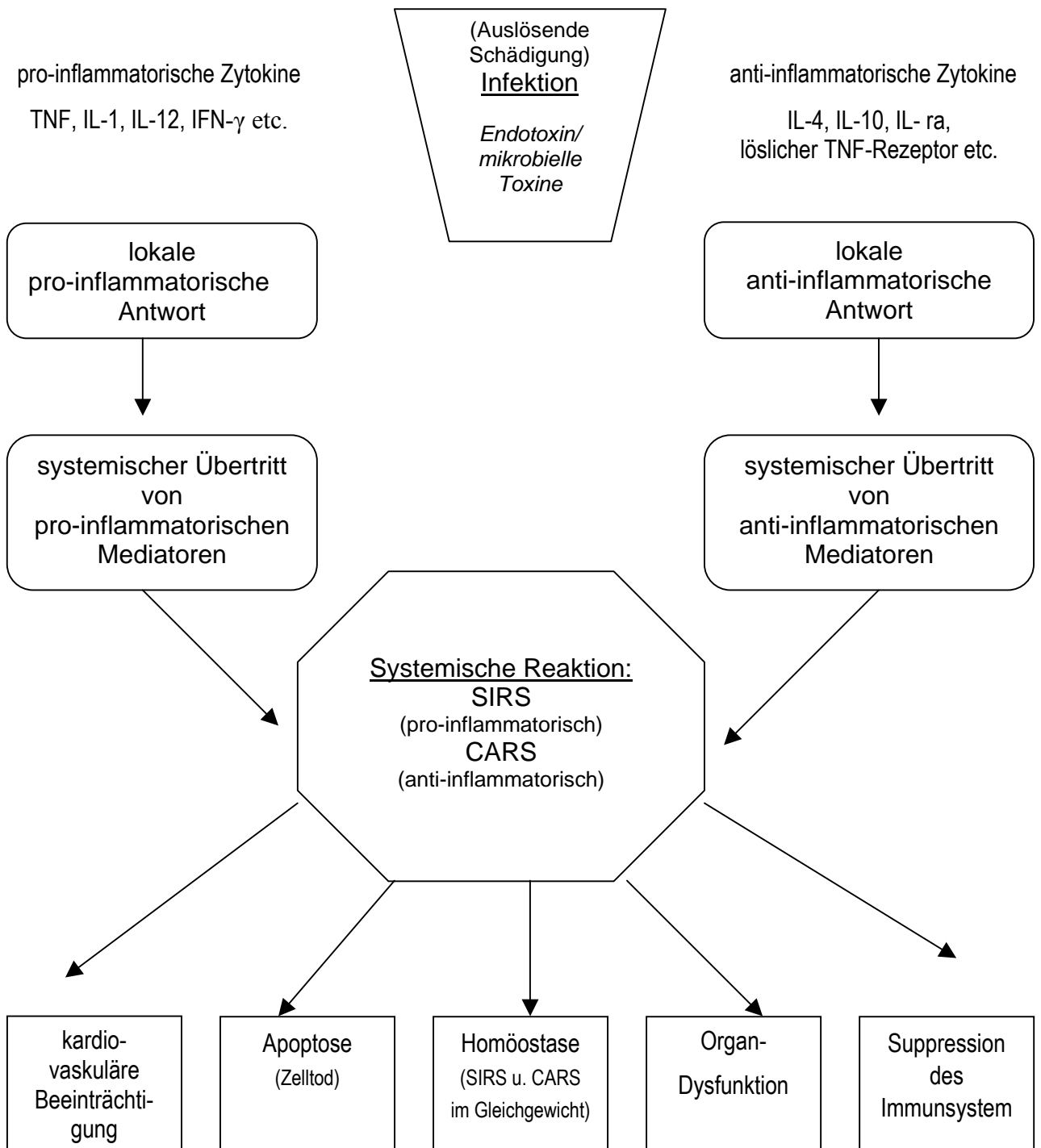


Abbildung 1: Schematische Darstellung, Verlauf einer septischen Erkrankung. Eine Infektion führt - vermittelt durch entsprechende Zytokine - zur Aktivierung einer pro- und anti-inflammatorischen Reaktion. Die Balance zwischen diesen beiden Mechanismen ist entscheidend für den Verlauf (Abbildung in Anlehnung an Abb. 4 aus Bone et al. 1997).

Im Rahmen einer bakteriellen Infektion kommt es lokal, vermittelt durch verschiedene Mediatoren, zu einer pro-inflammatorischen Reaktion, die dazu dient, die Infektion zu begrenzen, die Erreger zu eliminieren und entstandene Schäden auszubessern. Zeitlich versetzt entsteht, stimuliert durch pro-inflammatorische Zytokine, die kompensatorische anti-inflammatorische Reaktion, die ein Überschießen der pro-inflammatorischen Reaktion und damit eine potentielle Schädigung durch die entzündlichen Prozesse verhindert. Bei entsprechender Schwere des initialen Insults kommt es zu einem Übertritt zunächst der pro-inflammatorischen später auch der anti-inflammatorischen Mediatoren in den Blutkreislauf, so dass sich eine systemische pro- und anti-inflammatorische Reaktion entwickelt. Überwiegt die pro-inflammatorische Reaktion, entsteht eine massive systemisch entzündliche Antwort (*Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS*). Pathophysiologisch entstehen eine zunehmende endotheliale Dysfunktion mit einer erhöhten mikrovaskulären Durchlässigkeit, eine Thrombozytenaggregation, eine Aktivierung des Gerinnungssystems und eine Störung der Mikrozirkulation. In der Folge kommt es zu Organischämien mit einer Sauerstoffunterversorgung, die zu Organdysfunktionen und Organversagen führen kann.

Ein Überwiegen der kompensatorisch, anti-inflammatorischen Reaktion (*Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome, CARS*) kann dagegen zu einem Stadium der Immunsuppression führen. Letztere ist u.a. Folge einer Deaktivierung des Makrophagen/Phagozyten Systems (MPS), aber auch der Inhibition pro-inflammatorischer Mediatoren, die für die Regenerierung des Organismus notwendig sind. Eine überschießende anti-inflammatorische Reaktion hat eine gestörte Erregerelimination zur Folge. Diese Immunsuppression erklärt möglicherweise auch eine erhöhte Anfälligkeit von schwer septischen Patienten gegenüber nosokomialen Sekundärinfektionen.

In diesem Modell bestimmt das Zusammenspiel von Bestandteilen des *SIRS* und des *CARS* den klinischen Verlauf einer septischen Erkrankung. Dieses Zusammenspiel wird durch viele Faktoren beeinflusst, unter anderem durch die Beschaffenheit des Erregers, der die entzündliche Reaktion auslöst, aber auch durch interindividuelle Unterschiede in der Immunantwort des Wirts (Bone, 1996; Bone et al., 1997).

Hierbei stellt sich unter anderem die Frage, in wie weit genetisch determinierte Unterschiede im sogenannten „Zytokin-Netzwerk“ die Immunantwort des Wirts beeinflussen. Wir haben uns in diesem Zusammenhang mit dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 beschäftigt. Dieses Zytokin besitzt, wie im folgenden dargestellt, eine zentrale Rolle für die anti-inflammatorische Reaktion.

1.3. Interleukin-10

Erstmals wurde Interleukin-10 (IL-10) als sogenannter „Zytokinsyntheseinhibierender Faktor“ (*CSIF – Cytokine Synthesis Inhibiting Factor*) 1989 von Fiorentino bei der Maus beschrieben. Fiorentino konnte zeigen, dass dieser Faktor von T-Helferzellen Typ 2 (TH-2 Zellen) produziert wird und die Sekretion der Zytokine durch T-Helferzellen Typ 1 (TH-1 Zellen) hemmt (Fiorentino et al., 1989).

Kurze Zeit später wurde murine und humane cDNA von IL-10 isoliert. Weitere Studien zeigten, dass IL-10 ein weites Spektrum der immunologischen Funktionen des Monozyten/Makrophagensystem hemmen kann.

1.3.1. Struktur, Produktion und Regulation von IL-10

IL-10 ist ein Polypeptid bestehend aus 160 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 18,5 kDa. Die Sekundärstruktur besteht zu 60 % aus einer Helix, die durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert wird. In der Tertiärstruktur bilden zwei Polypeptidketten ein nicht kovalent verbundenes v-förmiges Dimer. Sowohl IL-10 als auch der IL-10-Rezeptor zeigen auffällige strukturelle Homologien mit Interferon- γ bzw. dem Interferon- γ -Rezeptor (Zdanov et al., 1995). Das Gen, welches für IL-10 codiert, ist auf Chromosom 1 lokalisiert (Kim et al., 1992). IL-10 kann von verschiedenen Zelltypen gebildet werden. Hierzu zählen: Makrophagen/ Monozyten, CD 4⁺ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, eosinophile Leukozyten und Keratinocyten (Howard und O'Garra, 1992; Lalani et al., 1997).

Bei gesunden Menschen kommt IL-10 im Serum nur in sehr geringen Konzentrationen, unterhalb der Nachweisgrenze, vor (Gomez-Jimenez et al., 1995; Marchant et al., 1994b). Im Rahmen einer Infektion wirken verschiedene Substanzen stimulierend auf die Produktion bzw. Sekretion von IL-10. Erreger-Antigene und pro-inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) induzieren die Produktion von IL-10 (Moore et al., 2001; van der Poll und van Deventer, 1999). IL-4, IL-13 und IFN- γ hemmen die Bildung von IL-10. IL-10 selbst hemmt die Bildung von IL-10-mRNA im Sinne einer negativen Rückkopplung (de Waal et al., 1993; Chomarat et al., 1993; de Waal et al., 1991b).

1.3.2. IL-10-Rezeptor, Signaltransduktion

Der Interleukin-10-Rezeptor (IL-10R) hat ein Molekulargewicht von 90-110 kDa und besteht aus zwei Untereinheiten, die zur Familie der Interferon-Rezeptoren gehören. Eine Untereinheit (IL-10R α) bindet IL-10 an der Zelloberfläche; die andere Untereinheit (IL-10R β) ist an der Signaltransduktion beteiligt (Liu et al., 1994). Das Gen des IL-10-Rezeptors wurde auf Chromosom 11 lokalisiert (Liu et al., 1994).

Der IL-10-Rezeptor wird von den meisten hämatopoetischen Zellen exprimiert. Auch einige nicht hämatopoetische Zellen wie Fibroblasten, Epidermiszellen und Keratinozyten können den IL-10-Rezeptor exprimieren (Liu et al., 1994; Liu et al., 1997; Ho und Moore, 1994; Moore et al., 2001). Eine Aktivierung von Monozyten und Makrophagen ist assoziiert mit einer vermehrten Expression des IL-10-Rezeptors. Monoklonale Anti-IL-10R α Antikörper können alle bekannten Aktivitäten von IL-10 blockieren (Liu et al., 1994).

Die Signaltransduktion des humanen IL-10-Rezeptors wird durch das Janus-Kinase / *STAT*-Kaskade-System vermittelt. Hierbei werden nach Bindung von IL-10 an den IL-10-Rezeptor auf der zyttoplasmatischen Seite des Rezeptors mittels einer Tyrosinkinase (Janus-Kinase) die *second messenger* *STAT-1* und *STAT-3* (*Signal Transduktion and Activation of Transcription type 1* und *3*) phosphoryliert und dadurch aktiviert. Dieses führt zur Bildung DNA-bindender-Komplexe. Durch Bindung dieser DNA-bindenden-Komplexe an spezifische Stellen der nukleären DNA werden, abhängig vom jeweiligen Zelltyp, entsprechende Proteine transkribiert (Finbloom und Winestock, 1995; Lai et al., 1996; Wehinger et al., 1996; Riley et al., 1999). Makrophagen von Janus-Kinase defizienten Mäusen reagieren nicht auf IL-10 (Rodig et al., 1998). „Knockout“-Mäuse, denen die Expression von *STAT-3* fehlt, reagieren ebenfalls komplett refraktär auf IL-10 (Riley et al., 1999; Takeda et al., 1999).

Neben der Janus Kinase / *STAT*- Kaskade sind, abhängig vom Zelltyp, weitere Mechanismen der Signaltransduktion für IL-10 beschrieben.

1.3.3. Die Rolle von IL-10 im Immunsystem

Die Hauptfunktion von IL-10 ist die Begrenzung pro-inflammatorischer Reaktionen des Organismus.

Im Folgenden werden die anti-inflammatorischen Effekte von IL-10 dargestellt:

- Durch die Hemmung antigenstimulierter TH-1 Zellen und aktivierter Monozyten/ Makrophagen inhibiert IL-10 die Synthese der meisten pro-inflammatorischen Zytokine. Die Hemmung antigenstimulierter TH-1 Zellen entsteht sowohl direkt durch eine verminderte T-Zell-Proliferation als auch indirekt über eine verminderte Antigenpräsentation der *MHC(Major Histocompatibility Complex)*-II-tragenden Zellen, die für die TH-1-Zellaktivierung bedeutend sind (s.u.). Außerdem führt IL-10 zu einer Abnahme co-stimulatorischer Signale wie IL-2, die zur Aktivierung der T-Helferzellen notwendig sind. In Tabelle 1 sind die wichtigsten durch IL-10 herunterregulierten, pro-inflammatorischen Zytokine mit einer kurzen Beschreibung ihrer Wirkungen, die dadurch beeinflusst werden, aufgelistet (de Waal et al., 1993; D'Andrea et al., 1993; Bogdan et al., 1991; Marchant et al., 1994a; Moore et al., 2001; Bogdan und Nathan, 1993; Fiorentino et al., 1991; de Waal et al., 1991a; de Waal et al., 1991b; Gruber et al., 1994) .

Tabelle 1: *Durch Interleukin-10 herunterregulierte pro-inflammatorische Zytokine.*

Zytokin	Wirkung des Zytokins
TNF- α	Stimulation der Synthese u. Sekretion vieler pro-inflammatorischer Zytokine (Monozyten/ Makrophagen), pyrogene Wirkung, Aktivierung von Neutrophilen und des Gerinnungssystems, Endothelaktivierung (Induktion von ICAM-1);
IFN- γ	Aktivierung des Makrophagen/ Phagozyten-Systems (MPS) und der natürlichen Killerzellen (NK- Zellen), induziert viele antimikrobielle Funktionen des MPS wie Phagozytose, Produktion von O ₂ ⁻ und NO;
IL-1	T-Zell- und Makrophagenaktivierung, pyrogene Wirkung;
IL-2	T-Zell-Wachstumsfaktor, bewirkt Proliferation von T-Zellen;
IL-6	Proliferation u. Differenzierung von T- und B-Zellen, Verstärkung der Aktivität von NK-Zellen, Induktion von Immunglobulinproduktion (B-Zellen) und Akut-Phase-Proteinen (Leber);
IL-8	chemotaktisches Molekül für Neutrophile;
IL-12	aktiviert NK-Zellen und T-Zellen;
GM-CSF/ G-CSF	Koloniestimulierende Faktoren der Granulozyten/ Makrophagenreihe; fördern die Bildung und Ausreifung entsprechender Immunzellen;

- IL-10 bewirkt eine vermehrte Synthese von weiteren anti-inflammatorischen Molekülen, wie z.B. des IL-1-Rezeptor-Antagonisten (van der Poll et al., 1997b) .
- Durch IL-10 wird die Expression von *MHC-II*-Molekülen auf der Oberfläche des Makrophagen/ Phagozyten-Systems (MPS) gehemmt. Die Antigenpräsentation ist vermindert. Als Folge ist die Interaktion des MPS mit den T-Helferzellen gestört. Daraus resultiert zum einen, dass die Proliferation der Phagozyten und ihre

Fähigkeit, Bakterien abzutöten, gehemmt ist; zum anderen entsteht eine Abnahme der antigeninduzierten Aktivierung und Proliferation der CD 4⁺ T-Helferzellen (Ding et al., 1993; Fumeaux und Pugin, 2002; Willems et al., 1994; de Waal et al., 1991b).

- IL-10 beeinträchtigt die Generierung von Sauerstoffradikalen und Stickoxiden in Monozyten und Makrophagen. Die mikrobizide Aktivität des MPS wird hierdurch abgeschwächt (Cunha et al., 1992; Kuga et al., 1996; Gazzinelli et al., 1992).
- Durch IL-10 kommt es zu einer verminderten Expression von *Toll Like Receptor (TLR) 4*, dem signaltransduzierenden Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS). Damit nimmt u.a. die Wirkung von LPS als pro-inflammatorischem Stimulus ab (Muzio et al., 2000).
- IL-10 hemmt die Synthese von Arachidonsäure-Metaboliten und anderer Gewebefaktoren. Es vermindert die Produktion von Prostaglandin-E2 durch eine Hemmung der Cyclooxygenase-2. Dies wirkt sich auch auf die Bildung von Matrix-Metalloproteinasen aus. Infolgedessen inhibiert IL-10 die Fähigkeit von Phagozyten, die extrazelluläre Matrix zu verändern (Niuro et al., 1995; Mertz et al., 1994).
- IL-10 reduziert die Migrationsfähigkeit der Zellen des Immunsystems durch die Hemmung der Bildung von Chemotaxinen.

Neben diesen anti-inflammatorischen Wirkungen sind auch einige pro-inflammatorische Effekte, die vor allem B-Lymphozyten betreffen, beschrieben. Durch IL-10 wird eine vermehrte B-Zell-Proliferation, Differenzierung und Antikörperproduktion hervorgerufen (Go et al., 1990; Itoh und Hirohata, 1995; Rousset et al., 1992). Außerdem bewirkt IL-10 bei B-Lymphozyten ein verbessertes Überleben und beeinflusst das „Isotypen Switching“ (Levy und Brouet, 1994; Burdin et al., 1995).

Für die Bedeutung von IL-10 im Immunsystem kann festgehalten werden, dass es sich bei diesem um ein potentes anti-inflammatorisches Zytokin handelt, welches in vielfältiger Weise in die inflammatorischen Reaktionen des Organismus eingreift. Die physiologische Aufgabe von IL-10 ist, die potentiell schädliche Wirkung einer überschießenden pro-inflammatorischen Reaktion und eine daraus resultierende Schädigung des Wirtsorganismus

zu verhindern. Hervorzuheben ist die komplexe Hemmung des Monozyten-/Makrophagensystems. Diese kann eine verminderte bakterielle Clearance und dadurch einen protrahierten und schweren Krankheitsverlauf zur Folge haben.

In einem murinen Pneumoniemodell mit *Chlamydia trachomatis* weisen Mäuse, die genetisch bedingt vermehrt IL-10 produzieren, im Vergleich zu Wildtypmäusen, eine verminderte bakterielle Clearance und eine erhöhte Mortalität auf (Yang et al., 1996). Fumeaux und Pugin konnten zeigen, dass es im Rahmen einer schweren Sepsis, vermittelt durch IL-10, zu einer Hemmung des Monozyten-/Makrophagensystems kommt und dass der Schweregrad des septischen Krankheitsbildes hiermit eng korreliert ist (Fumeaux und Pugin, 2002).

1.3.4. Einfluß genetischer Faktoren auf die IL-10-Produktion: Der IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus

Das Ausmaß der transkriptionellen Aktivität eines Gens hängt von der Bindung regulatorischer Faktoren an bestimmte Sequenzen in der Promotorregion ab. Mutationen in Promotorregionen eines Gens von Zytokinen können die Bindung transkriptioneller Faktoren beeinflussen. Hierdurch kann es zu einer reduzierten transkriptionellen Aktivität und Zytokinproduktion kommen.

Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass die Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität des IL-10-Gens genetisch determiniert sind. Westendorp hat in seinen Untersuchungen festgestellt, dass 75 % der Schwankungen in der IL-10-Produktion genetisch bedingt sind (Westendorp et al., 1997). Eine neuere Studie kommt zu dem Schluss, dass mindestens 50 % der interindividuellen Schwankungen der IL-10-Konzentration genetisch beeinflusst werden (Reuss et al., 2002).

Die Promotorregion des IL-10-Gens wurde im Bereich zwischen Position -1200 und -1000 sowie -750 und -350 ausgehend von der transkriptionellen Startseite lokalisiert (Kube et al., 1995). Turner und Mitarbeiter haben insgesamt drei Polymorphismen in der Promotorregion des IL-10-Gens identifiziert. Hierbei handelt es sich jeweils um biallelische Basenaustauschsubstitutionen (*Single Nucleotide Polymorphismen, SNP*) an Positionen -1082, -819 und -519. Bei dem von uns untersuchten IL-10-Polymorphismus findet sich in Position -1082 eine Guanin zu Adenin Substitution (Turner et al., 1997). Turner und Mitarbeiter zeigten für den IL-10–1082-Promotorgenpolymorphismus eine signifikante Korrelation zwischen Polymorphismus und IL-10-Produktion. Während die beiden anderen Promotorgenpolymorphismen keinen Einfluss auf die IL-10-Produktion hatten, konnten die Autoren

nachweisen, dass in vitro stimulierte Blutmonozyten von Probanden, die homozygot für das Allel G in Position -1082 des IL-10-Gens waren, eine signifikant höhere IL-10-Produktion aufwiesen als solche von Probanden, die nicht homozygot für das Allel G waren.

Reuss fand in seinen Untersuchungen, dass bei Monozyten das IL-10 -1082 Allel A eine höhere Bindungsaffinität zu dem Transkriptionsfaktor PU.1 hat. Dieser Transkriptionsfaktor hemmt im IL-10-Promotor die Genexpression, so dass die höhere Bindungsaffinität des A-Allel mit einer verminderten transkriptionellen Aktivität verbunden ist (Reuss et al., 2002).

Hieraus ergibt sich zusammenfassend, dass Unterschiede in der IL-10-Expression genetisch determiniert sind. Der Polymorphismus in der Promotorregion an Position -1082 des IL-10-Gens beeinflusst die transkriptionelle Aktivität; dabei ist das G-Allel mit einer vermehrten IL-10-Produktion verbunden.

Vor dem Hintergrund, dass IL-10 ein potenter anti-inflammatorischer Botenstoff im Immunsystem ist und es eine Vielzahl von Studien zu entzündlichen Erkrankungen gibt, in deren Pathogenese IL-10 eine wichtige Rolle zu spielen scheint, wird die klinische Relevanz dieser Daten deutlich. Dieser Polymorphismus könnte, wenn auch nicht ursächlich, den Verlauf einer solchen Erkrankung beeinflussen. So haben Westendorp et al. in ihrer Studie nachgewiesen, dass bei Meningokokkenerkrankungen für Patienten aus Familien, die eine Prädisposition für eine hohe IL-10-Produktion besitzen, ein ca. 20-fach erhöhtes Risiko für einen tödlichen Verlauf besteht (Westendorp et al., 1997).

1.4. Fragestellung

Verschiedene Faktoren der Immunabwehr beeinflussen bei dem jeweiligen Wirt den Verlauf von bakteriellen Infektionen. Die Interaktion zwischen Krankheitserreger und Wirt ist dabei entscheidend. Auf der einen Seite stehen die Virulenzfaktoren des Krankheitserregers, auf der anderen die Immunantwort des Wirtes. Ziel der Immunabwehr ist die Elimination des Krankheitserregers und die Wiederherstellung des Gesundheitszustandes. Insbesondere im Rahmen der Sepsis kann die Immunantwort den Wirt jedoch auch schädigen.

Eine besondere Bedeutung in der Sepsispathogenese wird den verschiedenen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen beigemessen. Diese modulieren auf unterschiedlichste Weise das Sepsisgeschehen. Aus einem besseren Verständnis der Vorgänge bei der Immunantwort des Wirts im Rahmen einer septischen Infektion lassen sich möglicherweise neue Strategien entwickeln, um in das Sepsisgeschehen einzugreifen.

Wir haben die Rolle von Interleukin-10, einem wichtigen anti-inflammatorischen Zytokin, auf den klinischen Verlauf von invasiven Pneumokokkeninfektionen untersucht. IL-10 hat vielfältige, vor allem entzündungshemmende Wirkungen im Immunsystem. IL-10 kann die potentiell schädlichen pro-inflammatorischen Effekte von TNF- α und anderer Zytokine, die bei der Entwicklung der Sepsis eine wichtige Rolle spielen, herunterregeln (Bogdan und Nathan, 1993). Zudem konnte im Endotoxinmodell eine protektive Rolle von IL-10 gezeigt werden (Gerard et al., 1993; Marchant et al., 1994a).

Eine durch IL-10 gedrosselte inflammatorische Reaktion kann jedoch die Wirtsabwehr schwächen. In einem murinen Tiermodell bewirkt die Neutralisation von IL-10 bei Klebsiellenpneumonien eine Zunahme des Überlebens (Greenberger et al., 1995). Van der Poll und Mitarbeiter beobachteten, dass die Gabe von IL-10 die Wirtsabwehr der Maus bei Pneumokokkenpneumonien beeinträchtigt (van der Poll et al. 1996).

Da die Exprimierung von IL-10 durch genetische Polymorphismen beeinflusst wird, untersuchten wir in dieser Studie den Einfluss des IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus auf den klinischen Verlauf von invasiven Pneumokokkeninfektionen. Wir stellten hierbei folgende Fragen:

In wie weit beeinflusst der IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus die inflammatorische Antwort auf eine invasive Infektion mit *S. pneumoniae* und damit den klinischen Verlauf der Erkrankung?

Prädisponiert der homozygote IL-10-Genotyp G bei Patienten mit Pneumokokkeninfektionen für eine gesteigerte IL-10 Antwort?

Ist der homozygote IL-10-Genotyp G mit einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert:
Gibt es einen Einfluss auf den Sepsisschweregrad, die Sepsiskomplikationen und die Mortalität?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

	Firma	Zubereitung/ Anmerkung
<u>Vollblut – Assay / IL-10 ELISA</u>		
Chemikalien		
RPMI-Medium 1640, w20mM Hepes, 500 ml	Seromed Bioform	+ 5 ml Penicillin/ Strepto- mycin, + 5 ml L-Glutamin
Penicillin / Streptomycin, 10.000 IE / 10 mg/ml	Biochrom	5 ml / 500ml Medium
L-Glutamin 200 mM	Biochrom	5 ml / 500ml Medium
Lipopolysaccharid (LPS), 25mg; E. coli, Serotyp 026:B6	Sigma	25mg LPS + 50 ml Medium
Lipoteichoic Acid (LTA), 10 mg; Staph. aureus	Sigma	10 mg LTA + 1ml Medium
Immunoassay Kit, Human IL-10	BioSource	untere Nachweisgrenze 15,6 pg/ml
Geräte		
Monovetten, Lithium-Heparin, 5ml	Sarstedt	
Pipetten, Combitips (100-1000µl)	Eppendorf	
Polypropylen-Röhrchen, 5 ml	Greiner	
Brutschrank: Cell House 200	Sternkopf	
Gefriertruhe Nuair	Zapf Instrumente	
Elisa-Reader: SLT 340 ATTC	SLT Instruments	
<u>IL-10 ARMS PCR</u>		
Chemikalien		
Puregene®, DNA Isolation Kit	Gentra Systems	
Isopropanol, rein		
Ethanol, 70%		
dd H ₂ O		
Antisense Primer (5' CAGTGCCAA CTGAGAATTTGG-3')	Eurogentec	

Primer A (sense 5'-ACTA CTAAGGCTTCTTTGGGA A-3')	Eurogentec	
Primer G (sense 5'- CTAC TAAGGCTTCTTTGGGAG-3')	Eurogentec	
Interner Kontroll Primer Mix (Sequenz des humanen growth hormone, antisense 5'- GCCTTCCCAA CCATTCCCTTA – 3', sense 5'-TCACGGATTTCTGTTGT GTTTC 3')	Eurogentec	
desoxy-Nukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Eurogentec	1:10 aus 100mM
DNA Längenstandards VIII	Roche	0,019-1,11 kbp
Hot-Star-Taq® DNA Polymerase	Qiagen	
PCR Puffer		50 mM KCL, 10mM Tris- HCl (ph 8,3 bei 24°C),1,5 mM Mg Cl ₂
MetaPhor® Agarose	FMC BioProducts	
Tris-EDTA Puffer		400 mM Tris Acetat, 10 mM EDTA
Ethidium Bromid	ICN	
DNA Farbstoff		100 ml aus 25g Bromphenol Blau, 25g Xylene Cyanol in 70 ml Wasser mit 30 ml Glycerol
 Geräte		
Monovetten, EDTA, 5 ml	Sarstedt	
Eppendorf Reaktionsgefäß	Eppendorf	
Labor-Kühl-Zentrifuge	Haereus/ Biofuge fresco	
Rüttler	Eppendorf	
Wärmeblock	Eppendorf	
Thermocycler TRIO	Biometra	
Elektrophoresekammer	Agagel Maxi von Biometra	
UV Lichtquelle	INTAS	

2.2. Methoden

2.2.1. Patienten der Studie, Ein- und Ausschlußkriterien

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

Einschlußkriterien:

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

Die Diagnose der Pneumonie basiert auf dem Nachweis

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

Die Diagnose der Meningitis basiert auf dem Nachweis

- klinischer Symptome: akute Kopf- und Nackenschmerzen, Fieber, Vigilanzstörungen; im fortgeschrittenen Stadium neurologische Herdsymptome, symptomatische epileptische Anfälle;
- typischer Untersuchungsbefunde: Zeichen eines meningealen Reizsyndroms: Meningismus, positives Brudzinski- / Kernig-Zeichen; im Verlauf Zeichen eines neurologischen Ausfallsyndroms;
- einer laborchemischen Infektkonstellation im Blut;
- eines charakteristischen Liquorbefunds: granulozytäre Pleozytose, erniedrigter Liquorzucker bei erhöhtem Liquorlaktat, Nachweis von grampositiven Kokken im Direktpräparat;

- eines mikrobiologischen Erregers im Liquor.

Ausschlußkriterien:

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

2.2.2. Probanden der Studie, Ein- und Ausschlußkriterien

Als Kontrollgruppe dienten 50 in Alter und Geschlecht unserer Patientengruppe angegliche Probanden aus der Klinik für Orthopädie. Hierbei handelte es sich um Patienten, die für einen elektiven Eingriff in die Klinik für Orthopädie aufgenommen wurden. Die Kontrollprobanden hatten klinisch keine Infektion und keine laborchemischen Entzündungszeichen. Außerdem galten die gleichen Ausschlußkriterien wie für die Patienten.

2.2.3. Ethik

Patienten und Probanden mußten für die Aufnahme in die Studie volljährig sein. Patienten und Probanden haben in die Aufnahme in unsere Studie schriftlich eingewilligt. Die Studie wurde von dem Ethikkomitee gebilligt.

Ethik-Antrag: Genetische Polymorphismen bei Pneumokokkeninfektionen,
AZ: 98-152, Erstantrag: Dezember 1998.

2.2.4. Erfassung klinischer Daten

Wir haben von unseren Patienten die klinischen Daten in Form standardisierter Untersuchungsbögen zu definierten Zeitpunkten erfasst. Zum Aufnahmezeitpunkt und im Verlauf alle sieben Tage protokollierten wir relevante Laborparameter, aufgetretene Komplikationen, klinische und apparative Untersuchungsbefunde, die medikamentöse Therapie inklusive der antibiotischen Behandlung und eine eventuelle Antibiotikaresistenz. Außerdem haben wir die Mortalität und die Krankenhausaufenthaltsdauer sowie zum Aufnahmezeitpunkt potentielle Risikofaktoren und begleitende chronische Grunderkrankungen erfaßt.

Folgende Risikofaktoren und chronische Grunderkrankungen haben wir protokolliert: Alter, Geschlecht, Fumatorium, Alkoholismus, Aufenthalt in einem Pflege- oder Altersheim, chronische Herzerkrankungen (koronare Herzerkrankung, Herzinsuffizienz), chronische Lungenerkrankungen (Asthma bronchiale, chronisch obstruktive Lungenerkrankung), chronische Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus sowie chronische neurologische Erkrankungen (Krampfleiden, Demenz, zerebrovaskuläre Erkrankungen).

2.2.4.1. Schweregrad der Sepsis/ Einteilung der Patientengruppen

Die Klassifikation des Sepsis-Schweregrades zur Einteilung unserer Patienten haben wir anhand der Definition der Konsensus-Konferenz 1992 des *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*, angepasst durch Bone 1997, durchgeführt (Bone et al., 1992; Bone et al., 1997). Entsprechend haben wir die Patienten zum Aufnahmezeitpunkt und im Verlauf nochmals nach 7 Tagen in die vier Gruppen „Non-Sepsis“, „Sepsis“, „schwere Sepsis“ und „septischer Schock“ eingeteilt. Folgende Definitionen haben wir angewendet:

1. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)

Ein SIRS ist manifest, wenn mindestens zwei oder mehr der folgenden Bedingungen gegeben sind:

- Temperatur > 38 oder < 36 °C
- Herzfrequenz > 90 Schläge/ min
- Atemfrequenz > 20 oder $pCO_2 < 32$ mmHg
- Leukozyten $> 12.000/mm^3$ oder $< 4.000/mm^3$

Diese Veränderungen sollen eine akute Abweichung vom Grundzustand in Abwesenheit von anderen bekannten Gründen für solche krankhaften Erscheinungen sein.

2.Sepsis

Wenn das SIRS, wie oben definiert, Folge eines infektiösen Prozesses ist, spricht man von einer Sepsis. Sepsis ist also eine systemisch entzündliche Reaktion des Wirts auf eine Infektion. In Assoziation mit einer Infektion sind die Bedingungen für die Feststellung einer Sepsis die gleichen wie für die Feststellung des SIRS.

3. schwere (severe) Sepsis

- Die schwere Sepsis ist definiert als Sepsis (s.o.) in Verbindung mit Zeichen der Hypoperfusion oder sepsisinduzierter Hypotonie mit Organdysfunktion: akute Niereninsuffizienz (Anstieg der Retentionswerte, Oligurie, Anurie), Leber-

insuffizienz (Anstieg der Leberenzyme, Zeichen einer Lebersynthesestörung), disseminierte intravasale Gerinnung, akute ZNS-Störung (Bewusstseinsstörungen bis zum Koma), Lungenversagen (ARDS);

- Hypotonie (syst. RR < 90 mmHg oder RR-Reduktion > 40 mmHg) mit Stabilisierung des Blutdrucks nach Flüssigkeitsgabe;

4. septischer Schock

Der septische Schock ist definiert als schwere Sepsis mit zusätzlich sepsisinduzierter Hypotonie. Eine sepsisinduzierte Hypotonie i. S. eines septischen Schocks liegt vor, wenn eine Hypotonie (s.o.) trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution besteht, so dass eine Katecholamin-therapie notwendig wird.

2.2.4.2. APACHE II und APS

Als prognostisches System haben wir zusätzlich am Aufnahmetag den APACHE (*Acute Physiology, Age, Chronic Health Evaluation*) II Score angewandt. Dies ist ein in der Intensivmedizin benutztes Prognosesystem, um den klinischen Schweregrad und die Prognose des erkrankten Patienten zu beurteilen. In den APACHE II Score fließen die Bewertung von 12 routinemäßig erfassten physiologischen Parametern, eine Altersbewertung sowie die Bewertung chronischer Vorerkrankungen ein. Der theoretisch maximal mögliche APACHE-Score-Punktwert ist 77. Ein APACHE Score Punktwert bei unselektierten, intensivpflichtigen Patienten von 25-29 ist mit einer Mortalität von 50 %, Werte > 35 Punkten sind mit einer Mortalität von >80% verbunden (Knaus et al., 1985). Abbildung 1 zeigt den von uns verwendeten APACHE II Score. Der APACHE II beinhaltet den *Acute Physiology Score (APS)*.

2.2.4.3. Komplikationen und Mortalität

Es wurden die Mortalität und Infektions / Sepsis -assoziierte Komplikationen erfasst:

- Pleuraempyem;
- septische Metastasen;
- akute Niereninsuffizienz, akutes Nierenversagen;
- Gerinnungsstörungen, disseminierte intravasale Gerinnung;
- katecholaminpflichtiges septisches Kreislaufversagen;
- Notwendigkeit einer maschinellen Beatmung.

Abbildung 2: APACHE II Score (Knaus et al., 1985).

APS										
Parameter		+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		55-69	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)										

Chronic health points (CHP)	
Leber (in Biopsie nachgewiesene Zirrhose und dokumentierte portale Hypertension oder frühere Episode eines hepatischen Leberversagens)	5
Kardiovaskulär (NYHA IV)	5
Respiratorisch (schwere COPD, Hyperkapnie, O ₂ -Therapie zuhause, pulmonale Hypertension)	5
Renal (dialysepflichtige NI)	5
Immunkompromittiert	5
Punkte	

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

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

Altersbewertung _____ + CHP _____ + APS _____ = **APACHE II** _____

¹ mittlerer art. RR= diastol.RR+1/3x (RR syst.- RR diast.).

² PA_{O₂}=FI_{O₂} x (P_B-P_{H₂O})-(Pa_{CO₂}/RQ) = FI_{O₂} x713 - Pa_{CO₂}/0,8; A-aDO₂= PA_{O₂} - PaO₂.

³ nur benutzen, wenn kein art. BGA vorliegt.

⁴ mg/dl x 88,4 = μmol/l; μmol/l : 88,4 = mg/dl.

2.2.5. Blutentnahme

Es wurden bei den Patienten zwei Blutentnahmen durchgeführt:

1. Bei Aufnahme in die Studie haben wir den Patienten für die Genotypisierung Blut abgenommen. Hierfür wurden EDTA-Kalium-Monovetten verwendet. Die Proben wurden bei -30°C bis zur Typisierung tiefgefroren.
2. Kurz vor der Krankenhausentlassung haben wir den rekonvaleszenten Patienten für die Zytokinstimulation erneut Blut abgenommen. Der CRP-Wert lag zu diesem Zeitpunkt bei unter 5mg/l . Diesen Zeitpunkt haben wir gewählt, um einen etwaigen Einfluß der akuten Inflammationsreaktion des Patienten auf die Zytokinstimulation zu verhindern.

Den Probanden wurde am Aufnahmetag in die orthopädische Klinik für die Genotypisierung EDTA Blut abgenommen.

2.2.6. Bestimmung des IL-10-Spiegels im Vollblutüberstand nach Stimulation

2.2.6.1. Vollblut-Assay

Der Vollblut-Assay beruht auf der Inkubation von vollständigem Blut unter Zugabe eines Nährmediums und eines Antigenstimulus (LPS oder LTA). Durch die Zugabe des Stimulus werden die im Ansatz befindlichen Immunzellen zur Produktion von Zytokinen angeregt. In den zellfreien Überständen findet nach definierter Inkubationszeit die Zytokinmessung statt.

Der Assay wurde, wie von De Groote et al. beschrieben, durchgeführt (De Groote et al., 1992). Es werden in sterile 5-ml-Polypropylen-Röhrchen je $850\ \mu\text{l}$ RPMI-Medium (1640) und je $50\ \mu\text{l}$ LPS (enthält $1\ \mu\text{g}$ LPS) bzw. LTA ($100\ \mu\text{g}$) als Stimulus gegeben. Danach wird in jedes Röhrchen $100\ \mu\text{l}$ Blut aus der Lithium-Heparin-Monovette gegeben. Zusätzlich werden Negativkontrollen ohne Stimulantien angefertigt. Die Herstellung der Ansätze wird steril unter der Werkbank durchgeführt. Nach sorgfältiger Vermischung werden dann die Ansätze bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Für die Inkubation wählten wir einen Zeitraum von 24 Stunden, was sich bei vorrausgehenden Studien unserer Arbeitsgruppe für die Zytokinmessung als optimal gezeigt hat (Dalhoff et al., 1998). Anschließend werden die zellfreien Überstände abpipettiert, in sterile Eppendorf-Küvetten gegeben und bis zur Zytokinmessung bei -80° eingefroren.

2.2.6.2. Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Der Enzymimmunoassay ist eine quantitative Methode, bei dem entweder das Antigen oder der Antikörper enzymatisch markiert und durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht wird.

Zum Zytokinnachweis im Vollblutüberstand wird ein sogenanntes Sandwich-ELISA verwendet. Hierbei ist der Boden einer Mikrotiterplatte im Überschuss mit spezifischen Antikörpern gegen das gesuchte Antigen, in unserem Fall des Zytokins, fest beschichtet. Standardverdünnungen mit bekannten Zytokinkonzentrationen und die zu messenden Proben werden auf die Testplatte aufgetragen. Die in den Proben/ Standards enthaltenen Zytokine binden während der ersten Inkubationszeit an die spezifischen Antikörper. Ungebundenes Material wird danach durch einen Waschvorgang entfernt. Während einer zweiten Inkubationszeit bindet ein monoklonaler Antikörper an das gebundene Antigen (Zytokin) und wiederum entfernt ein Waschvorgang das unverbrauchte Material. Im nächsten Reaktionsschritt bindet nun der im Überschuss hinzugefügte enzymmarkierte Sekundärantikörper an den Antigen-Antikörper-Komplex in der Mikrotiterplatte. Nach der dritten Inkubationszeit und dem anschließenden Waschvorgang wird die Substratlösung zugegeben. Durch das Enzym wird das Substrat in einer Farbreaktion umgewandelt. Diese Farbreaktion wird durch Zugabe einer Säure beendet.

Bei 450 nm wird daraufhin die Absorption im Photometer gemessen. Die Intensität der Farbentwicklung ist dabei direkt proportional zur Antigenkonzentration in der Probe.

Alle Proben und Standards wurden in Doppelbestimmung analysiert. Über die photometrische Bestimmung der Proben kann, durch Umrechnung und Vergleich mit der erstellten Standardkurve, die Zytokinkonzentration in den eingesetzten Proben ermittelt werden.

Wir haben zur Bestimmung der IL-10-Konzentration im Vollblut-Überstand einen kommerziellen ELISA-Kit für humanes IL-10 der Firma BioSource International verwendet.

2.2.7. Analyse des IL-10 -1082-Promotorgenpolymorphismus.

Die Analyse des IL-10 -1082-Promotorgenpolymorphismus wurde im Forschungszentrum Borstel durchgeführt. Verwendet wurde aus venösem EDTA-Blut isolierte DNA. Die DNA wurde mit einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Mittels einer Gelelektrophorese wurden die einzelnen PCR-Produkte sichtbar gemacht.

Die Methode zur Analyse des IL-10 -1082-Polymorphismus wurde von Perrey und Mitarbeiter beschrieben (Perrey et al., 1999).

2.2.7.1. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion erlaubt es, definierte DNA-Abschnitte zu vermehren. Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung der PCR ist es, dass die Sequenz des zu amplifizierenden DNA-Fragments entweder ganz oder in seinen Randbereichen bekannt ist.

Für die PCR benötigt man sogenannte Primer (DNA-Oligonukleotide), die mit den Randbereichen des zu amplifizierenden DNA-Fragments komplementär sind und so mit diesen hybridisieren können. Diese kurzen DNA-Abschnitte fungieren als Startmoleküle für die DNA-Polymerase, einem Enzym, welches die Synthese neuer komplementärer DNA Moleküle ausgehend vom Primer katalysiert. In den PCR-Ansatz müssen neben der zu amplifizierenden DNA, den Primern und der DNA-Polymerase noch ausreichende Mengen der 4-Desoxyribonucleotid-triphosphate [dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)] in einem geeigneten Puffer zugesetzt werden.

Die PCR setzt sich dabei prinzipiell aus drei Reaktionsschritten zusammen:

1. DNA-Denaturierung (95° C): Der DNA-Doppelstrang wird durch thermische Denaturierung in seine zwei Einzelstränge aufgeschmolzen. Ein hoher Überschuss an komplementären Primern verhindert beim Abkühlen die Wiedervereinigung der hochmolekularen DNA.

2. Annealing, Primer-Anlagerung: Bei Temperaturen unterhalb der Schmelztemperatur lagern sich komplementäre DNA-Einzelstränge wieder aneinander. Hierbei hybridisieren die im Überschuss vorhandenen Primer an ihren komplementären DNA-Abschnitten. In Abhängigkeit vom GC (Guanosin Cytosin) der hybridisierenden DNA-Moleküle (Primer und Matrize) variiert die sogenannte Annealing-Temperatur: Je höher der GC-Gehalt, desto höher die Annealing-Temperatur.

3. DNA-Synthese: Die DNA-Polymerase erkennt den Komplex bestehend aus der DNA und dem komplementären Primer. Die DNA Polymerase verlängert vom freien 3'-Ende des Primers diesen komplementär zum entsprechenden DNA-Molekül.

Dazu braucht die DNA-Polymerase als Substrat die oben genannten DNA-Bausteine (Desoxynucleotid-Triphosphate, dNTP's) sowie das freie 3'-OH-Ende des kurzen doppelsträngigen Nucleinsäureabschnitts.

Die in der PCR benutzte Polymerase muss hitzeresistent sein. Es wird eine Polymerase verwendet, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird. Diese ist hitzeresistent bis 96° C, während ihr Temperaturoptimum bei 72°C liegt, so dass diese Temperatur für den Synthese-Schritt gewählt wird.

Dieser Reaktionszyklus von Denaturierung, Annealing und DNA-Synthese wird mehrmals wiederholt, so dass schließlich viele Kopien eines DNA-Fragments definierter Länge, entsprechend der Sequenz, die sich zwischen den Primern befindet, entstehen.

Anschließend werden die DNA-Fragmente auf Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt: Kleine Fragmente werden im elektrischen Feld weiter in das Gel getragen als große Fragmente.

2.2.7.2. IL-10-ARMS-PCR zur Identifizierung des IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus

Die Genotypisierung des IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus wurde mit einer hochspezifischen „Amplification Refractory Mutation System“ (ARMS) PCR durchgeführt. Dieses Protokoll basiert auf einer PCR, welche zwei Primer benutzt, die an jeweils ihrem 3'-Ende die komplementäre Base zum jeweiligen Polymorphismus in der Promotorsequenz des IL-10-Gens trägt:

Bei dieser Methode wird ein spezifischer „Sense-Primer“, der komplementär zum IL-10 Allel-A (Primer A), bzw. ein „Sense-Primer“, der komplementär zum IL-10-Allel G (Primer G) ist, in Kombination mit einem Antisense-Primer verwendet. Für jede zu untersuchende DNA-Probe müssen entsprechend zwei parallele Ansätze hergestellt werden, ein Ansatz mit dem Sense-Primer A und ein Ansatz mit dem Sense-Primer G. Die Anwesenheit eines PCR-Produktes definierter Länge in der Gelelektrophorese zeigt schließlich an, dass die komplementären Basen A oder G in der Promotorregion des IL-10-Gens des Patienten vorhanden sind (siehe Abb. 2). Zusätzlich kommt in jeden Reaktionsansatz als interne Kontrolle ein Primer-Mix (Sense/ Antisense), der eine Sequenz des „Human Growth Hormone“ amplifiziert. Diese interne Kontrolle dient zum Nachweis für eine erfolgreiche PCR Amplifikation.

Die Durchführung im Einzelnen sah wie folgt aus:

1. DNA Isolation:

Wir haben aus EDTA-Vollblut mittels eines kommerziellen Kits (Puregen®, Gentra Systems) DNA isoliert. Dabei wurden zunächst 300 µl EDTA-Vollblut mit 900 µl „Red Blood Cell (RBC) Lysis Solution“ in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann in der Labor-Kühl-Zentrifuge mit 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde, bis auf einen Rest von 25 µl, über dem Pellet abpipettiert. Die Zellen im restlichen Volumen wurden vermischt und durch Zugabe von 300

µl Cell Lysis Solution lysiert. Zum Zell-Lysat wurden 1,5 µl RNA-se Lösung gegeben. Das Lysat wurde für 15 – 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden 100 µl einer Proteinpräzipitationslösung dazugegeben. Dieser Ansatz wurde nach Durchmischen für 3 Minuten bei 13000 U/min. zentrifugiert. Zu dem Überstand, der die DNA enthielt, wurden 300 µl Isopropanol gegeben und 1 Minute bei 13000 U/Minuten nochmals zentrifugiert. Die DNA bildete nun ein sichtbares kleines Pellet. Der Überstand wurde verworfen. Zur DNA wurden 300 µl 70%-Ethanol hinzugegeben. Es wurde erneut 1 Minute bei 13000 U/min zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bei geöffnetem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde die Probe getrocknet. Schließlich wurden 100 µl DNA-Hydrations-Lösung hinzugegeben, und die Probe 60 Minuten bei 65 °C unter Schütteln im Wärmeblock inkubiert. Die gelöste DNA wurde bei –80 °C gelagert.

2. Polymerasekettenreaktion:

Für jede Probe wurden zwei parallele Reaktionsansätze hergestellt. Die isolierte DNA wurde zu 50 µl Reaktions-Lösung gegeben. Die Reaktions-Lösung enthielt 5 µM des spezifischen Primer-Mixes, der aus dem IL-10 (-1082) Antisense-Primer und jeweils einem der zwei allelspezifischen Primer bestand, entweder dem IL-10 (-1082) Primer A oder dem IL-10 (-1082) Primer G. Außerdem enthielt die Reaktions-Lösung 1 µM des internen Kontroll-Primer-Mixes, je 200 µM desoxy-Nukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U Taq-Polymerase, den PCR-Puffer (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei 24°C) und 1,5 mM Mg Cl₂.

Das PCR-Protokoll beinhaltete: 10 Zyklen mit 1 Minute bei 95 °C, 50 Sekunden bei 65 °C und 50 Sekunden bei 72 °C, gefolgt von 20 Zyklen mit 1 Minute bei 95 °C, 50 Sekunden bei 59 °C und 50 Sekunden bei 72 °C.

Die 258 Basenpaare (IL-10) und 429 Basenpaare (Interne Kontrolle) umfassenden PCR-Produkte wurden mit einer Gelelektrophorese in einem 2%-Agarosegel, welches Ethidiumbromid enthielt, nachgewiesen.

Hierfür wurde ein 2%-Gel mit Agarose gegossen. In die Probenschlitze des Agarosegels wurde 5 µl des PCR-Produktes und 1 µl DNA-Farbstoff (Herstellung von 100 ml aus 25 g Bromphenol Blau, 25 g Xylene Cyanol in 70 ml Wasser mit 30 ml Glycerol) gefüllt. Die mit 0,5-fach Tris-Borsäure-EDTA-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer wurde an eine Stromquelle über ca. eine Stunde mit einer Stromspannung von 90 V und einer Stromstärke von 0,87 A angeschlossen. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe einer UV-Lichtquelle mit der Wellenlänge 312 nm sichtbar gemacht und abfotografiert.

Abbildung 3 zeigt das abfotografierte Ergebnis einer IL-10 –1082 ARMS PCR auf einem Agarosegel unter UV-Licht.

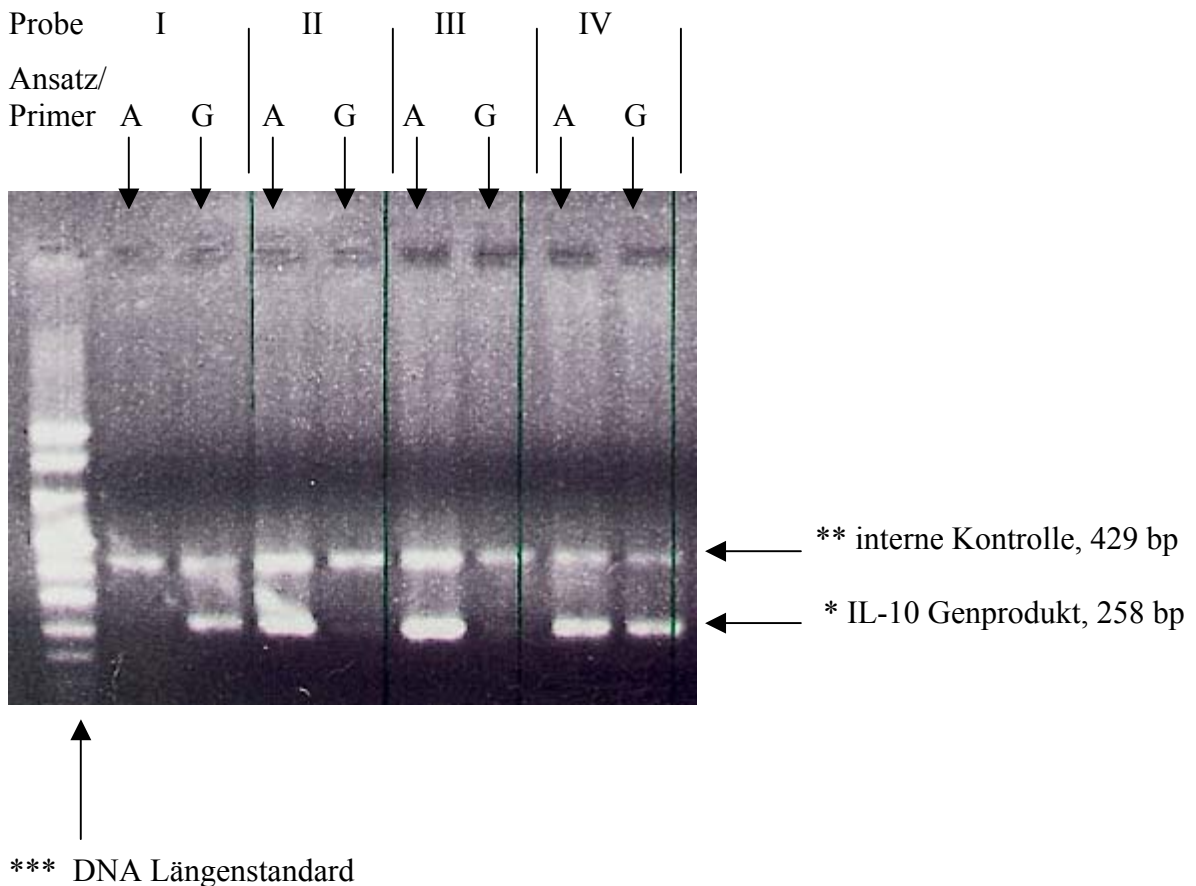


Abbildung 3: Ergebnis einer IL-10 ARMS-PCR auf einem Agarosegel unter UV-Licht.

Es sind vier Proben (I – IV) mit je zwei Ansätzen (A / G) dargestellt. In Ansatz A ist Primer A hinzugegeben, in Ansatz G Primer G. Der Nachweis eines IL-10-Genproduktes (*) in Ansatz A bzw. G zeigt an, dass in der jeweiligen Probe das A-bzw. G-Allel vorhanden ist. In jedem Ansatz ist zusätzlich die interne Kontrolle (**) sichtbar. Dies stellt sicher, dass die PCR-Amplifikation erfolgreich war. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch den Einsatz eines DNA-Längenstandards (Standard VIII, Roche; 0,019-1,11 kbp), der sich am linken Rand der Elektrophorese darstellt (***), überprüft.

Die PCR-Größe für das IL-10-Genprodukt ist 258 bp, für die interne Kontrolle 429 bp.

Probe I zeigt einen IL-10-1082 GG homozygoten Genotyp, Probe II und III einen AA homozygoten Genotyp und Probe IV einen AG heterozygoten Genotyp.

2.3. Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen wurden mit Statistica 5.1 (StatSoft Inc. 1997, Tulsa USA) und StatXact 5.0 (Cytel Software Corporation, Cambridge, MA) durchgeführt. Der Fisher exact Test (two tailed) wurde zur Prüfung der Assoziation zwischen Entwicklung eines septischen Schocks und des IL-10-Genotyps GG vs. AA/AG benutzt. Mittels des Cochran-Armitage-Trend-Test wurde das Chancenverhältnisse für den IL-GG-Genotyp in Assoziation zum Schweregrad der Sepsis geprüft. Aufgrund einer Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium wurden Allelfrequenzen nicht für die statistische Analyse des septischen Schocks verwendet. Den Man-Whitney-U-Test (U Test) verwendeten wir zur Berechnung der unabhängigen nicht-parametrischen Stichproben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben, p-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. In der statistischen Auswertung wurden wir vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der medizinischen Universität Lübeck beraten.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische und demographische Daten der Patienten

Wir haben 69 Patienten mit kulturell nachgewiesener Pneumokokkeninfektion untersucht, von denen 37 Patienten männlich und 32 weiblich waren. Die Patienten hatten ein Durchschnittsalter von 65 Jahren mit einer Standardabweichung von $\pm 17,8$ Jahren. Wir beobachteten bei 61 Patienten eine Pneumonie, 5 Patienten hatten eine Meningitis und 3 Patienten hatten eine Pneumonie und eine Meningitis. Streptococcus pneumoniae konnte bei 39 Patienten im Blut, bei 3 Patienten im Liquor, bei 3 Patienten in Blut und Liquor, bei 8 Patienten in der Bronchoalveolarlavage (BAL), bei 2 Patienten in BAL und Blutkultur, bei 11 Patienten im Trachealsekret oder Sputum sowie bei 3 Patienten im Pleurapunktat nachgewiesen werden. Innerhalb der ersten 24 Stunden hatten 18 Patienten keine Sepsis, 28 Patient erfüllten die Kriterien für eine Sepsis, 10 Patienten zeigten eine schwere Sepsis, und 13 Patienten entwickelten einen septischen Schock. Nach 7 Tagen hatten noch 11 Patienten eine Sepsis, je ein Patient erfüllte die Kriterien für eine schwere Sepsis bzw. einen septischen Schock, während 2 Patienten zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben waren. Demographische Daten der Patienten, begleitende Grunderkrankungen bzw. Risikofaktoren, die zu einer Pneumokokkeninfektion prädisponieren, sowie aufgetretene Komplikationen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Wir beobachteten folgende Komplikationen: 36 Patienten hatten einen Pleuraerguß, 5 ein Pleuraempyem, eine Behandlung auf der Intensivstation war in 26 Fällen notwendig, eine akute Niereninsuffizienz mit Anstieg der Retentionswerte beobachteten wir bei 6 Patienten. 4 Patienten entwickelten ein dialysepflichtiges akutes Nierenversagen, 13 Patienten zeigten ein septisches Kreislaufversagen, so dass eine Behandlung mit Katecholaminen notwendig wurde, eine Beatmung war bei 14 Patienten notwendig und septische Metastasen traten bei 6 Patienten auf. Zu den septischen Komplikationen im engeren Sinne haben wir alle aufgeführten Komplikationen bis auf die Entwicklung eines Pleuraergusses gezählt. Insgesamt entwickelten 27 Patienten eine oder mehr als eine septische Komplikation.

Tabelle 3 zeigt den APS und APACHE II Score, das erreichte Leukozyten- und Fiebermaximum sowie die durchschnittliche Krankenhausaufenthaltsdauer unserer Patienten.

Tabelle 2: Demographische Daten, Pneumokokkennachweis, Diagnosen, Einteilung, Grunderkrankungen und beobachtete Komplikationen der Patienten; absolute Zahlen und relative Zahlen () bezogen auf das Patientenkollektiv.

Patienten insgesamt	69		
Alter (Mittelwert \pm Standardabweichung) in Jahren	65 \pm 17,8		
Geschlecht			
männlich	37 (0,54)		
weiblich	32 (0,46)		
Pneumokokkennachweis:			
Blutkultur	39 (0,57)		
Liquorkultur	3 (0,04)	Blut- + Liquorkultur	3 (0,04)
BAL	8 (0,12)	Blutkultur + BAL	2 (0,03)
Sputum/ Trachealsekret	11 (0,16)		
Pleurapunktat	3 (0,04)		
Diagnose:			
Pneumonie	61 (0,88)		
Meningitis	5 (0,07)		
Pneumonie + Meningitis	3 (0,04)		
Sepsis-Schweregrad:			
<u>Aufnahmetag:</u>		<u>7. Tag</u>	
Non-Sepsis	18 (0,26)	Non-Sepsis	54 (0,78)
Sepsis	28 (0,41)	Sepsis	11 (0,16)
schwere Sepsis	10 (0,14)	schwere Sepsis	1 (0,01)
septischer Schock	13 (0,19)	septischer Schock	1 (0,01)
		verstorben	2 (0,03)
Grunderkrankungen/ Risikofaktoren:			
Raucher	28 (0,41)	Alkoholabusus	8 (0,12)
KHK/ Herzinsuffizienz	19 (0,28)	Asthma/ COPD	21 (0,30)
chron. Niereninsuffizienz	9 (0,13)	Diabetes mellitus	14 (0,20)
neurologische Erkrankung ¹	13 (0,19)	Pflege-/ Altersheim	5 (0,07)
Komplikationen:			
Pleuraempyem	5 (0,07)	intensivmed. Behandlung	26 (0,38)
akute Niereninsuffizienz ²	6 (0,09)	septisches Kreislaufversagen ³	13 (0,19)
akutes Nierenversagen ⁴	4 (0,06)	Beatmung	14 (0,20)
Gerinnungsstörung	4 (0,05)	Tod	5 (0,07)
septische Metastasen	6 (0,09)	\geq 1 septische Komplikation	27 (0,39)

¹Dokumentierte fortgeschrittene Demenz, fortgeschrittene cerebrovaskuläre Insuffizienz, Anfallsleiden.

² Zeichen der akuten Niereninsuffizienz (Anstieg der Nierenretentionswerte), ohne das bereits ein dialysepflichtiges ANV besteht.

³ Septisches Kreislaufversagen mit Notwendigkeit einer Katecholamintherapie.

⁴ Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie.

Tabelle 3: *Klinische Daten der Patienten (Mittelwert \pm Standardabweichung).*

	Mittel	\pm Std.Abw.
APS	8.68	\pm 5.3
APACHE	14.62	\pm 7.01
CRP max. (mg/l)	323.06	\pm 164.82
Leukozyten max. (/ μ l)	21.11	\pm 9,21
Temperatur max. ($^{\circ}$ C)	38,75	\pm 1.12
Tage Krankenhaus	22.49	\pm 12.13

3.2. Klinische Daten in Bezug auf den Schweregrad der Sepsis und den klinischen Verlauf

Die klinischen Daten in Bezug auf den Sepsisschweregrad inklusive des APS und APACHE II Score der einzelnen Patientengruppen sind in Tabelle 4 dargestellt. Wie zu erwarten, wird deutlich, dass der Sepsis-Schweregrad mit dem APS und APACHE II Score korreliert. Mit zunehmendem Schweregrad der Sepsis steigt auch der APS und APACHE II Score (siehe Tabelle 4 und Abbildung 4). Vergleicht man die Patienten, die einen septischen Schock hatten, mit denen, die keinen septischen Schock entwickelten, so hatten Patienten mit einem septischen Schock einen signifikant erhöhten APS und APACHE II Score (Man Whitney U Test, $p < 0,01$; siehe Tabelle 5).

Wir beobachteten, dass die laborchemischen Entzündungsparameter (Leukozyten und das C-Reaktive-Protein) zwar bei Patienten mit einer schweren Sepsis und einem septischen Schock - verglichen zu nicht-septischen Patienten und Patienten mit einer einfachen Sepsis - erhöht sind. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Diese Parameter für sich allein betrachtet sind nicht geeignet, den Schweregrad der septischen Erkrankung abzuschätzen.

In Tabelle 6 sind septische Komplikationen, die bei den Patienten in den jeweiligen Gruppen auftraten, gezeigt. Schwer- und schwerstkranke Patienten wiesen häufiger septische Komplikationen auf: 19 von 23 Patienten (83%) mit einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock entwickelten eine oder mehr als eine septische Komplikation, verglichen mit 8 von 28 Patienten (29%) mit einer einfachen Sepsis.

Insgesamt sind 5 Patienten an den Folgen der Infektion verstorben, davon 2 Patienten innerhalb der ersten 7 Tage. Alle verstorbenen Patienten zeigten ein schweres Krankheitsbild im Sinne einer schweren Sepsis bzw. eines septischen Schocks.

Tabelle 4: Alter und klinische Daten der einzelnen Patientengruppen (Mittelwert \pm Standardabweichung).

	Non Sepsis (n=18)		Sepsis (n=28)		schwere Sepsis (n=10)		septischer Schock (n=13)	
	Mittel	\pm Std.Abw.	Mittel	\pm Std.Abw.	Mittel	\pm Std.Abw.	Mittel	\pm Std.Abw.
Alter	66,44	18,77	58,39	18,25	71,60	19,12	71,15	9,27
APS	4,28	3,56	7,86	3,57	12,00	4,06	14,00	5,46
APACHE	10,50	5,02	12,50	5,65	17,80	5,81	22,46	5,90
CRP max. (mg/l)	319,28	189,01	298,21	126,36	368,00	114,21	347,23	232,05
Leuko. max. (tsd/nl)	15,15	5,40	22,62	9,13	22,64	6,62	24,94	11,95
Temp. max. °C	38,0	0,91	39,12	0,92	38,6	1,4	39,1	1,1
Tage stationäre Behandlung	21,9	13,4	18,8	9,1	28,5	13,9	26,6	13,0

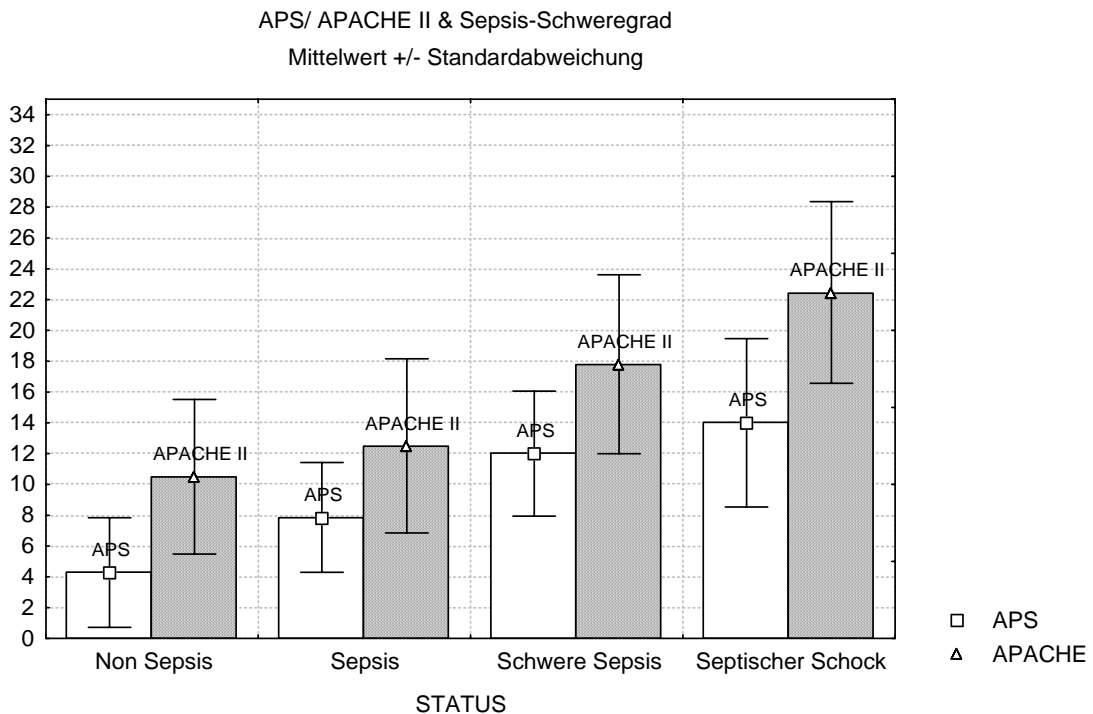


Abbildung 4: APS / APACHE II Score und der Sepsis-Schweregrad der Patientengruppen. Der APS und APACHE II Score steigen mit dem Sepsis-Schweregrad an.

Tabelle 5: Vergleich der klinischen Daten von Patienten mit und ohne einen septischen Schock (Mittelwert \pm Standardabweichung). Signifikanzprüfung mittels Man Whitney U Test.

	kein septischer Schock n = 56		septischer Schock n = 13		p (U Test)
	Mittel	\pm Std.Abw.	Mittel	\pm Std.Abw.	
Alter	63,34	18,98	71,15	9,27	> 0,05
APS	7,45	4,47	14,00	5,46	< 0,01
APACHE	12,80	5,94	22,46	5,90	< 0,01
CRP max. (mg/l)	317,4	147,20	347,23	232,05	> 0,05
Leukozyten max. (/ μ l)	20,2	8,34	24,94	11,95	> 0,05
Temperatur max. ($^{\circ}$ C)	38,67	1,13	39,1	1,1	> 0,05
Tage Krankenhaus	21,53	11,83	26,6	13,0	> 0,05

Tabelle 6: Komplikationen in den einzelnen Patientengruppen. Absolute Anzahl und relativer Anteil () bezogen auf die jeweilige Patientengruppe.

Komplikationen	Non Sepsis (n=18)	Sepsis (n=28)	schwere Sepsis (n=10)	septischer Schock (n=13)
Empyem (n=5)	0	4 (0,14)	0	1 (0,08)
septische Metastasen (n=6)	0	4 (0,14)	1 (0,10)	1 (0,08)
akute Niereninsuffizienz (n=6)	0	0	4 (0,40)	2 (0,15)
akutes Nierenversagen (n=4)	0	0	1 (0,10)	3 (0,23)
Gerinnungsstörung (n=4)	0	1 (0,04)	3 (0,30)	0
katecholaminpflichtiges septisches Kreislaufversagen (n=13)	0	0	0	13 (1,00)
Beatmung (n=14)	0	2 (0,07)	1 (0,10)	11 (0,85)
\geq 1 septische Komplikation (n=27)	0	8 (0,29)	6 (0,60)	13 (1,00)
Tod (n=5)	0	0	2 (0,20)	3 (0,23)

3.3. Genotypenhäufigkeit des IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus der Patienten verglichen mit einer Kontrollgruppe

Bei unseren Patienten fanden wir für den IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus folgende Verteilung: 25 (36,2%) der Patienten waren homozygot A, 28 (40,5%) waren heterozygot AG und 16 (23,2%) Patienten waren homozygot G an Position -1082 des IL-10-Gens. Die Genotypenverteilung unserer Patienten und Kontrollen sind in Tabelle 7 wiedergegeben. Wir haben keinen Unterschied in der Verteilung des Genotyps bei unseren Patienten im Vergleich zu den Probanden gesehen. Auch konnten wir keinen Unterschied in der Genotypverteilung zwischen unseren Daten und bereits veröffentlichten Daten finden (Epplen et al., 1997; Reynard et al., 2000). Epplen und Mitarbeiter haben in einer Studie 400 gesunde nordeuropäische Kaukasier (Deutschland) bezüglich ihres IL-10-Genotyps untersucht und dabei eine ähnliche Genotypenverteilung (AA 115 (30%), AG 194 (49%), GG 91 (23%)) gefunden.

Tabelle 7: Absolute und relative Genotypenverteilung der Patienten, verglichen mit der Kontrollgruppe.

	Genotyp					
	AA		AG		GG	
	n	%	n	%	n	%
Patienten	25	36,2	28	40,6	16	23,2
Kontrollgruppe	20	40,0	17	34,0	13	26,0

3.4. Einfluß des IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus auf den Schweregrad der Sepsis

Der IL-10 –1082-Genotyp homozygot G ist signifikant mit dem Schweregrad der Sepsis bei invasiven Pneumokokkeninfektionen assoziiert:

In Tabelle 8 ist die Verteilung der Genotypen innerhalb der einzelnen Patientengruppen aufgeführt. Abbildung 5 stellt die relativen Genotypenverteilungen der einzelnen Patientengruppen gegenüber. Der Anteil der Patienten, die homozygot GG sind, nimmt mit dem Schweregrad der Sepsis kontinuierlich zu. Wir beobachteten, dass 54% der Patienten, die einen septischen Schock entwickelten homozygot für das Allel G sind. Vergleicht man im Vierfeldertest (dargestellt in Tabelle 9) die Anzahl der Patienten, die homozygot G, mit denen, die nicht homozygot G sind - bezogen auf die Entwicklung eines septischen Schocks - so zeigt sich, dass signifikant mehr Patienten mit einem GG-Genotyp einen septischen Schock entwickeln. Patienten, die homozygot für das IL-10 –1082 Allel G sind, haben somit ein erhöhtes Risiko, einen septischen Schock zu entwickeln. Das Chancenverhältniss (Odds Ratio) bei Patienten mit einem septischen Schock für den IL-10-GG-Genotyp ist signifikant erhöht (Fisher exact: Odds Ratio 6,1; Konfidenzintervall 95%: 1,4-27,2; p=0,0078).

Im Cochran Armitage Trend Test sieht man im Weiteren ein ansteigendes Chancenverhältniss für den IL-10-GG-Genotyp in Assoziation zum Schweregrad der Sepsis (p=0,009; sieheTabelle 9).

Tabelle 8: *Genotypenverteilung des IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus in absoluten Zahlen und relativ () bezogen auf die Patientengruppe.*

Patientengruppe	Genotyp		
	AA	AG	GG
Non-Sepsis	8 (0,44)	8 (0,44)	2 (0,11)
Sepsis	10 (0,36)	13 (0,46)	5 (0,18)
Schwere Sepsis	3 (0,30)	5 (0,50)	2 (0,20)
Septischer Schock	4 (0,31)	2 (0,15)	7 (0,54)

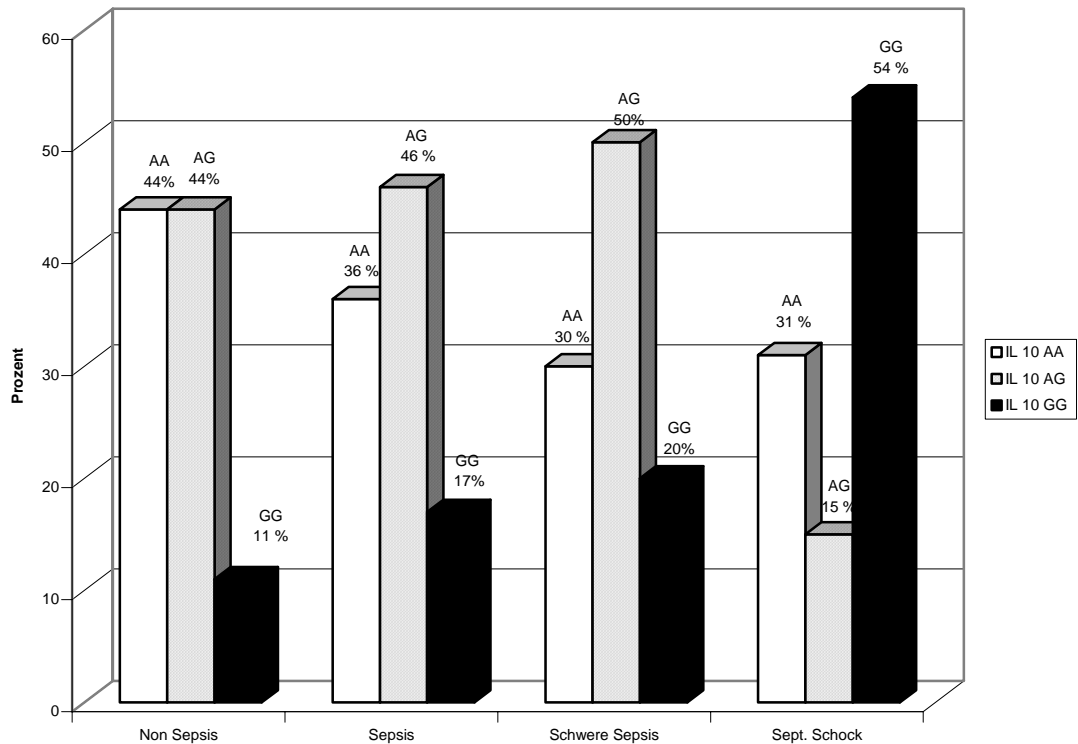


Abbildung 5: Darstellung der prozentualen Genotypenverteilung bei Patienten mit invasiven Pneumokokkeninfektionen. Der Anteil der Patienten, die homozygot GG sind, nimmt mit dem Schweregrad der Sepsis kontinuierlich zu.

Tabelle 9: Fisher exact Test: Absolute und relative () Genotypenverteilung bei Patienten mit septischem und ohne Schock. Patienten mit einem GG-Genotyp entwickeln signifikant häufiger einen septischen Schock. Chancenverhältniss, Odds Ratio [95% Konfidenzintervall].

	AA/AG	GG	OR [95% CI]	Fisher exact p
kein septischer Schock (n=56)	47 (0,84)	9 (0,16)		
Septischer Schock (n=13)	6 (0,46)	7 (0,54)	6,1 [1,4-27,2]	0,0078

Tabelle 10: *Cochrane Armitage trend test: Chancenverhältniss (Odds Ratio) für den IL-10 Genotyp in Assoziation zum Schweregrad der Sepsis. Es zeigt sich eine ansteigende Odds Ratio für den IL-10-GG-Genotyp in Assoziation zum Schweregrad der Sepsis. Odds Ratio [95% Konfidenzintervall].*

	AA/ AG		GG		OR	[95% CI]	p
	n	(%)	n	(%)			
Non Sepsis	16	(30,19)	2	(12,50)			
Sepsis	23	(43,40)	5	(31,25)	2.065	[1,156-3,870]	
Schwere Sepsis	8	(15,09)	2	(12,50)	4.264	[1,337-14,977]	
Septischer Schock	6	(11,32)	7	(43,75)	8.805	[1,545-57,962]	0,009

3.5. Einfluß des IL-10 -1082-Promotorgenpolymorphismus auf den klinischen Verlauf

In Tabelle 11 sind der APS und APACHE II Score, die Mortalität und die Komplikationshäufigkeit für den IL-10-GG-Genotyp dem AA- und AG-Genotyp gegenübergestellt. Bei der Betrachtung der Komplikationen haben wir Patienten, die eine oder mehr als eine septische Komplikation aufwiesen, solchen, die keine septische Komplikation entwickelten, gegenübergestellt.

Wir stellten folgendes fest: Patienten, die homozygot für das IL-10-Allel G in Position -1082 sind, wiesen einen signifikant höhern APACHE II Score auf ($p=0,045$), entwickelten mehr septische Komplikationen ($p=0,041$) und zeigten einen Trend hin zu einer höheren Mortalität ($p=0,078$), im Vergleich zu den Patienten, die homozygot für das Allel A bzw. heterozygot AG waren.

Tabelle 11: APACHE II Score, septische Komplikationen und Mortalität im Vergleich für den IL-10-Genotypen. PS und APACHE II als Mittelwert \pm Standardabweichung. Septische Komplikationen und Mortalität in absoluten Zahlen und prozentual bezogen auf den Genotyp.

	AA/AG	GG	U Test p
APS (Mittel \pm Std. Abw.)	8,1 \pm 5,4	10,5 \pm 4,9	0,142
APACHE II (Mittel \pm Std. Abw.)	13,8 \pm 7,3	17,3 \pm 5,1	0,045
			χ^2 Test (fisher exact p, two tailed)
≥ 1 septische Komplikation	17 (32%)	10 (63%)	0,041
Mortalität	2 (4%)	3 (19%)	0,078

3.6. Einfluß weiterer Faktoren auf den Schweregrad der Sepsis

Wir untersuchten, inwieweit weitere von uns beobachtete Faktoren den klinischen Verlauf einer Pneumokokkeninfektion beeinflussen. Findet sich eine Assoziation von bekannten Risikofaktoren für Pneumokokkeninfektionen und der Entwicklung eines septischen Schocks?

In Tabelle 12 sind die einzelnen Risikofaktoren, wie sie innerhalb der Patientengruppen vorlagen, aufgelistet. Wir beobachteten, dass 88% aller Patienten einen oder mehr als einen typischen Risikofaktor für die Entwicklung einer Pneumokokkeninfektion und 43% mehr als zwei Risikofaktoren aufwiesen. Dabei waren 48% unserer Patienten mit einer invasiven Pneumokokkeninfektion älter als 70 Jahre, 41% der Patienten waren Raucher und 34% wiesen in ihrer Anamnese eine chronische obstruktive Lungenerkrankung auf.

Patienten, die einen septischen Schock entwickelten, hatten in 9 von 13 Fällen (69%) mehr als zwei Risikofaktoren in ihrer Anamnese, verglichen zu 21 von 56 Patienten (38%) ohne septischen Schock (χ^2 Test, Fisher exact p two tailed: 0,061). Die Betrachtung der einzelnen Risikofaktoren bezogen auf die Entwicklung eines septischen Schocks erbrachte, dass Patienten mit einer KHK oder Herzinsuffizienz häufiger einen septischen Schock entwickelten. 54% der Patienten mit einem septischen Schock hatten vorbestehend eine KHK

oder Herzinsuffizienz, verglichen zu 21 % der Patienten ohne septischen Schock (χ^2 Test, Fisher exact p two tailed: 0,035). Ansonsten haben wir für einzelne Risikofaktoren keine signifikant erhöhte Prävalenz für die Entstehung eines septischen Schocks gefunden. Wir fanden keine Assoziation zwischen dem IL-10-Genotyp und den einzelnen Risikofaktoren.

Tabelle 12: Risikofaktoren innerhalb der vier Patientengruppen (Sepsisschweregrade). Absolute Zahl und relative () bezogen auf jeweilige Patientengruppe.

<u>Risikofaktoren</u>	Patienten gesamt	Non- Sepsis	Sepsis	schwere Sepsis	septischer Schock
	n = 69	n = 18	n = 28	n = 10	n = 13
Alter > 70 Jahre	33 (0,48)	10 (0,56)	11 (0,39)	5 (0,50)	7 (0,54)
Raucher	28 (0,41)	6 (0,33)	13 (0,46)	1 (0,10)	8 (0,61)
Alkohol-Abusus	8 (0,12)	1 (0,06)	5 (0,18)	0	2 (0,13)
COPD	21 (0,34)	6 (0,33)	7 (0,25)	2 (0,20)	6 (0,29)
Diabetes mellitus	14 (0,20)	0	7 (0,25)	3 (0,30)	4 (0,31)
KHK, Herzinsuffizienz	19 (0,28)	5 (0,28)	6 (0,21)	1 (0,10)	7 (0,54)
Niereninsuffizienz	9 (0,13)	2 (0,11)	5 (0,18)	0	2 (0,15)
neurolog.-Erkr.	13 (0,19)	5 (0,28)	3 (0,11)	2 (0,20)	3 (0,23)
Pflege-/ Altenheim	5 (0,07)	2 (0,11)	1 (0,04)	2 (0,20)	0
≥ 1 Risikofaktor	61 (0,88)	17 (0,94)	25 (0,8)	7 (0,70)	12 (0,92)
≥ 2 Risikofaktoren	30 (0,43)	8 (0,44)	11 (0,39)	2 (0,20)	9 (0,69)

3.7. Einfluß des IL-10 -1082-Promotorgenpolymorphismus auf die In-vitro-Zytokinproduktion.

Wie in der Einleitung berichtet, konnten Turner und Mitarbeiter für den Interleukin-GG-Genotyp eine vermehrte In-vitro-IL-10-Produktion von Blutmonozyten nach Stimulation mit Con A nachweisen (Turner et al., 1997). Wir konnten bei 58 von 69 unserer Patienten am Ende ihres stationären Aufenthaltes Blut für die Stimulation abnehmen. Die Ergebnisse nach Stimulation von Vollblut mit LPS für die Patienten sind in Tabelle 13 und Abbildung 6 gezeigt. Die Ergebnisse nach Stimulation mit LTA der Patienten sind in Tabelle 14 und Abbildung 7 dargestellt.

Die IL-10-in-vitro-Produktion nach Stimulation mit LPS bei Patienten mit einer Pneumokokkeninfektion steigt vom IL-10-AA über den AG- zum GG-Genotyp an. Während Patienten mit einem IL-10 -1082 Genotyp AA im Mittel 369,4 ($\pm 343,0$) pg/ ml IL-10 produzierten, lagen die Werte der IL-10-Produktion bei Patienten mit einem GG-Genotyp bei 628,7 ($\pm 317,8$) pg/ ml (Man-Whitney U Test $p = 0,04$).

Es war keine Assoziation des IL-10-Genotyps mit der Zytokinfreisetzung nach Stimulation mit LTA zu beobachten.

Tabelle 13, Abbildung 6: *IL-10-In-vitro- Produktion aufgeteilt auf die drei IL-10-Genotypen nach Stimulation von Vollblut mit LPS, Werte in pg/ ml als Mittelwert \pm Standardabweichung. Die IL-10-in-vitro-Produktion steigt vom IL-10-AA-Genotyp über den AG- bis zum GG- Genotyp an.*

	Mittel	\pm Std.Abw.
Alle Patienten	472,4	$\pm 334,4$
IL-10 Genotyp:		
AA	369,4	$\pm 343,0$
AG	493,7	$\pm 310,9$
GG	628,7	$\pm 317,8$
AA/AG	431,6	$\pm 329,8$
GG	628,7	$\pm 317,8$
U Test p		0,04

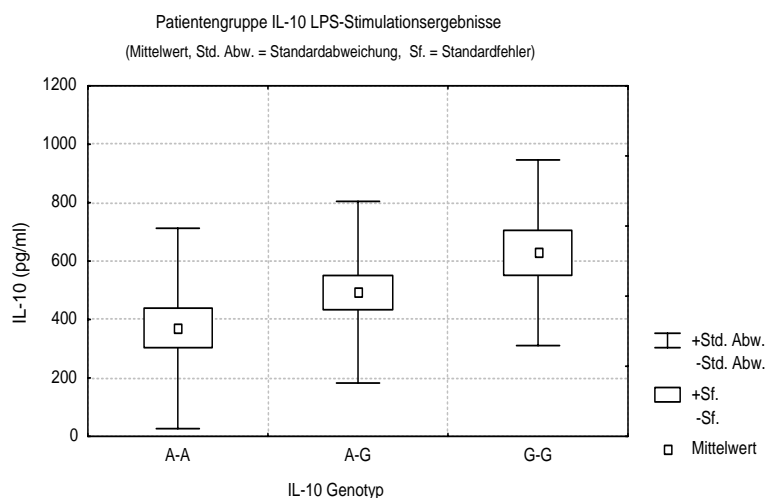
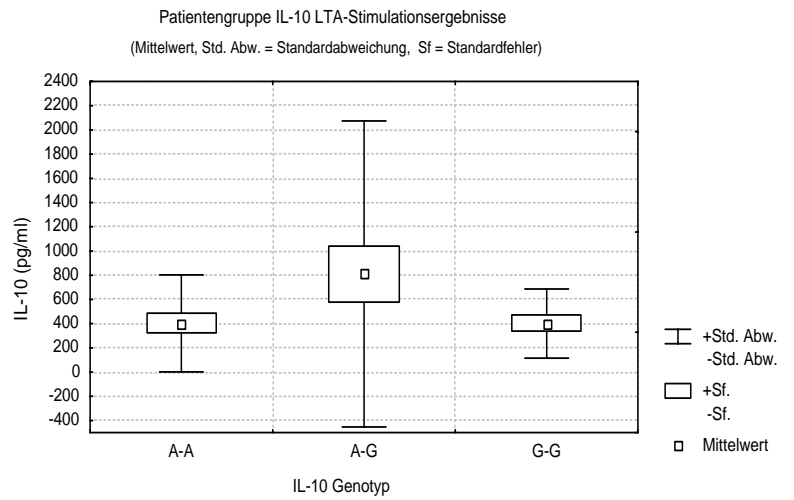


Tabelle 14, Abbildung 7: *IL-10- In-vitro-Produktion* aufgeteilt auf die drei *IL-10-Genotypen* nach *Stimulation von Vollblut mit LTA* , Werte in *pg/ml* als *Mittelwert ± Standardabweichung*.

	Mittel	±Std.Abw.
Alle Patienten	566,36	±862,76
IL-10 Genotyp		
AA	402,04	±400,49
AG	810,21	±1263,59
GG	400,22	±285,38



4. Diskussion

Unsere Studie untersuchte den Zusammenhang zwischen dem IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus und dem Schweregrad septischer Pneumokokkeninfektionen. Wir konnten nachweisen, dass der Schweregrad der Pneumokokkeninfektion, insbesondere der septische Schock, mit dem IL-10 –1082-Genotyp G assoziiert ist. Hiermit verbunden war ein erhöhter APACHE II Score, eine erhöhte Inzidenz von septischen Komplikationen und ein Trend hin zu einer erhöhten Mortalität. Gleichzeitig zeigte sich bei IL-10 G homozygoten Patienten eine gesteigerte LPS induzierte In-vitro-IL-10-Produktion. Pneumokokkenpatienten mit einer genetischen Prädisposition für eine starke IL-10-Antwort haben somit ein erhöhtes Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf.

Der genetische Anteil der IL-10-Antwort nach Antigenstimulation liegt zwischen 50% (Reuss et al., 2002) und 75% (Westendorp et al., 1997). Es wurden verschiedene Basenaustauschpolymorphismen (SNPs) in der 5'-Promotorregion des IL-10-Gens gefunden (Gibson et al., 2001). Wir haben den IL-10 –1082-Promotorgenpolymorphismus untersucht, da vorherige Studien den Einfluss des IL-10 –1082-G-Allels auf eine erhöhte IL-10-Produktion nachgewiesen haben. Stimulierte mononukleäre Zellen von Patienten, die homozygot für IL-10 G waren, haben eine höhere transkriptionelle Aktivität und sezernieren mehr IL-10 (Turner et al., 1997; Miura et al., 2002). Es zeigte sich bei uns, dass der IL-10-GG-Genotyp mit einer vermehrten IL-10 In-vitro-Produktion verbunden war. Unsere Daten demonstrierten eine erhöhte IL-10-Induzierbarkeit bei einem klinisch relevanten Patientenkollektiv und unterstreichen die Rolle des IL-10-GG-Genotyp für den IL10 „*high secretor*“ Phänotyp.

Die angeborene Immunantwort auf eine schwere bakterielle Infektion führt zu einem komplexen Zusammenspiel von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen. Dabei entsteht letztlich eine biphasische Immunantwort: Initial kommt es, getragen durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1, IL-6 und IL-8, zu einer hyperinflammatorischen Phase, auf die eine hypoinflammatorische Phase vermittelt durch die Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine, folgt (Bone et al., 1997; Volk et al., 2000). Diese späte anti-inflammatorische Reaktion, bei der IL-10 eine wichtige Rolle spielt, kann bei Patienten mit einer Sepsis zu einem Stadium der Immunsuppression führen. Charakteristisch für dieses Stadium ist eine Monozyten-Deaktivierung (Bone et al., 1997; Bone, 1996; Volk et al., 2000).

In der Literatur finden sich verschiedene Studien, die den Einfluß von IL-10 auf den Verlauf septischer Infektionen und auf die Pathogenese schwerer bakterieller Infektionen untersuchen. Tierexperimentelle Studien im Endotoxin- und Sepsismodell demonstrierten, dass endogen produziertes oder exogen gegebenes IL-10 das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion vermindern und dadurch den klinischen Verlauf verbessern kann. Auf der anderen Seite konnten mehrere Studien nachweisen, dass bei bakteriellen Infektionen (unter anderem bei Pneumokokkenpneumonie (van der Poll et al., 1996)) eine hohe Konzentration von endogenem IL-10 oder die systemische Gabe von IL-10 die Immunabwehr des Wirtes durch eine verminderte antimikrobielle Aktivität und antimikrobielle Clearance schwächen und zu einer erhöhten Mortalität führt.

Interleukin-10 reduziert die inflammatorische Antwort bei einem Endotoxin-Schock:

In Tiermodellen von schweren systemischen Infektionen oder Inflammationsreaktionen, hervorgerufen durch i.v. Gabe hoher Dosen von Bakterien oder bakterieller Produkte wie Endotoxin, beobachtete man eine exzessive Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, die signifikant mit einem schweren klinischen Verlauf und einer hohen Mortalität assoziiert war. Hierbei zeigte sich, dass eine Neutralisation dieser pro-inflammatorischen Zytokine wie TNF oder IL-1 in murinen Endotoxinmodellen zu einer Reduzierung der Mortalität führte (Beutler et al., 1985; Alexander et al., 1991). Entsprechend konnte in solchen tierexperimentellen Endotoxinmodellen eine protektive Rolle von IL-10 nachgewiesen werden (van der Poll et al., 1997a). Die Neutralisation von endogen produziertem IL-10 in endotoxämischen Mäusen führte zu einer erhöhten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (u.a. TNF) und einer erhöhten Mortalität, während die Gabe von exogenem IL-10 die Mäuse vor einem septischen Schock schützte (Marchant et al., 1994a; Standiford et al., 1995). In einem murinen Endotoxinmodell wurde Mäusen letale Dosen LPS verabreicht. Die Gabe von rekombinatem IL-10 kurz vor oder bis kurz nach der Endotoxinverabreichung konnte die Mortalität der Mäuse vermindern und korrelierte mit einer deutlichen Senkung der Endotoxin induzierten Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (Gerard et al., 1993; Howard et al., 1993). Entsprechend reagierten IL-10-gendefiziente Mäuse auf Endotoxininjektion mit einer erhöhten Konzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen und einer erhöhten Mortalität (Berg et al., 1995). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Studie von Latifi und Mitarbeitern. Sie konnten nachweisen, dass IL-10-defiziente Mäuse, bei denen künstlich eine septische Peritonitis hervorgerufen wurde, deutlich höhere TNF- α und IL-6-Serumkonzentrationen zeigten und signifikant früher verstarben. Durch die Gabe von rekombinantem IL-10 konnte hingegen das Überleben verbessert werden (Latifi et al., 2002). Mit diesen Studien konnte

gezeigt werden, das IL-10 eine wichtige autoregulatorische Rolle in der Sepsisentwicklung hat, indem es die pro-inflammatorischen Zytokine und so eine durch Endotoxin hervorgerufen überschießende pro-inflammatorische Reaktion kontrolliert. Basierend auf diesen Publikationen könnte man folgern, dass IL-10 als potenter Inhibitor systemisch pro-inflammatorischer Reaktionen bei septischen Infektionen protektiv wirkt.

Die Rolle von Interleukin-10 in der Pathogenese von bakteriellen Infektionen:

Im Gegensatz zu den aus Endotoxinmodellen gewonnenen Erkenntnissen stehen mehrere Arbeiten, die den Einfluss von IL-10 auf den klinischen Verlauf einer schweren bakteriellen Pneumonie oder anderen lokal beginnenden Infektionserkrankungen untersucht haben. Diese verdeutlichen die inhibitorische Wirkung von IL-10 für die bakteriellen Clearance bei Infektionen. So zeigte sich in einem tierexperimentellen Pneumokokkenpneumonie-Modell, dass die Gabe von rekombinantem IL-10 zu einer verminderten bakteriellen Clearance in der Lunge bei erhöhter Bakterienzahl im Blut und einer höheren Letalität führte. Die Behandlung mit Anti-IL-10 war hingegen mit einer verminderten Bakterienzahl in der Lunge und im Blut sowie einem verlängerten Überleben verbunden (van der Poll et al., 1996). In einem murinen Tiermodell mit einer letalen Pneumokokkenpneumonie konnte man nachweisen, dass die Gabe von IL-10 zu einer früheren Dissemination der Pneumokokken in den Blutstrom führte (Wang et al., 2000). Greenberger beobachtete in seinem murinen Modell einer Klebsiellen-Pneumonie, dass eine passive Immunisierung mit Anti-IL-10-Serum zu einer signifikanten Erhöhung pro-inflammatorischer Zytokine, einer Minderung der bakteriellen Last in Lunge und Blut und einer Senkung der Mortalität der infizierten Tiere führte. Bei Tieren, denen Anti-IL-10-Serum gegeben wurde, fanden sich in Isolaten der Lunge achtmal weniger koloniebildende Einheiten (CFU) von *K. pneumoniae*, im Blut sogar hundertmal weniger, als bei Tieren, denen kein Anti-IL-10 verabreicht wurde (Greenberger et al., 1995). Yang und Mitarbeiter stellten für *Chlamydia-trachomatis*-Pneumonien fest, dass Mäuse mit einer genetisch bedingten Anlage, vermehrt IL-10 zu produzieren, eine verminderte bakterielle Clearance in der Lunge und eine erhöhte Mortalität aufwiesen (Yang et al., 1996). Die Gabe von Anti-IL-10 verbesserte bei diesen Mäusen die bakterielle Clearance. Dazu demonstrierten Yang und Mitarbeiter, dass IL-10-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine deutlich bessere bakterielle Clearance hatten (Yang et al., 1999). In zwei weiteren Arbeiten wurde im murinen Tiermodell die Rolle von IL-10 in der Wirtsabwehr gegen *S. pneumoniae* nach einer Influenzainfektion untersucht. Van der Sluijs et al. konnten hierbei zeigen, dass bei Mäusen eine Influenzainfektion durch die Induktion der IL-10-Sekretion die Empfänglichkeit für Pneumokokkeninfektionen steigerte: Im Anschluß an eine

Influenzainfektion waren die untersuchten Mäuse sehr Anfällig für eine nachfolgende Pneumokokkeninfektion. Hierbei fand sich nach durchgemachter Influenzainfektion eine 50-fach höhere IL-10 Konzentration in der Lunge der Mäuse als bei entsprechenden Kontrollen. Eine Behandlung dieser Mäuse mit Anti-IL-10 Antikörpern eine Stunde vor der bakteriellen Kontamination mit *S. pneumoniae* ergab eine signifikante Reduktion der Letalität (van der Sluijs et al., 2006; van der Sluijs et al., 2004)

Diese Publikationen verdeutlichen, dass die IL-10-Produktion im Rahmen einer aktiven Infektion die Wirtsabwehr schwächen und eine mikrobielle Dissemination fördern kann.

In unserer Studie hatten Patienten mit einem IL-10-GG-Genotyp eine schlechtere Prognose bei invasiven Pneumokokkeninfektionen. Der Anteil der Patienten, die homozygot für das G-Allel sind, nimmt in unserer Studie mit dem Schweregrad der septischen Erkrankung zu.

Die anti-inflammatorische Beeinflussung des Immunsystems, hervorgerufen durch IL-10, führt zu einer verminderten bakteriellen Clearance (Zanotti et al., 2002). Die persistierende Freisetzung von IL-10 reduziert die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen und kann so zur Dysfunktion des Immunsystems bei einem septischen Schock führen (Bogdan und Nathan, 1993; Sfeir et al., 2001). Ein entscheidender Mechanismus einer solchen von einigen Autoren bezeichneten „Immunparalyse“ im Rahmen eines septischen Geschehen ist die durch IL-10 vermittelte anti-inflammatorische Beeinflussung der Immunabwehr durch die Inhibition der MHC-II-Expression auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen. In diesem Zusammenhang haben Fumeaux und Pugin aufgedeckt, dass die MHC-II-Expression auf Monozyten bei septisch erkrankten Patienten - verglichen mit gesunden Probanden - signifikant erniedrigt ist. Dabei korrelierte der Schweregrad des septischen Syndroms invers mit der Zahl der exprimierten MHC-II-Komplexe auf der Oberfläche der Monozyten. Weiter beobachteten sie, dass diese Herunterregulierung der MHC-II-Expression auf der Oberfläche von Monozyten im Rahmen einer bakteriellen Sepsis durch IL-10 vermittelt wird (Fumeaux und Pugin, 2002). Die verminderte Expression von MHC-II-Molekülen auf der Oberfläche von Zellen des Monozyten-/ Makrophagensystems führt zur beeinträchtigten Antigenpräsentation, wodurch eine zentrale Funktion in der Immunabwehr gestört wird. Dies trägt zu dem Verlust der T-Helfer-Zell-Antwort bei, welche sich in der verminderten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine widerspiegelt. Insgesamt resultiert eine Störung der antimikrobiellen Aktivität der Wirtsabwehr.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass IL-10 auf der einen Seite fähig ist eine potentiell schädliche, überschießende, pro-inflammatorische Reaktion, wie sie in Endotoxinmodellen erzeugt wird, aufzufangen und somit protektiv wirkt; andererseits kann eine IL-10

Überexpression eine Störung der Immunabwehr gegen bakterielle Pathogene hervorrufen und so den klinischen Verlauf schwerer Infektionserkrankungen negativ beeinflussen.

Eine erhöhte Morbidität und Mortalität bei Patienten mit hohen IL-10-Konzentrationen im Blut konnte bei verschiedenen bakteriellen Infektionen beobachtet werden: Der Schweregrad einer Pneumonie (Glynn et al., 1999), das Mortalitätsrisiko febriler Patienten, die zur Aufnahme ins Krankenhaus kamen (van Dissel et al., 1998), und die Mortalität bei Meningokokken Erkrankungen (Riordan et al., 1996; Lehmann et al., 1995) sind assoziiert mit hohen IL-10-Plasmaspiegeln.

Verschiedene Studien beobachteten hohe IL-10-Blutkonzentrationen bei Patienten mit einer schweren Sepsis und einem septischen Schock und korrelierten den Schweregrad der Erkrankung mit der IL-10-Konzentration im Blut der septischen Patienten (Derkx et al., 1995; Glynn et al., 1999; Westendorp et al., 1997; Gogos et al., 2000; Marchant et al., 1994b; Gomez-Jimenez et al., 1995; Lehmann et al., 1995; Friedman et al., 1997). Der ersten Arbeit hierzu von Marchant und Mitarbeitern 1994 (Marchant et al., 1994b) folgten mehrere weitere Studien, die die IL-10-Konzentration im Blut septischer Patienten untersuchten. Marchant et al. demonstrierten, dass die Blut-IL-10-Konzentration bei septischen Patienten sehr unterschiedlich ist: Sie variierte von 12 bis 2400 pg/ml. Bei Patienten mit einer Meningokokkensepsis fanden sich IL-10-Blutkonzentrationen von bis zu 20000 pg/ml (Lehmann et al., 1995). Außerdem beobachteten Marchant und Mitarbeiter, dass die IL-10-Konzentration bei Patienten mit einem septischen Schock signifikant höher waren als bei Patienten mit einer einfachen Sepsis. Darauf folgende Arbeiten waren in der Lage, die IL-10-Konzentration mit dem Schweregrad der septischen Erkrankung zu assoziieren. Friedmann et al. berichteten, dass die IL-10-Konzentration mit dem *Acute Physiologic and Chronic Health Evaluation Score* und mit der Inzidenz und der Schwere eines Multiorganversagens korreliert (Friedman et al., 1997). In ähnlicher Weise hatten Gomez-Jimenez et al. den Sepsis-Schweregrad (septischer Schock vs. nicht septischer Schock) und den *APACHE II Score* bei septischen Patienten mit der IL-10-Konzentration assoziiert (Gomez-Jimenez et al., 1995).

Epidemiologische Familienstudien haben gezeigt, dass die Mortalität bei Infektionserkrankungen genetisch prädisponiert ist (Sorensen et al., 1988). Die transkriptionelle Aktivität des IL-10-Gens ist genetisch determiniert (Westendorp et al., 1997; Reuss et al., 2002). Westendorp hat festgestellt, dass 75% der Schwankungen in der IL-10-Produktion genetisch bedingt sind. Er konnte des weiteren zeigen, dass Familien, die eine hohe IL-10-Sekretion aufweisen (IL-10 „high-secretor“), ein 20-fach erhöhtes Mortalitätsrisiko bei

invasiven Meningokokkenerkrankungen haben (Westendorp et al., 1997). In diesem Zusammenhang wurde in einer Genotypenanalysen eine Assoziation zwischen dem Schweregrad einer Meningokokkenerkrankung und dem kombinierten Genotyp des Fc γ -Rezeptors und IL-10 -1082-Promotorgenpolymorphismus nachgewiesen (van der Pol et al., 2001). Gallagher und Mitarbeiter haben den Einfluß von Promotorgenpolymorphismen bei IL-10, TNF- α und IL-6 auf den Schweregrad eines SIRS bei ambulant erworbenen Pneumonien untersucht. Für den IL-10 -1082-Promotorgenpolymorphismus konnten sie nachweisen, dass der IL-10-GG-Genotyp mit einem zunehmenden Schweregrad der Erkrankung assoziiert ist. Keine Assoziation fand sich für den ebenfalls untersuchten TNF- α -308G/A oder den IL-6 -174G/C Polymorphismus (Gallagher et al., 2003). Zudem fand eine aktuelle Studie eine Assoziation mit dem Schweregrad der pneumogenen Sepsis für andere von uns nicht untersuchten IL-10-Genpolymorphismen (-592c, +734G, +3367G)(Wattanathum et al., 2005).

Girndt et al. fanden bei Dialyse-Patienten einen Trend hin zu einer erhöhte Mortalität in Rahmen von Infektionserkrankungen für den IL-10 -1082-GG-Genotyp (Girndt et al., 2002). Wie bereits berichtet haben Turner und Mitarbeiter gezeigt, dass in vitro stimulierte Blutmonozyten von Probanden, die homozygot für das G-Allel in Position -1082 des IL-10 Gens waren, eine signifikant erhöhte IL-10-Produktion haben (Turner et al., 1997).

In unserer Studie zeigte sich, dass Patienten mit einer genetischen Disposition, viel IL-10 zu bilden, ein erhöhtes Risiko aufweisen, eine schwere Pneumokokkenerkrankung zu entwickeln. Wir fanden ein ansteigendes Chancenverhältniss für den IL-10-GG-Genotyp in Assoziation zum Sepsis Schweregrad. Der IL-10-GG-Genotyp war bei uns mit einem erhöhten APACHE II Score assoziiert ebenso wie mit einem vermehrten Auftreten von septischen Komplikationen und einem Trend hin zu einer höheren Mortalität. In der phänotypischen In-vitro-Vollblutstimulation konnten wir nachweisen, dass IL-10-G-homozygote Patienten mehr IL-10 bilden. Diese erhöhte IL-10-Induzierbarkeit ist möglicherweise der Grund für eine verminderte bakterielle Clearance und die darauf folgenden septischen Komplikationen.

In der Vollblutstimulation mit LTA konnten wir die Assoziation IL-10-Genotyp und Phänotyp nicht nachweisen. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich in der auch schon in anderen Arbeiten beobachteten hohen Varianz der Messergebnisse von ELISA-Untersuchungen zu suchen. Auch ist bekannt, dass die kommerzielle Herstellung von LTA oft ein Problem darstellt und sich in diesem häufig Verunreinigungen finden, was zu verfälschten Ergebnissen führen kann.

Die beobachtete schädliche Wirkung von IL-10 bei bakteriellen Infektionen, wie sie auch in anderen Studien beschrieben wurde, legt nahe, dass die Inhibition von IL-10 neue Therapieoptionen bei schwerwiegenden bakteriellen Infektionen bietet. Die Neutralisation von IL-10 in vivo führt zu einer erhöhten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, verhindert die durch IL-10 verursachte komplexe Beeinträchtigung der Funktion des Makrophagen/ Phagozyten-System, erhöht so die bakterielle Clearance und verbessert dadurch das Überleben (Greenberger et al., 1995; van der Poll et al., 1996; Yang et al., 1996; Yang et al., 1999). Eine 2002 erschiene Studie, die den Immunmodulator AS-101 in einem murinen Modell einer septischen Peritonitis eingesetzt hat, erbrachte diesbezüglich interessante Ergebnisse (Kalechman et al., 2002). Eine vorangegangene Studie konnte nachweisen, dass der Immunmodulator AS-101 [Ammonio-Trichloro(dioxoethylen 0,0')tellurat] unter anderem die IL-10-Expression auf transkriptioneller Ebene hemmt (Strassmann et al., 1997). Kalechman und Mitarbeiter untersuchten die Wirkung von AS-101 bei Mäusen mit einer schweren septischen Peritonitis, die durch eine Verschleppung von Darmbakterien ins Peritoneum mittels einer offen durchgeführten Punktion des Caecums ausgelöst wurde. Durch die Gabe von AS-101 zwölf Stunden nach erfolgter bakterieller Kontamination des Peritoneums erreichten sie eine signifikant verbesserte Überlebenschance der Mäuse mit einer schweren septischen Peritonitis. Die AS-101-Gabe war assoziiert mit einer Erniedrigung von IL-10 im Serum und in der Peritoneallavage sowie einer signifikant erhöhten Expression der MCH-II-Moleküle auf der Oberfläche von peritonealen Makrophagen und einer wiederhergestellten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Entsprechend konnte man in dieser Studie nachweisen, dass AS-101 über die Hemmung der IL-10-Expression die bakterielle Clearance verbessert. Unter der AS-101-Therapie fand sich eine signifikant verminderte Bakterienlast im Peritoneum und im Blut. Song et al. hatten bereits 1999 passend zu den Ergebnissen von Kalechmann nachgewiesen, dass im gleichen Modell einer septischen Peritonitis die Gabe von Anti-IL-10 zwölf Stunden nach der bakteriellen Kontamination ein verbessertes Überleben erreicht werden konnte (Song et al., 1999). Sowohl in der Studie von Kalechmann als auch von Song war für die genannten Beobachtungen entscheidend, dass die Gabe AS-101 bzw. Anti-IL-10 zeitlich verzögert nach der bakteriellen Kontamination des Peritoneums erfolgte. Kalechmann und Mitarbeiter beschrieben, dass eine zeitgleiche Gabe von AS-101 keinen Unterschied, eine Gabe vor dem Eingriff eine verminderte Überlebensrate erbrachte (Kalechman et al., 2002). Diese zeitliche Abhängigkeit erklärte Kalechmann damit, dass eine IL-10-Inhibition nur die beobachteten positiven Effekte hat, wenn sie zum Zeitpunkt der eigentlichen anti-

inflammatorischen/ immunsuppressiven Phase auf eine septische Infektion erfolgt. Letztere entsteht aber erst mit Verzögerung nach dem initialen Insult, ausgelöst durch die vorangehende pro-inflammatorische Phase. Mit dieser Begründung lassen sich auch vorangegangene Studien verstehen, die bei dem gleichen Modell einer septischen Peritonitis und im scheinbaren Widerspruch zu Kalechmann zeigten, dass eine vorhergehende IL-10-Gabe das Überleben der septischen Mäuse verbessert (Walley et al., 1996) bzw. Dass die Gabe von Anti-IL-10 vor dem Eingriff mit einer erhöhten Mortalität einhergeht (van der Poll et al., 1995).

Die zum Teil widersprüchlich erscheinenden Studienergebnisse der letzten Jahre bezogen auf den Einfluß von IL-10 in der Pathogenese der Sepsis bzw. schwerer bakterieller Infektionen spiegeln letztlich die vielfältigen biologischen Eigenschaften von IL-10 und das komplexe Zusammenspiel der Zytokine von *SIRS* und *CARS* in der Sepsis wieder. So entscheidet im Falle einer therapeutischen Intervention mit Anti-IL-10 bei einer bakteriellen Sepsis der Zeitpunkt der Gabe darüber, ob sich der klinische Verlauf verbessert oder verschlechtert. Trotz dieses komplexen Verhaltens könnten zytokinmodulierende Strategien in Zukunft eine wichtige zusätzliche Option zu herkömmlichen antibiotischen Therapien bei schweren bakteriellen Infektionen spielen, insbesondere in Anbetracht der zunehmenden Zahl resistenter Bakterien und immungeschwächter Patienten. Vorstellbar wäre ein Szenario, in dem Patienten mit Pneumokokkensepsis genetisch untersucht werden und bei Nachweis eines IL-10 „high secretor“ Genotyps eine IL-10 modulierende Therapie durchgeführt wird.

Für unsere Studie kann man abschließend zusammenfassen, dass nach unseren Daten der IL-10-G-Genotyp mit einer erhöhten IL-10 Freisetzung assoziiert ist und dieses ein Risikofaktor für die Entwicklung eines septischen Schocks bei Pneumokokkeninfektionen ist. Unsere Ergebnisse stützen somit das Konzept, dass eine ausgeprägte anti-inflammatorische Antwort während einer schweren bakteriellen Infektion zu einem Stadium der Immunsuppression führen kann und dadurch potentiell schädlich für den Krankheitsverlauf ist.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit untersucht den Einfluß eines Polymorphismus in der Promotorregion des IL-10 Gens auf die antigen-getriggerte IL-10-Freisetzung und den Schweregrad einer invasiven septischen Pneumokokkeninfektion, insbesondere des septischen Schocks.

Die Sepsispathogenese ist gekennzeichnet durch eine initiale pro-inflammatorische Phase, an die sich eine nachhaltige anti-inflammatorische Phase anschließt. Die anti-inflammatorische Phase in der Sepsis ist gekennzeichnet durch eine gestörte Antigen-Präsentation und Makrophagen-Funktion sowie eine supprimierte T-Zell-Funktion. Dieses wird zum Teil durch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 vermittelt. Eine resultierende reduzierte bakterielle Clearance mit unkontrollierter Sepsis ist die mögliche Folge.

In unserer Studie wurden 69 Patienten mit einer invasiven Pneumokokkeninfektion und 50 in Alter und Geschlecht angepasste Probanden untersucht. Der IL-10 -1082-Promotorgenpolymorphismus wurde mit einer Polymerasenketten-Reaktion aus EDTA-Vollblut untersucht. Die IL-10-Freisetzung wurde nach 24 Stunden LPS-Stimulation von Vollblut mittels ELISA-Technik im Vollblut-Überstand bestimmt. Die Sepsisschweregradeinteilung haben wir anhand standardisierter Kriterien durchgeführt.

Wir fanden keinen Unterschied bezüglich des Genotyps zwischen den Patienten und den Probanden. 13 der 69 Patienten mit einer invasiven Pneumokokkeninfektion entwickelten einen septischen Schock. Die Untersuchung des IL-10-Genotyps ergab bei Patienten mit invasiven Pneumokokkeninfektionen eine Assoziation des Allel IL-10-1082-G homozygoten Genotyps und dem Schweregrad der Sepsis. Der Anteil der Patienten, die homozygot für das Allel IL-10-1082-G waren, nahm mit dem Schweregrad der Sepsis kontinuierlich zu. Es zeigte sich, dass Patienten, die homozygot für das Allel IL-10-1082-G sind, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines septischen Schocks haben. In Assoziation zum Schweregrad des septischen Krankheitsbildes fand sich ein ansteigendes Chancenverhältnis für IL-10-GG-Genotyp. Phänotypisch war der IL-10-GG-Genotyp mit einer gesteigerten IL-10 Freisetzung verbunden. Die In-vitro-IL-10-Freisetzung nach Stimulation mit LPS im Vollblutassay war bei Allele-IL-10-G homozygoten Patienten signifikant erhöht.

Vermutlich ist im Rahmen einer septischen Pneumokokkeninfektion der Allel IL-10-1082-G homozygote Genotyp mit einer erhöhten IL-10-Induzierbarkeit assoziiert. Eine solche genetisch determinierte gesteigerte IL-10-Freisetzung führt wahrscheinlich durch die immunsuppressiven Effekte von IL-10 zu einer verminderten bakteriellen Clearance und damit zu einem protrahiertem und schweren Verlauf der Pneumokokkeninfektion.

6. Literaturverzeichnis

1. Afessa,B., Greaves,W.L., and Frederick,W.R. (1995). Pneumococcal bacteremia in adults: a 14-year experience in an inner-city university hospital. *Clin. Infect. Dis.* *21*, 345-351.
2. Alexander,H.R., Doherty,G.M., Buresh,C.M., Venzon,D.J., and Norton,J.A. (1991). A recombinant human receptor antagonist to interleukin 1 improves survival after lethal endotoxemia in mice. *J Exp. Med* *173*, 1029-1032.
3. Auburtin,M., Porcher,R., Bruneel,F., Scanvic,A., Trouillet,J.L., Bedos,J.P., Regnier,B., and Wolff,M. (2002). Pneumococcal meningitis in the intensive care unit: prognostic factors of clinical outcome in a series of 80 cases. *Am. J Respir. Crit Care Med* *165*, 713-717.
4. Austrian,R. (1981). Pneumococcus: the first one hundred years. *Rev. Infect. Dis.* *3*, 183-189.
5. Bartlett,J.G. and Mundy,L.M. (1995). Community-Acquired Pneumonia. *N Engl J Med* *333*, 1618-1624.
6. Berg,D.J., Kuhn,R., Rajewsky,K., Muller,W., Menon,S., Davidson,N., Grunig,G., and Rennick,D. (1995). Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin. Invest* *96*, 2339-2347.
7. Beutler,B., Milsark,I.W., and Cerami,A.C. (1985). Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* *229*, 869-871.
8. Bogdan,C. and Nathan,C. (1993). Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann. N Y. Acad. Sci.* *685*, 713-739.
9. Bogdan,C., Vodovotz,Y., and Nathan,C. (1991). Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp. Med* *174*, 1549-1555.

10. Bone,R.C. (1996). Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann. Intern. Med* *125*, 680-687.
11. Bone,R.C., Balk,R.A., Cerra,F.B., Dellinger,R.P., Fein,A.M., Knaus,W.A., Schein,R.M., and Sibbald,W.J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* *101*, 1644-1655.
12. Bone,R.C., Grodzin,C.J., and Balk,R.A. (1997). Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* *112*, 235-243.
13. Brandenburg,J.A., Marrie,T.J., Coley,C.M., Singer,D.E., Obrosky,D.S., Kapoor,W.N., and Fine,M.J. (2000). Clinical presentation, processes and outcomes of care for patients with pneumococcal pneumonia. *J Gen. Intern. Med* *15*, 638-646.
14. Burdin,N., Van Kooten,C., Galibert,L., Abrams,J.S., Wijdenes,J., Banchereau,J., and Rousset,F. (1995). Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J Immunol.* *154*, 2533-2544.
15. Burman,L.A., Trollfors,B., Andersson,B., Henrichsen,J., Juto,P., Kallings,I., Lagergard,T., Mollby,R., and Norrby,R. (1991). Diagnosis of pneumonia by cultures, bacterial and viral antigen detection tests, and serology with special reference to antibodies against pneumococcal antigens. *J Infect. Dis.* *163*, 1087-1093.
16. Catterall,J.R. (1999). *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* *54*, 929-937.
17. Chomarat,P., Risoan,M.C., Banchereau,J., and Miossec,P. (1993). Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J Exp. Med* *177*, 523-527.
18. Cunha,F.Q., Moncada,S., and Liew,F.Y. (1992). Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *182*, 1155-1159.
19. D'Andrea,A., Aste-Amezaga,M., Valiante,N.M., Ma,X., Kubin,M., and Trinchieri,G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-

- production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp. Med* 178, 1041-1048.
20. Dalhoff,K., Hansen,F., Dromann,D., Schaaf,B., Aries,S.P., and Braun,J. (1998). Inhibition of neutrophil apoptosis and modulation of the inflammatory response by granulocyte colony-stimulating factor in healthy and ethanol-treated human volunteers. *J Infect. Dis.* 178, 891-895.
 21. De Groote,D., Zangerle,P.F., Gevaert,Y., Fassotte,M.F., Beguin,Y., Noizat-Pirenne,F., Pirenne,J., Gathy,R., Lopez,M., Dehart,I., and . (1992). Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 4, 239-248.
 22. de Neeling,A.J., van Pelt,W., Hol,C., Ligtoet,E.E., Sabbe,L.J., Bartelds,A., and van Embden,J.D. (1999). Temporary increase in incidence of invasive infection due to *Streptococcus pneumoniae* in The Netherlands. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1579-1580.
 23. de Waal,M.R., Abrams,J., Bennett,B., Figdor,C.G., and de Vries,J.E. (1991a). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp. Med* 174, 1209-1220.
 24. de Waal,M.R., Figdor,C.G., Huijbens,R., Mohan-Peterson,S., Bennett,B., Culpepper,J., Dang,W., Zurawski,G., and de Vries,J.E. (1993). Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J Immunol.* 151, 6370-6381.
 25. de Waal,M.R., Haanen,J., Spits,H., Roncarolo,M.G., te,V.A., Figdor,C., Johnson,K., Kastelein,R., Yssel,H., and de Vries,J.E. (1991b). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp. Med* 174, 915-924.
 26. Derkx,B., Marchant,A., Goldman,M., Bijlmer,R., and van Deventer,S. (1995). High levels of interleukin-10 during the initial phase of fulminant meningococcal septic shock. *J Infect. Dis.* 171, 229-232.

27. Ding,L., Linsley,P.S., Huang,L.Y., Germain,R.N., and Shevach,E.M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol.* *151*, 1224-1234.
28. Epplen,C., Jackel,S., Santos,E.J., D'Souza,M., Poehlau,D., Dotzauer,B., Sindern,E., Haupts,M., Rude,K.P., Weber,F., Stover,J., Poser,S., Gehler,W., Malin,J.P., Przuntek,H., and Epplen,J.T. (1997). Genetic predisposition to multiple sclerosis as revealed by immunoprinting. *Ann. Neurol.* *41*, 341-352.
29. Fang,G.D., Fine,M., Orloff,J., Arisumi,D., Yu,V.L., Kapoor,W., Grayston,J.T., Wang,S.P., Kohler,R., Muder,R.R., and . (1990). New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases. *Medicine (Baltimore)* *69*, 307-316.
30. Farr,B.M., Kaiser,D.L., Harrison,B.D., and Connolly,C.K. (1989). Prediction of microbial aetiology at admission to hospital for pneumonia from the presenting clinical features. British Thoracic Society Pneumonia Research Subcommittee. *Thorax* *44*, 1031-1035.
31. Feldman,C., Read,R., Rutman,A., Jeffery,P.K., Brain,A., Lund,V., Mitchell,T.J., Andrew,P.W., Boulnois,G.J., Todd,H.C., and . (1992). The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with intact human respiratory mucosa in vitro. *Eur. Respir. J* *5*, 576-583.
32. Finbloom,D.S. and Winestock,K.D. (1995). IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol.* *155*, 1079-1090.
33. Fine,M.J., Smith,M.A., Carson,C.A., Mutha,S.S., Sankey,S.S., Weissfeld,L.A., and Kapoor,W.N. (1996). Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis. *JAMA* *275*, 134-141.
34. Fiorentino,D.F., Bond,M.W., and Mosmann,T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp. Med* *170*, 2081-2095.
35. Fiorentino,D.F., Zlotnik,A., Mosmann,T.R., Howard,M., and O'Garra,A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* *147*, 3815-3822.

36. Friedman,G., Jankowski,S., Marchant,A., Goldman,M., Kahn,R.J., and Vincent,J.L. (1997). Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock. *J Crit Care* 12, 183-187.
37. Fumeaux,T. and Pugin,J. (2002). Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am. J Respir. Crit Care Med* 166, 1475-1482.
38. Gallagher,P.M., Lowe,G., Fitzgerald,T., Bella,A., Greene,C.M., McElvaney,N.G., and O'Neill,S.J. (2003). Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia. *Thorax* 58, 154-156.
39. Gazzinelli,R.T., Oswald,I.P., James,S.L., and Sher,A. (1992). IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol.* 148, 1792-1796.
40. Gerard,C., Bruyns,C., Marchant,A., Abramowicz,D., Vandenabeele,P., Delvaux,A., Fiers,W., Goldman,M., and Velu,T. (1993). Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp. Med* 177, 547-550.
41. Gibson,A.W., Edberg,J.C., Wu,J., Westendorp,R.G., Huizinga,T.W., and Kimberly,R.P. (2001). Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 166, 3915-3922.
42. Giesecke,J. and Fredlund,H. (1997). Increase in pneumococcal bacteraemia in Sweden. *Lancet* 349, 699-700.
43. Girndt,M., Kaul,H., Sester,U., Ulrich,C., Sester,M., Georg,T., and Kohler,H. (2002). Anti-inflammatory interleukin-10 genotype protects dialysis patients from cardiovascular events. *Kidney Int.* 62, 949-955.
44. Glynn,P., Coakley,R., Kilgallen,I., Murphy,N., and O'Neill,S. (1999). Circulating interleukin 6 and interleukin 10 in community acquired pneumonia. *Thorax* 54, 51-55.
45. Go,N.F., Castle,B.E., Barrett,R., Kastelein,R., Dang,W., Mosmann,T.R., Moore,K.W., and Howard,M. (1990). Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor:

- unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp. Med* 172, 1625-1631.
46. Gogos,C.A., Drosou,E., Bassaris,H.P., and Skoutelis,A. (2000). Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect. Dis.* 181, 176-180.
 47. Gomez-Jimenez,J., Martin,M.C., Sauri,R., Segura,R.M., Esteban,F., Ruiz,J.C., Nuvials,X., Boveda,J.L., Peracaula,R., and Salgado,A. (1995). Interleukin-10 and the monocyte/macrophage-induced inflammatory response in septic shock. *J Infect. Dis.* 171, 472-475.
 48. Greenberger,M.J., Strieter,R.M., Kunkel,S.L., Danforth,J.M., Goodman,R.E., and Standiford,T.J. (1995). Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of Klebsiella pneumonia. *J Immunol.* 155, 722-729.
 49. Gruber,M.F., Williams,C.C., and Gerrard,T.L. (1994). Macrophage-colony-stimulating factor expression by anti-CD45 stimulated human monocytes is transcriptionally up-regulated by IL-1 beta and inhibited by IL-4 and IL-10. *J Immunol.* 152, 1354-1361.
 50. Ho,A.S. and Moore,K.W. (1994). Interleukin-10 and its receptor. *Ther. Immunol.* 1, 173-185.
 51. Hoban,D.J., Doern,G.V., Fluit,A.C., Roussel-Delvallez,M., and Jones,R.N. (2001). Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis.* 32 *Suppl* 2, S81-S93.
 52. Hoen,B., Viel,J.F., Gerard,A., Dureux,J.B., and Canton,P. (1993). Mortality in pneumococcal meningitis: a multivariate analysis of prognostic factors. *Eur. J Med* 2, 28-32.
 53. Howard,M., Muchamuel,T., Andrade,S., and Menon,S. (1993). Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp. Med* 177, 1205-1208.
 54. Howard,M. and O'Garra,A. (1992). Biological properties of interleukin 10. *Immunol. Today* 13, 198-200.

55. Itoh,K. and Hirohata,S. (1995). The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol.* *154*, 4341-4350.
56. Johnston,R.B., Jr. (1991). Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev Infect. Dis.* *13 Suppl 6*, 509-517.
57. Kaetzel,C.S. (2001). Polymeric Ig receptor: defender of the fort or Trojan horse? *Curr. Biol.* *11*, R35-R38.
58. Kalechman,Y., Gafter,U., Gal,R., Rushkin,G., Yan,D., Albeck,M., and Sredni,B. (2002). Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on timing of immunomodulating intervention. *J Immunol.* *169*, 384-392.
59. Kalin,M., Ortqvist,A., Almela,M., Aufwerber,E., Dwyer,R., Henriques,B., Jorup,C., Julander,I., Marrie,T.J., Mufson,M.A., Riquelme,R., Thalme,A., Torres,A., and Woodhead,M.A. (2000). Prospective study of prognostic factors in community-acquired bacteremic pneumococcal disease in 5 countries. *J Infect. Dis.* *182*, 840-847.
60. Kastenbauer,S. and Pfister,H.W. (2003). Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain* *126*, 1015-1025.
61. Kauppinen,M.T., Herva,E., Kujala,P., Leinonen,M., Saikku,P., and Syrjala,H. (1995). The etiology of community-acquired pneumonia among hospitalized patients during a Chlamydia pneumoniae epidemic in Finland. *J Infect. Dis.* *172*, 1330-1335.
62. Kayser, F. H.(1998): Bakterien als Krankheitserreger, Streptococcus und Enterococcus. Kayser, F. H , Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M. Medizinische Mikrobiologie. 233-235. Thieme Verlag, Stuttgart. 9. Auflage (1998).
63. Kim,J.M., Brannan,C.I., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., Khan,T.A., and Moore,K.W. (1992). Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol.* *148*, 3618-3623.
64. Knaus,W.A., Draper,E.A., Wagner,D.P., and Zimmerman,J.E. (1985). APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* *13*, 818-829.
65. Koedel,U., Scheld,W.M., and Pfister,H.W. (2002). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect. Dis.* *2*, 721-736.

66. Koivula,I., Sten,M., and Makela,P.H. (1994). Risk factors for pneumonia in the elderly. *Am. J Med* 96, 313-320.
67. Kube,D., Platzer,C., von Knethen,A., Straub,H., Bohlen,H., Hafner,M., and Tesch,H. (1995). Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine* 7, 1-7.
68. Kuga,S., Otsuka,T., Niuro,H., Nunoi,H., Nemoto,Y., Nakano,T., Ogo,T., Umei,T., and Niho,Y. (1996). Suppression of superoxide anion production by interleukin-10 is accompanied by a downregulation of the genes for subunit proteins of NADPH oxidase. *Exp. Hematol.* 24, 151-157.
69. Lai,C.F., Ripperger,J., Morella,K.K., Jurlander,J., Hawley,T.S., Carson,W.E., Kordula,T., Caligiuri,M.A., Hawley,R.G., Fey,G.H., and Baumann,H. (1996). Receptors for interleukin (IL)-10 and IL-6-type cytokines use similar signaling mechanisms for inducing transcription through IL-6 response elements. *J Biol. Chem.* 271, 13968-13975.
70. Lalani,I., Bhol,K., and Ahmed,A.R. (1997). Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 79, 469-483.
71. Latifi,S.Q., O'Riordan,M.A., and Levine,A.D. (2002). Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect. Immun.* 70, 4441-4446.
72. Lehmann,A.K., Halstensen,A., Sornes,S., Rokke,O., and Waage,A. (1995). High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. *Infect. Immun.* 63, 2109-2112.
73. Levy,Y. and Brouet,J.C. (1994). Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin. Invest* 93, 424-428.
74. Lipsky,B.A., Boyko,E.J., Inui,T.S., and Koepsell,T.D. (1986). Risk factors for acquiring pneumococcal infections. *Arch. Intern. Med* 146, 2179-2185.
75. Liu,Y., de Waal,M.R., Briere,F., Parham,C., Bridon,J.M., Banchereau,J., Moore,K.W., and Xu,J. (1997). The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J Immunol.* 158, 604-613.

76. Liu, Y., Wei, S.H., Ho, A.S., de Waal, M.R., and Moore, K.W. (1994). Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol.* *152*, 1821-1829.
77. Marchant, A., Bruyins, C., Vandenabeele, P., Ducarme, M., Gerard, C., Delvaux, A., De Groote, D., Abramowicz, D., Velu, T., and Goldman, M. (1994a). Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *Eur. J Immunol.* *24*, 1167-1171.
78. Marchant, A., Deviere, J., Byl, B., De Groote, D., Vincent, J.L., and Goldman, M. (1994b). Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet* *343*, 707-708.
79. Marrie, T.J. (1998). Community-acquired pneumonia: epidemiology, etiology, treatment. *Infect. Dis. Clin. North Am.* *12*, 723-740.
80. Marrie, T.J. (2000). Community-acquired pneumonia in the elderly. *Clin. Infect. Dis.* *31*, 1066-1078.
81. Mertz, P.M., DeWitt, D.L., Stetler-Stevenson, W.G., and Wahl, L.M. (1994). Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. *J Biol. Chem.* *269*, 21322-21329.
82. Minton, E.J. and Macfarlane, J.T. (1996). Antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* *51 Suppl 2*, S45-S50.
83. Mitchell, T.J. and Andrew, P.W. (1997). Biological properties of pneumolysin. *Microb. Drug Resist.* *3*, 19-26.
84. Miura, Y., Thoburn, C.J., Bright, E.C., Chen, W., Nakao, S., and Hess, A.D. (2002). Cytokine and chemokine profiles in autologous graft-versus-host disease (GVHD): interleukin 10 and interferon gamma may be critical mediators for the development of autologous GVHD. *Blood* *100*, 2650-2658.
85. Moore, K.W., de Waal, M.R., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 683-765.
86. Musher, D.M. (2003): Erkrankungen durch Grampositive Bakterien. Pneumokokkeninfektionen. Dietel M., Dudenhausen J., Suttorp N. *Harrisons Innere Medizin, Band I*,

- Abschnitt 5, Kapitel 138, 974. McGraw-Hill / ABW - Wissenschaftsverlag, Berlin. 15. Auflage (2003).
87. Muzio,M., Polntarutti,N., Bosisio,D., Prahladan,M.K., and Mantovani,A. (2000). Toll like receptor family (TLT) and signalling pathway. *Eur. Cytokine Netw.* *11*, 489-490.
 88. Niiro,H., Otsuka,T., Tanabe,T., Hara,S., Kuga,S., Nemoto,Y., Tanaka,Y., Nakashima,H., Kitajima,S., Abe,M., and . (1995). Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. *Blood* *85*, 3736-3745.
 89. Paton,J.C., Andrew,P.W., Boulnois,G.J., and Mitchell,T.J. (1993). Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* *47*, 89-115.
 90. Perrey,C., Turner,S.J., Pravica,V., Howell,W.M., and Hutchinson,I.V. (1999). ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms. *Transpl. Immunol.* *7*, 127-128.
 91. Plouffe,J.F., Breiman,R.F., and Facklam,R.R. (1996). Bacteremia with *Streptococcus pneumoniae*. Implications for therapy and prevention. Franklin County Pneumonia Study Group. *JAMA* *275*, 194-198.
 92. Porath,A., Schlaeffler,F., and Lieberman,D. (1997). The epidemiology of community-acquired pneumonia among hospitalized adults. *J Infect.* *34*, 41-48.
 93. Rayner,C.F., Jackson,A.D., Rutman,A., Dewar,A., Mitchell,T.J., Andrew,P.W., Cole,P.J., and Wilson,R. (1995). Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect. Immun.* *63*, 442-447.
 94. Reinert,R.R., Al Lahham,A., Lemperle,M., Tenholte,C., Briefs,C., Haupts,S., Gerards,H.H., and Lutticken,R. (2002). Emergence of macrolide and penicillin resistance among invasive pneumococcal isolates in Germany. *J Antimicrob. Chemother.* *49*, 61-68.

95. Rello,J., Quintana,E., Ausina,V., Net,A., and Prats,G. (1993). A three-year study of severe community-acquired pneumonia with emphasis on outcome. *Chest* 103, 232-235.
96. Reuss,E., Fimmers,R., Kruger,A., Becker,C., Rittner,C., and Hohler,T. (2002). Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors--a twin study. *Genes Immun.* 3, 407-413.
97. Reynard,M.P., Turner,D., and Navarrete,C.V. (2000). Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. *Eur. J Immunogenet.* 27, 241-249.
98. Riley,J.K., Takeda,K., Akira,S., and Schreiber,R.D. (1999). Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol. Chem.* 274, 16513-16521.
99. Riordan,F.A., Marzouk,O., Thomson,A.P., Sills,J.A., and Hart,C.A. (1996). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in meningococcal disease. *Arch. Dis. Child* 75, 453-454.
100. Rodig,S.J., Meraz,M.A., White,J.M., Lampe,P.A., Riley,J.K., Arthur,C.D., King,K.L., Sheehan,K.C., Yin,L., Pennica,D., Johnson,E.M., Jr., and Schreiber,R.D. (1998). Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 93, 373-383.
101. Rousset,F., Garcia,E., Defrance,T., Peronne,C., Vezzio,N., Hsu,D.H., Kastelein,R., Moore,K.W., and Banchereau,J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 1890-1893.
102. Rubins,J.B., Charboneau,D., Fasching,C., Berry,A.M., Paton,J.C., Alexander,J.E., Andrew,P.W., Mitchell,T.J., and Janoff,E.N. (1996). Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Am. J Respir. Crit Care Med* 153, 1339-1346.

103. Ruiz,M., Ewig,S., Marcos,M.A., Martinez,J.A., Arancibia,F., Mensa,J., and Torres,A. (1999). Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity, and severity. *Am. J Respir. Crit Care Med* 160, 397-405.
104. Sahm,D.F., Jones,M.E., Hickey,M.L., Diakun,D.R., Mani,S.V., and Thornsberry,C. (2000). Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated in Asia and Europe, 1997-1998. *J Antimicrob. Chemother.* 45, 457-466.
105. Schuchat,A., Robinson,K., Wenger,J.D., Harrison,L.H., Farley,M., Reingold,A.L., Lefkowitz,L., and Perkins,B.A. (1997). Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med* 337, 970-976.
106. Sfeir,T., Saha,D.C., Astiz,M., and Rackow,E.C. (2001). Role of interleukin-10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock. *Crit Care Med* 29, 129-133.
107. Song,G.Y., Chung,C.S., Chaudry,I.H., and Ayala,A. (1999). What is the role of interleukin 10 in polymicrobial sepsis: anti-inflammatory agent or immunosuppressant? *Surgery* 126, 378-383.
108. Sorensen,T.I., Nielsen,G.G., Andersen,P.K., and Teasdale,T.W. (1988). Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 318, 727-732.
109. Standiford,T.J., Strieter,R.M., Lukacs,N.W., and Kunkel,S.L. (1995). Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 155, 2222-2229.
110. Strassmann,G., Kambayashi,T., Jacob,C.O., and Sredni,D. (1997). The immunomodulator AS-101 inhibits IL-10 release and augments TNF alpha and IL-1 alpha release by mouse and human mononuclear phagocytes. *Cell Immunol.* 176, 180-185.
111. Takeda,K., Clausen,B.E., Kaisho,T., Tsujimura,T., Terada,N., Forster,I., and Akira,S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity.* 10, 39-49.

112. Thomsen,R.W., Hundborg,H.H., Lervang,H.H., Johnsen,S.P., Schonheyder,H.C., and Sorensen,H.T. (2004). Risk of community-acquired pneumococcal bacteremia in patients with diabetes: a population-based case-control study. *Diabetes Care* 27, 1143-1147.
113. Tong,H.H., Weiser,J.N., James,M.A., and DeMaria,T.F. (2001). Effect of influenza A virus infection on nasopharyngeal colonization and otitis media induced by transparent or opaque phenotype variants of *Streptococcus pneumoniae* in the chinchilla model. *Infect. Immun.* 69, 602-606.
114. Turner,D.M., Williams,D.M., Sankaran,D., Lazarus,M., Sinnott,P.J., and Hutchinson,I.V. (1997). An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur. J Immunogenet.* 24, 1-8.
115. van der Pol,W.L., Huizinga,T.W., Vidarsson,G., van der Linden,M.W., Jansen,M.D., Keijsers,V., de Straat,F.G., Westerdal,N.A., de Winkel,J.G., and Westendorp,R.G. (2001). Relevance of Fc γ receptor and interleukin-10 polymorphisms for meningococcal disease. *J Infect. Dis.* 184, 1548-1555.
116. van der Poll,T., de Waal,M.R., Coyle,S.M., and Lowry,S.F. (1997a). Antiinflammatory cytokine responses during clinical sepsis and experimental endotoxemia: sequential measurements of plasma soluble interleukin (IL)-1 receptor type II, IL-10, and IL-13. *J Infect. Dis.* 175, 118-122.
117. van der Poll,T., Marchant,A., Buurman,W.A., Berman,L., Keogh,C.V., Lazarus,D.D., Nguyen,L., Goldman,M., Moldawer,L.L., and Lowry,S.F. (1995). Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol.* 155, 5397-5401.
118. van der Poll,T., Marchant,A., Keogh,C.V., Goldman,M., and Lowry,S.F. (1996). Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect. Dis.* 174, 994-1000.
119. van der Poll,T., Marchant,A., and van Deventer,S.J. (1997b). The role of interleukin-10 in the pathogenesis of bacterial infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 3, 605-607.
120. van der Poll,T. and van Deventer,S.J. (1999). Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 13, 413-26, ix.

121. van der Sluijs,K.F., Nijhuis,M., Levels,J.H., Florquin,S., Mellor,A.L., Jansen,H.M., der,P.T., and Lutter,R. (2006). Influenza-induced expression of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances interleukin-10 production and bacterial outgrowth during secondary pneumococcal pneumonia. *J. Infect. Dis.* *193*, 214-222.
122. van der Sluijs,K.F., van Elden,L.J., Nijhuis,M., Schuurman,R., Pater,J.M., Florquin,S., Goldman,M., Jansen,H.M., Lutter,R., and van der,P.T. (2004). IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection. *J. Immunol.* *172*, 7603-7609.
123. van Dissel,J.T., van Langevelde,P., Westendorp,R.G., Kwappenberg,K., and Frolich,M. (1998). Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* *351*, 950-953.
124. Volk,H.D., Reinke,P., and Docke,W.D. (2000). Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem. Immunol.* *74*, 162-177.
125. Walley,K.R., Lukacs,N.W., Standiford,T.J., Strieter,R.M., and Kunkel,S.L. (1996). Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect. Immun.* *64*, 4733-4738.
126. Wang,E., Simard,M., Ouellet,N., Bergeron,Y., Beauchamp,D., and Bergeron,M.G. (2000). Modulation of cytokines and chemokines, limited pulmonary vascular bed permeability, and prevention of septicemia and death with ceftriaxone and interleukin-10 in pneumococcal pneumonia. *J Infect. Dis.* *182*, 1255-1259.
127. Watson,D.A., Musher,D.M., and Verhoef,J. (1995). Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. *Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *14*, 479-490.
128. Wattanathum,A., Manocha,S., Groshaus,H., Russell,J.A., and Walley,K.R. (2005). Interleukin-10 haplotype associated with increased mortality in critically ill patients with sepsis from pneumonia but not in patients with extrapulmonary sepsis. *Chest* *128*, 1690-1698.
129. Wehinger,J., Gouilleux,F., Groner,B., Finke,J., Mertelsmann,R., and Weber-Nordt,R.M. (1996). IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett.* *394*, 365-370.

130. Westendorp,R.G., Langermans,J.A., Huizinga,T.W., Verweij,C.L., and Sturk,A. (1997). Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 349, 1912-1913.
131. Willems,F., Marchant,A., Delville,J.P., Gerard,C., Delvaux,A., Velu,T., de Boer,M., and Goldman,M. (1994). Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur. J Immunol.* 24, 1007-1009.
132. Yang,X., Gartner,J., Zhu,L., Wang,S., and Brunham,R.C. (1999). IL-10 gene knockout mice show enhanced Th1-like protective immunity and absent granuloma formation following *Chlamydia trachomatis* lung infection. *J Immunol.* 162, 1010-1017.
133. Yang,X., HayGlass,K.T., and Brunham,R.C. (1996). Genetically determined differences in IL-10 and IFN-gamma responses correlate with clearance of *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis infection. *J Immunol.* 156, 4338-4344.
134. Zanotti,S., Kumar,A., and Kumar,A. (2002). Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 11, 1061-1075.
135. Zdanov,A., Schalk-Hihi,C., Gustchina,A., Tsang,M., Weatherbee,J., and Wlodawer,A. (1995). Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure.* 3, 591-601.
136. Zhang,J.R., Mostov,K.E., Lamm,M.E., Nanno,M., Shimida,S., Ohwaki,M., and Tuomanen,E. (2000). The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* 102, 827-837.

7. Publikation

Schaaf, B., Boehmke, F., Esnaashari, H., Seitzer, U., Kothe, H., Maass, M., Dalhoff, K.,
Pneumococcal Septic Shock Is Associated With The Interleukin-10 -1082 Gene Promotor Polymorphism.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; 2003 Aug 15; 168(4): 476-80. Epub 2003 May 13.

8. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, deren Rat und Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Dalhoff für die Anregung und die Ermöglichung zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. Bernhard Schaaf für die Betreuung, Ratschläge und Motivation.

Frau Ute Wegner, Frau Barbara Gogoll und Frau Simone Ross, deren fachkundige Hilfe im Labor eine große Unterstützung war.

Möglich wurde diese Arbeit aber erst durch die Unterstützung und das Vertrauen meiner Familie.

9. Lebenslauf

Person

Florian Böhmke

Geboren am 20. September 1975 in Remscheid

Eltern

Ingeborg Böhmke, geb. Dürholt

Dr. med. Joachim Böhmke

Schule

1982 - 1985 Grundschule Rhauderfehn

1985 - 1987 Orientierungsstufe Rhauderfehn

1987 - 1995 Ubbo-Emmius-Gymnasium Leer

Schulabschluss: 06/ 1995 Abitur

Zivildienst

1995 – 1996 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, Leer

Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium

ab 1996 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck

Apr. 1999 Ärztliche Vorprüfung

Apr. 2000 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Apr. 2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Nov. 2003 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Abschluß des Medizinstudiums

2002 - 2003 Praktisches Jahr

August – November 2002: Innere Medizin, Ostholstein Kliniken Eutin

November 2002 – April 2003: Neurologie, Medizinische Universität zu Lübeck

März – August 2003: Chirurgie, Ostholstein Kliniken Eutin
2000 - 2006 Promotion an der Universität zu Lübeck, Medizinische Klinik III

ärztliche Tätigkeit

seit März Assistenzarzt Marienkrankenhaus Papenburg, Innere Medizin
2004