

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

**MORTALITÄT IN DER HUMANEN SEPSIS IST ASSOZIIERT
MIT DER TOLL-LIKE REZEPTOR 2 -EXPRESSION AUF
BLUTMONOZYTEN**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von

Karin Luitjens
geboren in Papenburg

Osnabrück 2009

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

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Elke Muhl

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2010

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.01.2010

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung und Fragestellung

- 1.1 Sepsis
- 1.2 Das angeborene Immunsystem
- 1.3 Toll-like Rezeptoren
- 1.4 Fragestellung

2. Material und Methoden

- 2.1 Materialien
- 2.2 Methoden
- 2.3 Statistische Auswertung

3. Ergebnisse

- 3.1 Klinische und demographische Daten der Patienten
- 3.2 Klinische Daten der Patientengruppen, Sepsis-Schweregrad und klinischer Verlauf
- 3.3 Die PRR-Expression von Probanden im Vergleich mit Sepsispatienten
- 3.4 Die PRR-Expression von Sepsispatienten
- 3.5 Die Zytokininduzierbarkeit bei Sepsispatienten in mit LPS und LTA stimuliertem Vollblutassay

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Publikationen

Abkürzungsverzeichnis:

| | |
|-----------|---|
| APACHE | Acute Physiology, Age, Chronic Health Evaluation |
| APS | Acute Physiology Score |
| CARS | Compensatory Anti-inflammation Response Syndrome |
| CD14 | Cluster of Differentiation |
| COPD | Chronische Obstruktive Bronchitis |
| DC | Dendritische Zellen |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dToll | Drosophila Toll |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| FACS-Scan | Flourescence Activated Cell Separation |
| FSC | Vorwärtsstreulicht |
| GCS | Glasgow Coma Scale |
| Ig | Immunglobulin |
| IKK | Inhibitor of Nuclear Faktor-KappaB-Kinase |
| IL | Interleukin |
| IRAK | IL-1R-associated Kinase |
| KHK | Koronare Herzkrankheit |
| LBP | LPS-bindendes Protein |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LRR | Leucin-reiche Repeats |
| LTA | Lipoteichonsäure |
| MFI | Mean Flourescence Intensity |
| MODS | Multiorgandysfunktionssyndrom |
| MYD88 | Myeloid Differentiation Primary-Response Protein 88 |
| NFkappaB | Nuclear Factor KappaB |
| PAMP | Pathogen Associated Molecular Patterns |
| PMN | Polymorphonukleare Zellen |
| PRR | Pattern Recognition Receptors |
| RPM | Revolutions per minute |
| SIRS | Systemic Inflammatory Response Syndrome |
| SSC | Seitwärtsstreulicht |
| TAB | TAK1-binding Protein |
| TAK | Transforming-growth-factor-beta-activated Kinase |
| TIR | Toll/IL1-Rezeptor |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TRAF | Tumor-necrosis-factor-receptor-assoziated Factor |

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Sepsis

Sepsis ist eine systemische Antwort auf eine Infektion. Sepsis und seine Folgeerscheinungen sind lebensbedrohliche Komplikationen von Infektionen und die häufigste Todesursache auf Intensivstationen. Sepsis und seine Folgeerkrankungen wiesen im Jahre 2000 in den USA eine Inzidenz von 240 Fällen auf 100.000 Einwohner auf. Für europäische Länder ist die Inzidenz etwas niedriger; sie beträgt für Deutschland pro Jahr ca. 54-116 Fälle pro 100.000 Einwohner (13). Trotz technischer Fortschritte und verbesserter Versorgung in der Intensivmedizin stieg die Inzidenz zwischen 1979 und 2000 um das 2,9-fache an (8,7% jährlich) (35). Die Krankenhausmortalität bleibt fast unverändert hoch, mit ca. 30% für die severe Sepsis und ca. 60% für den septischen Schock (8). In den USA betragen die Kosten für das Gesundheitssystem etwa 16,7 Milliarden Dollar pro Jahr (4).

Das Spektrum der verantwortlichen Mikroorganismen hat sich in den Jahrzehnten von vorwiegend gramnegativen Erregern in den 1980ern zugunsten grampositiver Erreger verschoben (48). Die häufigsten Erreger gramnegativer Sepsis sind *Escherichia coli*, *Klebsiella species* und *Pseudomonas aeruginosa*. Die meisten Fälle von grampositiver Sepsis werden verursacht von Staphylokokken (*Staphylococcus aureus*, koagulasenegative Staphylokokken) und Streptokokken (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*) (8). Pilze, hauptsächlich *Candida*, machen 5% der Fälle von schwerer Sepsis aus (56). Focus einer Sepsis ist in den meisten Fällen die Lunge, gefolgt von dem Abdomen und dem Urogenitaltrakt (27, 57).

1.1.1 Definition

Lange Zeit gab es keine einheitliche Definition für Sepsis. Im August 1991 fand in Chicago, USA, eine Konsens-Konferenz der „Society of Critical Care Medicine“ und des „American College of Chest Physicians“ statt, die eine standardisierte Definition für den Begriff Sepsis erarbeiteten und Termini einführten, um zwischen den verschiedenen Stufen der Krankheit zu unterscheiden. Diese Einteilung ist heutzutage im klinischen Gebrauch gut etabliert. Sepsis und seine Folgeerscheinungen repräsentieren ein Kontinuum der Krankheitsschwere. Eingeteilt wird in Sepsis, Severe Sepsis, Septischer Schock und dem Multiorgan dysfunktionssyndrom (MODS). (Siehe Methodenteil)

1.1.2 Pathogenese

Sepsis resultiert aus getriggerten Abwehrmechanismen des Körpers auf eingedrungene Mikroorganismen bzw. ausgedehnte Gewebeschäden. Diese Mechanismen bestehen in der Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen, sowie in der Aktivierung von neuroendokrinen Reflexen und Plasma-Protein-Kaskadesystemen, wie dem Komplementsystem, der intrinsischen und extrinsischen Gerinnung und dem fibrinolytischen System, sowie besonders in der massiven Freisetzung von Zytokinen (56).

Zytokine stellen die Schlüsselemente in der inflammatorischen Antwort des Organismus auf eine Infektion dar. Zytokine sind kleine Glykoproteine (8-26 kD), die als interzelluläre Mediatoren zur Aktivierung von Zellen beitragen und primär von Zellen des Immunsystems synthetisiert werden. Sie können funktionell in proinflammatorische Zytokine, wie TNF, IL-1, IL-6 und IL-8 und in anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10 unterteilt werden. TNF scheint das wichtigste Zytokin in der Pathophysiologie der Sepsis zu sein. TNF induziert die Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren und ist somit entscheidend für die Induktion einer lokal protektiven Immunantwort. Eine exzessive TNF-Produktion allein kann letal sein. Eine Hauptrolle scheint TNF besonders in der Pathogenese des septischen Schocks zu spielen. TNF ist fähig das gesamte Spektrum von hämodynamischen, metabolischen und pathophysiologischen Folgen zu triggern (58).

IL-6 ist ebenfalls ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin, welches von vielen Zelltypen produziert wird (54). Es erhöht das chemotaktische Potential der Neutrophilen.

IL-10 wird von T2-Helferzellen, Monozyten und epithelialen Zellen produziert. Als anti-inflammatorisches Zytokin ist es ein potenter Inhibitor der Synthese von TNF, IL-1 und IL-8 und anderer entzündungsvermittelnder Mediatoren aus Monozyten, Makrophagen und T-Zellen. Außerdem antagonisiert es die Entwicklung von T1-Helferzellen (43).

In gesunden Individuen sind die Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine im Kreislauf sehr niedrig (41). Werden Monozyten und Makrophagen durch pathogene Organismen stimuliert, führt dies über eine NFkappaB-Stimulierung zu einer starken Produktion von Zytokinen. Pro-inflammatorische Zytokine triggern die Hochregulierung zellulärer Rezeptoren zur Pathogenerkennung und rekrutieren Phagozyten und Lymphozyten. Eine Überproduktion dieser Zytokine führt allerdings zu Vasodilatation und Hypotension, zu erhöhter Gefäßdurchlässigkeit, mikrovaskulären Schäden und als Folge hiervon zu Gewebeischämie und schließlich Organdysfunktion. Maximale Konzentrationen von Zytokinen wie TNF, IL-1, IL-6, IL-8 und IL-10 können während der frühen hyperinflammatorischen Phase der Sepsis gemessen werden (54).

Robert C. Bone etablierte 1996/97 ein Model zur Pathogenese der Sepsis, das heute weithin akzeptiert ist. Am Anfang steht die lokale Infektion oder Gewebeschädigung. Die Antwort des Körpers ist die Herstellung eines proinflammatorischen Zustandes, um weitere Ausbreitung zu verhindern. Eine antiinflammatorische Gegenreaktion soll verhindern, dass die proinflammatorischen Mediatoren destruktiv werden. Ist die Ursprungsinfektion bzw. Gewebeschädigung entsprechend schwer oder sind die lokalen Abwehrmechanismen insuffizient, gehen erst die pro- und dann die anti-inflammatorischen Mediatoren in den systemischen Kreislauf über. Dies ist eine physiologische Reaktion. Das Immunsystem wird auf die sich ausbreitende Infektion vorbereitet, indem Abwehrmechanismen aktiviert werden. Durch die kompensatorische anti-inflammatorische Antwort wird dieses Geschehen normalerweise herunterreguliert. Eine zu massive inflammatorische Reaktion, sowie ein Verlust oder ein zu wenig an anti-inflammatorischer Gegenregulation führt zu einem Überwiegen der Proinflammation und mündet im klinischen Bild des „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) mit Vasodilatation, einer erhöhten mikrovaskulären Durchlässigkeit, Thrombozytenaggregation, Störung der Mikrozirkulation und Aktivierung des Gerinnungssystems. Folge ist eine Ischämie mit konsekutiver Organdysfunktion und eventuell Tod. Wird dieser Zustand nun durch eine zu massive anti-inflammatorische Gegenregulation beantwortet, kann dies zu Immunsuppression, ungenügender Infektabwehr, Gefäßschädigung und letztendlich, wie auch bei SIRS, zu Organdysfunktion und zum Tode führen. Bone bezeichnet diesen Zustand als „compensatory anti-inflammation response syndrome“ (CARS).

Unter normalen Umständen reagiert der Körper also durch eine ausgeglichene Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren auf eine Infektion. In der Sepsis jedoch versagt diese Regulationskapazität. Überdies gibt es Hinweise darauf, dass diese Dissonanz auch nach Genesung bestehen bleibt und diese Patienten ein erhöhtes Risiko tragen zu sterben (9, 10, 24).

1. 2 Das angeborene Immunsystem

Die Immunantwort wird unterteilt in ein erworbenes und ein angeborenes Immunsystem.

Das **erworbene Immunsystem** ist charakterisiert durch klonale Selektion von Antigen-spezifischen Lymphozyten. Diese B- und T-Lymphozyten exprimieren hoch spezielle Antigen-Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie, die durch zufälliges DNA-Rearrangement generiert werden. Jeder Lymphozyt besitzt seine einzigartige Rezeptorspezifität, so dass das gesamte Repertoire an Rezeptoren extrem groß und divers ist.

So ist der Körper in der Lage auf eine enorme Bandbreite von potenziellen Erregern zu reagieren. Erkennt ein Rezeptor sein Antigen, so wird seine Zelle aktiviert und diese vermehrt sich klonal, so dass eine effiziente Immunantwort erfolgen kann. Dieser Vorgang dauert allerdings einige Tage. Weiterhin bietet das adaptive Immunsystem langandauernden Schutz über die Generierung eines immunologischen Gedächtnisses. Über dieses hoch entwickelte System verfügen nur Wirbeltiere (7, 24, 33).

Das **angeborene Immunsystem** ist die „first line of defence“ gegen Pathogene.

Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch sehr viel älter als das erworbene. Es ist hoch entwickelt und hat die Fähigkeit zwischen körpereigenen und fremden Stoffen zu unterscheiden. Eine Form des angeborenen Immunsystems existiert wahrscheinlich in jedem vielzelligen Organismus (33). Es bekämpft erfolgreich den größten Teil der Infektionen, noch vor Aktivierung der erworbenen Immunabwehr (24). Das angeborene Immunsystem generiert kein immunologisches Gedächtnis. Es hat die Fähigkeit eine schnelle Antwort zu produzieren, indem es direkt mit dem Pathogen interagiert.

Zu den Effektoren des angeborenen Immunsystems zählen anatomische und physiologische Barrieren wie Epithelien, aber es gibt auch eine zellvermittelte Abwehr in Form von Makrophagen, Monozyten und Granulozyten. Monozyten sind die zu den Leukozyten gehörenden, größten mononukleären Zellen im Blut und besitzen auf ihrer Oberfläche u.a. Rezeptoren für Komplement und Fc-Rezeptoren für IgG. Sie zirkulieren im Blut und differenzieren sich nach Auswanderung in verschiedene Gewebe zu Makrophagen. Diese sind fähig zur Phagozytose und zur Antigenpräsentation. Sie können darüber hinaus Zytokine, antibakterielle Proteine und toxische Radikale bilden. Granulozyten sind polymorphkernige Leukozyten, die entsprechend ihrer Anfärbbarkeit in Neutrophile (90%), Eosinophile (2-4%) und Basophile (bis 1%) unterteilt werden. Sie sind fähig zur Phagozytose, Endotheladhärenz, Migration, Produktion von Sauerstoffradikalen und Zytokinen und Aktivierung des Komplementsystems.

Die nonklonalen Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen lösen nach Erkennung der Anwesenheit von pathogenen Strukturen eine zelluläre Immunantwort aus. Diese Antwort kann zum Beispiel in Phagozytose, Ausschüttung proinflammatorischer Zytokinen oder Expression von co-stimulatorischen Molekülen bestehen (33, 34). Die Spezifität der Rezeptoren ist im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem genetisch prädestiniert und wird an die folgenden Generationen weitergegeben. Die Rezeptoren entstehen nicht durch klonale Expansion, sondern alle Rezeptoren einer bestimmten Sorte haben dieselbe Spezifität.

Aktivatoren des angeborenen Immunsystems sind z.B. Lipopolysaccharide (LPS), Lipoteichonsäure (LTA), Peptidoglycan und bakterielle DNA. LPS ist Hauptbestandteil der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien. Lipopolysaccharide sind hochmolekulare Komplexe aus Lipid A, der toxischen Komponente, einer Kernregion und Polysacchariden, der immunogenen Komponente. Nach dem Tod der Bakterienzelle wird das Endotoxin frei und stellt ein exogenes Pyrogen dar, d.h. es löst im Menschen eine fieberhafte Reaktion aus. Lipoteichonsäuren (LTA) machen 20-30% der Zellwand grampositiver Bakterien aus. Auch LTA ist ein exogenes Pyrogen. Diese Aktivatoren werden als PAMPs (pathogen associated molecular patterns) bezeichnet.

Die Rezeptoren, welche die PAMPs erkennen, nennt man PRR (pattern recognition receptors). Zu diesen phylogenetisch konservierten Rezeptoren gehören auch die Toll-like Rezeptoren (TLR). Die TLR spielen eine Schlüsselrolle in der frühen Abwehr des Körpers gegen Pathogene (23, 30, 36).

1. 3 Toll-like Rezeptoren

Die Toll-like Rezeptoren (TLR) spielen eine Schlüsselrolle im angeborenen Immunsystem, indem sie konservierte, molekulare Muster von Mikroorganismen, wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS), erkennen und über den Transskriptionsfaktor NFkappaB eine Zytokinproduktion auslösen. Die zentrale Rolle von TLR2 und TLR4 in der Antwort auf mikrobielle Pathogene lässt vermuten, dass sie Teil haben an der Pathophysiologie und dem Outcome der humanen Sepsis. Severe Sepsis ist zumindest zum Teil ein Ergebnis von maladaptiver Zytokinfreisetzung durch die Immunzellen als Antwort auf eine Infektion.

1.3.1 Geschichte der Entdeckung der TLR

Erst 1997 wurden diese Transmembran-Rezeptoren auf der Oberfläche der menschlichen Zellen identifiziert. Viele Jahre zuvor, 1968, entdeckten Sulzer et al. einen Mäusestamm (C3H/HeJ), der kaum eine Antwort auf Injektion von bakteriellen Endotoxine aufwies, während andere Mäuse mit einer letalen Antwort auf eine LPS-Injektion reagierten. Verantwortlich war ein einzelner Gen-Locus (Lps). 1979 identifizierten Vogel et al. einen weiteren Mäusestamm (C57BL/10ScCr), der auch hyporesponsiv gegenüber LPS war. Diese Entdeckungen führten zu Anstrengungen nun auch das Protein zu entdecken, welches durch die Mutationen von Lps beeinträchtigt wird (47).

Schließlich wurde bei Studien mit der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* das Rezeptor-Gen Toll identifiziert. Toll ist essentiell für die Fruchtfliege, indem es die dorso-ventrale

Polarisation während der Embryogenese kontrolliert, sowie die Induktion antimikrobieller Peptide als Antwort auf eine Pilzinfektion steuert.

Das Toll-Genprodukt ist ein TypI Transmembran-Rezeptor mit extrazellulären leucin-reichen Repeats (LRR) und einer intrazellulären Domäne aus etwa 200 Aminosäuren. Aufgrund der beträchtlichen Homologie der zytoplasmatischen Region des Toll-Proteins zu der des Säugetier-Zytokins Interleukin-1 (IL-1), wird diese Region Toll/IL-1 Rezeptor-Domäne, kurz TIR-Domäne, genannt.

Auch die einzelnen Komponenten in der Signalkaskade von Drosophila-Toll (dToll) haben eine signifikante Ähnlichkeit zu den Downstreammediatoren in der IL-1 Rezeptor Kaskade.

Der Ligand von dToll ist die proteolytisch gespaltene Form eines Cystin-knot Proteins namens Spätzle. Dieses hat strukturelle Ähnlichkeiten zu den Wachstumsfaktoren im Säugetier.

Die Aktivierung von dToll erfordert die Teilnahme des intrazellulären Proteins Tube (ähnlich dem MyD88, einem Protein in der menschlichen Toll- und IL-1Rezeptor-Signalkaskade), welches seinerseits die Serin/Threonin-Kinase Pelle (IRAK) aktiviert. Pelle kontrolliert die Degradation von Cactus (IkappaB), welches in einem Komplex mit dem Protein Dorsal in Zytoplasma liegt. Durch diese Degradation kann Dorsal (Transskriptionsfaktor NFkappaB) von Cactus abgespalten werden, in den Kern gelangen und die Transskription der Zielgene regulieren, wie z.B. das antifungale Peptid Drosomycin (TNFalpha, IL-1, IL-6) (40).

Aufgrund der Ähnlichkeiten zur menschlichen IL-1-Rezeptor Kaskade wurde auch nach homologen Sequenzen im menschlichen Genom gesucht. 1996 wurde der erste humane Toll-like Rezeptor, später bekannt als TLR1, von Taguchi et al. geklont (53). 1997 beschrieben Janeway et al. einen weiteren Toll-like Rezeptor (jetzt TLR4) und sie zeigten, dass seine Expression die Aktivierung von NFkappaB und eine Hochregulation von proinflammatorischen Zytokinen induziert (37).

Kurz darauf legten Forschungen die Annahme nahe, dass der Toll-like Rezeptor als Rezeptor für LPS dient (26). So zeigte sich bei den oben erwähnten C3H/HeJ-Mäusen eine Punktmutation im TLR4-Gen verantwortlich für den LPS-hyporesponsiven Phänotyp (33, 34). Die C57BL/10ScCr-Mäuse zeigten sich homozygot für eine Null-Mutation von TLR4 (45, 46, 25). Diese Entdeckungen legten also nahe, dass das Maus-Gen *Lps* identisch ist mit dem TLR4 kodierenden Gen (51).

1.3.2 Beschreibung der einzelnen TLR und ihrer assoziierten Proteine

Bis heute sind 11 TLRs auf der Zell-Oberfläche von menschlichen Zellen identifiziert worden und die meisten wurden funktionell in Bezug auf ihre Ligandenerkennung charakterisiert. Verschiedene Komponenten desselben Bakteriums können durch verschiedene TLR erkannt werden, jedes mit seiner eigenen Mustererkennungs-Spezifität.

Muzio et al. klassifizierten die TLR basierend auf ihr Expressionsschema in „ubiquitous“, „restricted“ und „specific“: TLR1 wird allgegenwärtig auf den untersuchten Zellarten Monozyten, T-Lymphozyten, polymorphonuklearen Zellen (PMN), B-Zellen, Th1- und Th2-Helferzellen und dendritischen Zellen (DC) exprimiert. TLR2, TLR4 und TLR5 sind nur auf Monozyten, PMN und DC zu finden. TLR3 wird exklusiv auf DC exprimiert (40).

Am besten untersucht sind TLR2 und 4. Beide sind auf der Zell-Oberfläche von Monozyten, PMN's und dendritischen Zellen lokalisiert.

TLR2 initiiert eine inflammatorische Reaktion gegenüber Bestandteilen grampositiver Bakterien wie Peptidoglykan, Lipoteichonsäure (LTA), bakt. Lipoproteine, Lipopeptide und Lipoarabimannan. Deletion von TLR2 in Mäusen führt zu Empfänglichkeit gegenüber Infektionen mit grampositiven Bakterien und teilweise gegenüber Staph. aureus (47). TLR2 kann auch heterodimere Strukturen mit anderen TLR-Mitgliedern, wie TLR1 und 6, bilden.

TLR4 dient zusammen mit dem assoziierten MD2-Adaptermolekül und CD14 (cluster of differentiation 14) als Rezeptor für Komponenten der gramnegativen Bakterien, wie LPS. Von mehreren Forschungsgruppen konnte gezeigt werden, dass TLR4 der wichtigste menschliche Sensor für LPS ist.

Erwähnenswert ist noch, dass auch schon LTA-induzierte TLR4-Aktivierung berichtet wurde, ebenso wie eine LPS-induzierte Aktivierung von TLR2 (4).

CD14 ist ein membrangebundenes Glykoprotein, welches an der Zelloberfläche von Makrophagen, Monozyten und in geringerem Ausmaße auch an der Zelloberfläche von PMN verankert ist. Es ist fähig mikrobielle Moleküle wie LPS mit seiner extrazellulären PRR-Domäne zu erkennen, hat aber keine transmembrane Domäne, die ihr ermöglichen würde selbst ein proinflammatorisches Signal zu produzieren. Diese Aufgabe übernimmt TLR4 in Assoziation mit CD14. In vitro-Versuche zeigen, dass eine Cotransfektion mit CD14 die TLR4 initiierte Antwort steigert (12). Dies geschieht, indem eine hohe lokale Konzentration des Liganden durch dessen Immobilisation erreicht wird (47). Außerdem steigt die Rezeptordichte von TLR4 lokal durch die Bindung von bakteriellen Bestandteilen an LPS (47). Auch einige TLR2-Liganden benutzen CD14 als erste Andockstelle.

Das **MD-2**-Adaptermolekül ist ein sezerniertes Protein, welches für die TLR4 vermittelte Antwort auf LPS benötigt wird. Dziarski et al. beschrieben, dass auch TLR2 mit MD-2 assoziieren kann, diese Bindung aber schwächer ist als die zu TLR4. MD-2 ermöglicht TLR4 und TLR2 mit einer höheren Sensitivität sowohl auf LPS als auch auf LTA zu antworten und überdies ihre Responsivität gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien zu steigern (19).

Zusätzlich wird noch ein Serumfaktor in Form des LPS-bindenden Proteins (LBP) oder alternativ lösliches CD14 (sCD14) benötigt, um das LPS-Molekül zum Oberflächenrezeptor CD14 zu transportieren. TLR4 und MD-2 sind konstitutiv assoziiert, während CD14 erst nach Bindung mit LPS zu dem Rezeptorkomplex rekrutiert wird (15, 57).

Andere TLR, wie TLR3, TLR7 und TLR9 sind nicht auf der Zelloberfläche, sondern intrazellulär lokalisiert. Sie sind involviert in die Erkennung von Nukleinsäure-ähnlichen Strukturen (31, 38).

1.3.3 Signalkaskade

Wird z.B. durch LPS die Signalkaskade ausgelöst, geschieht folgendes: Die Stimulation von TLR triggert die Assoziation von MYD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88), welche IRAK4 (IL-1R-associated kinase 4) rekrutiert und dabei die Assoziation von IRAK1 möglich macht. IRAK1 wird phosphoryliert und rekrutiert auch TRAF6 (tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6) zu dem Rezeptorkomplex. Die phosphorylierten IRAK1 und TRAF6 dissoziieren und bilden ihrerseits einen Komplex mit TAK1 (transforming-growth-factor-beta-activated kinase), TAB1 (TAK1-binding protein 1) und TAB2. Der Komplex wandert ins Zytosol, wo er mit zwei Enzymen reagiert, was zur Abspaltung von TRAF6 und damit zur Aktivierung von TAK1 führt. TAK1 phosphoryliert den IKK-Komplex (inhibitor of nuclear faktor-kappaB-kinase (IkappaB) complex). Dieser phosphoryliert IkappaB, woraus die Freisetzung des Transkriptionsfaktor NFkappaB folgt. Dieser kann nun in den Zellkern wandern und die Bildung und Freisetzung einer großen Anzahl von Zytokinen wie TNFalpha, IL-10 und IL-6 induzieren. (Siehe Abbildung 1.)

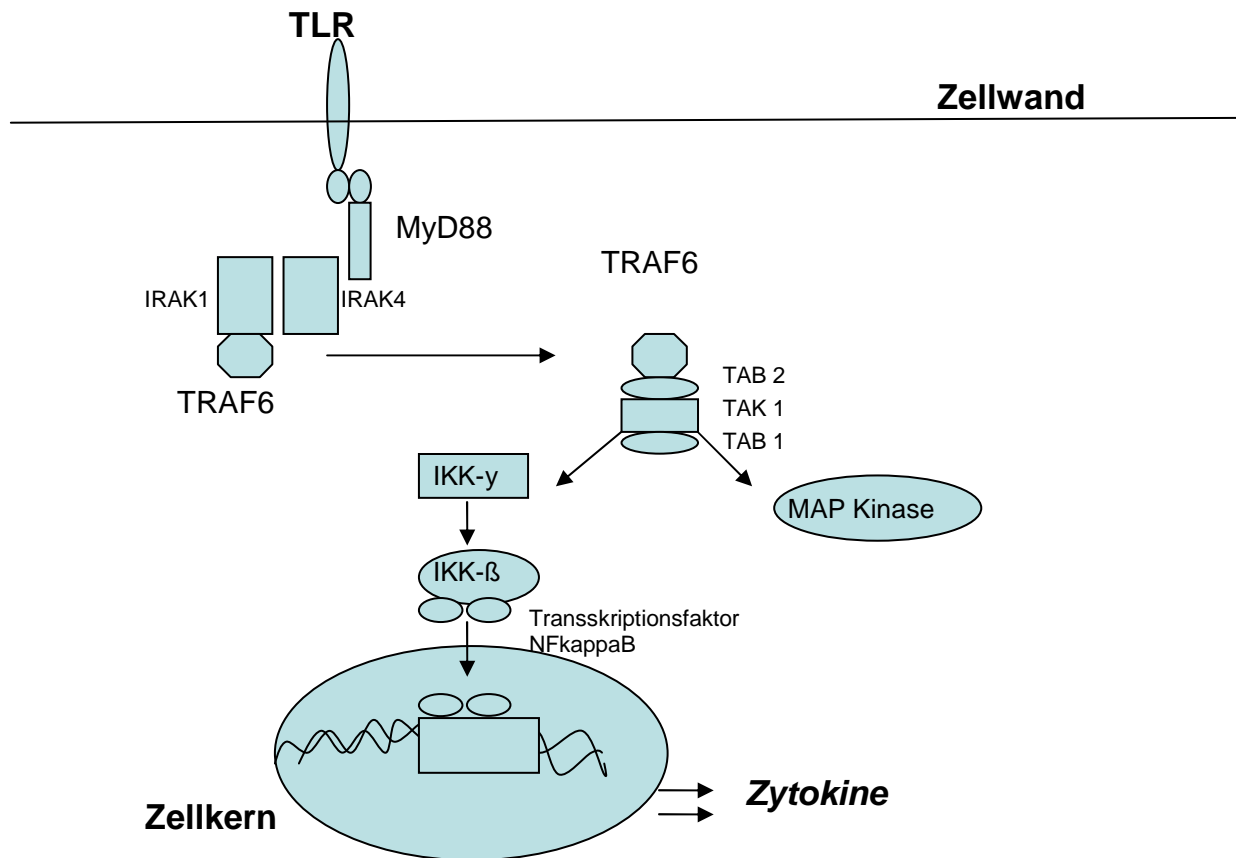


Abbildung 1: TLR-Signalkaskade

Anstatt über NFκappaB kann die Signalkaskade auch über die Stimulation von Mitgliedern der MAP-Kinasen und der Transskriptionsfaktoren jun und fos zu einer Immunantwort führen. Es gibt auch MyD88-unabhängige Signalkaskaden. Bei TLR4 und TLR2 kann NFκappaB auch durch das Adapterprotein TIRAP aktiviert werden. Für TLR3 kann eine antivirale Interferon-beta Antwort durch TICAM-1 ausgelöst werden (1, 7, 40, 57).

1.3.4 Endotoxin-Toleranz

Der Begriff „Endotoxin-Toleranz“ beschreibt die Beobachtung, dass eine zweite Endotoxin-Stimulation nach Vorexposition mit demselben Endotoxin eine konsekutive Suppression von Zytokinen bewirkt. Die bakterielle Sepsis führt zu einer sekundären Immunsuppression. Typisch hierfür ist die Endotoxintoleranz. Hierdurch wird klinisch die erhöhte Existenz von sekundären Infektionen bei der Sepsis erklärt.

Die Pathogenese der Endotoxin-Toleranz besteht aus zwei Phasen. Einer frühen Phase mit veränderter zellulärer Aktivierung und einer späten Phase mit der Entwicklung spezifischer Antikörper gegen Bestandteile der Endotoxine (20, 61). Neben dem meist untersuchten Stimulus LPS kann eine Toleranz u.a. auch durch LTA (32), TNF (44) und IL-10 (6) induziert

werden. Die Endotoxin-Toleranz wurde ursprünglich in Tierversuchen entdeckt. Hier wurde aufgrund einer Vorbehandlung mit LPS die Verabreichung einer letalen Dosis LPS überlebt (49). Der Ursprung der veränderten zellulären Antworten scheint in Änderungen in der auf eine Endotoxin-Stimulation folgende Signalkaskade begründet zu sein, dessen wichtiger Bestandteil die Toll-like Rezeptoren sind (61). Der exakte Mechanismus, der die LPS-induzierte Endotoxintoleranz auf Monozyten reguliert, ist noch nicht ausreichend geklärt (21). Jedoch gibt es Hinweise, dass Toleranz zumindest teilweise auf der Basis von Änderungen in der Expression von TLR erklärt werden könnte (21, 33, 42, 50).

1.4 Fragestellung

Wenig ist über den Einfluss der TLR-Regulation während des Verlaufs einer Sepsis bekannt. Im Gegensatz zu Daten, die eine TLR-Downregulation nach LPS-Gabe *in vitro* beschreiben, ist polymikrobielle murine Sepsis assoziiert mit angestiegener TLR4-Protein Expression auf der Oberfläche von Zellen, was mit Mortalität korreliert (62). In der humanen Sepsis fanden Härter et al. eine angestiegene Protein-Expression von TLR2 und TLR4 auf Blut-Neutrophilen und –Monozyten (21). Armstrong et al. demonstrierten angestiegene TLR2 und TLR4 mRNA in Blutmonozyten von Sepsispatienten (5). Daten zur TLR-Expression in Assoziation zum klinischen Outcome fehlen zu diesem Zeitpunkt noch.

Im Gegensatz dazu wurde im murinen Modell schon ein Zusammenhang zwischen LPS-Toleranz (=Monozytenhyporesponsivität) und Downregulation des TLR4-MD2-Rezeptorkomplexes nachgewiesen (50), sowie eine Korrelation von downregulierter TLR4-Expression mit einem Abfall von inflammatorischen Zytokinen (42). In der humanen Sepsis konnte jedoch eine mit der Regulation von TLR assoziierte Monozytenhyporesponsivität noch nicht nachgewiesen werden.

Wir nehmen daher an, dass die humane Sepsis mit einer Downregulation von TLR2 und/oder TLR4 während des Verlaufs der Krankheit assoziiert ist, was ursächlich für eine Monozytenhyporesponsivität ist.

In dieser Studie wurde daher die TLR2-, TLR4- und CD14-Expression auf Blutmonozyten von Patienten mit Sepsis und gesunden Probanden verglichen. Bei den Sepsispatienten wurde die TLR2-, TLR4- und CD14- Expression zu vier verschiedenen Zeitpunkten verglichen und Beziehung zur Sepsisschwere gesetzt. Um die funktionale Relevanz der Rezeptor-Expression zu evaluieren, korrelierten wir die TLR-Expression mit der Zytokinfreisetzung nach Stimulation mit LPS und LTA in Vollblutassay.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

| | Firma | Zubereitung/ Anmerkung |
|---|--------------------------|-------------------------------|
| Zellisolierung MNK | | |
| Chemikalien | | |
| Bicoll/Ficoll | Biochrome | |
| 1*PBS | Dubeccos | |
| 2*PBS | Dubeccos | |
| Polyvinylalkohol | Merck | Polyvinylalkohol + NaCl |
| endotoxinfreies RMPI- Medium 1640 | Biowhittaker | |
| 10µl Triptanblau | Sigma | für Vitalitätstest |
| Geräte | | |
| 10ml Spritzen | Becton Dickinson | + 2ml 3,8% Natrium Citrat |
| Zentrifuge | Hetich, Rotina 35 | |
| 50ml Röhrchen | Greiner | |
| Pipetten | Eppendorf Research | |
| Plastikpasteurpipette | Sarstedt, USA | |
| 15ml Röhrchen | Greiner | |
| Neubauerzählkammer | Brand | |
| 24-well tissue plates | Biochrome, Berlin | |
| <hr/> | | |
| | Firma | Zubereitung/ Anmerkung |
| Zellkultur MNK | | |
| Chemikalien | | |
| RMPI- Medium 1640 | Biowhittaker, Belgien | |
| Lipopolysaccharid (LPS), 1µg/ml, E. coli, Serotyp 026:B6 | Sigma, St. Louis, USA | 40µl LPS + 960µl Medium |
| 1*PBS | Dubeccos | |
| Geräte | | |
| 50ml Zellkulturflaschen | Greiner | |
| Brutschrank | Heto, Cell House200 | |
| Vortexer | NeoLab | |

| | |
|--------------------|--------------------|
| Eppendorf-Küvetten | Sarstedt, USA |
| Zentrifuge | Hettich, Rotina 35 |
| Einwegzellkratzer | Sarstedt, USA |
| 50ml Röhrchen | Greiner |
| 15ml Röhrchen | Greiner |

| | Firma | Zubereitung/ Anmerkung |
|--|------------------------------|-------------------------------|
| Antikörpermarkierung und FACS-Messung MNK | | vor und nach Zellkultur |
| Chemikalien | | |
| Isotyp IgG2a | eBioscience, San Diego, USA | |
| TLR2-Antikörper 5µl | eBioscience | |
| TLR4-Antikörper | eBioscience | |
| CD14-Antikörper | eBioscience | |
| Isotyp IGg2a | eBioscience | |
| 1*PBS | Dubeccos | |
| FACS-Puffer | Sigma | 1% BSA, 0,01% Natrium Acide |
| Geräte | | |
| Facs-Röhrchen | Falcon | |
| Vortexer | NeoLab | |
| Kühlschrank | Bosch | |
| Zentrifuge | Hettich, Rotina 35 | |
| FACS-Scan | Becton Dickinson, Heidelberg | FACS Calibur |
| CellQuest Software | Becton Dickinson | |

| | Firma | Zubereitung/ Anmerkung |
|--------------------------------|--------------|--|
| <u>Vollblut – Assay</u> | | |
| Chemikalien | | |
| RPMI-Medium 1640 | Biowhittaker | + 5 ml Penicillin/ Streptomycin, + 5 ml L-Glutamin |
| Penicillin / Streptomycin 1% | Gibco | 5 ml / 500ml Medium |

| | | |
|---|--------------------------------|-------------------------|
| Lipopolysaccharid (LPS), 1µg/ml, E. coli, Serotyp 026:B6 | Sigma, St. Louis, USA | 40µl LPS + 960µl Medium |
| Lipoteichoic Acid (LTA), 100 µg/ml, Staph. aureus | Sigma L2515, St. Louis, USA | unverdünnt |

Geräte

| | |
|----------------------------------|---------------------|
| Monovetten, Lithium-Heparin, 5ml | Sarstedt |
| Pipetten, Combitips (100-1000µl) | Eppendorf |
| Polypropylen-Röhrchen, 5 ml | Greiner |
| Brutschrank | Heto, Cell House200 |
| Gefriertruhe Nuair | Zapf Instrumente |
| Multipipette | Eppendorf |
| Vortexer | NeoLab |
| 15ml Röhrchen | Greiner |
| Eppendorf-Küvetten | Sarstedt, USA |
| Zentrifuge | Hettich, Rotina 35 |

| | Firma | Zubereitung/ Anmerkung |
|--|--------------|-------------------------------|
|--|--------------|-------------------------------|

ELISA

| | |
|---------------------------------|---------------------|
| Immunoassay Kit, Human IL-10 | BioSource, Solingen |
| Immunoassay Kit, Human IL-6 | BioSource |
| Immunoassay Kit, Human TNFalpha | BioSource |

Geräte

| | | |
|--------------------|--------------------|--------------|
| Elisa-Reader | SLT Instruments | SLT 340 ATTC |
| Pipetten | Eppendorf Research | |
| Eppendorf-Küvetten | Sarstedt, USA | |

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten der Studie, Ein- bzw. Ausschlusskriterien

Zwischen 09/2003 und 10/2004 haben wir 29 Sepsispatienten aufgenommen und prospektiv untersucht. Die Patienten erhielten wir (durch tägliche Anfrage) von den internistischen Intensivstationen 11a, 12a und der chirurgischen Intensivstation 37a des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Die Patienten wurden noch innerhalb der ersten 24h nach Aufnahme untersucht und eingeschlossen.

Die Patienten wurden nach folgenden Kriterien in die Studie aufgenommen.

Einschlusskriterien:

Eingeschlossen wurden Patienten, die nach der Definition des „American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine“ die Kriterien einer Sepsis, severe Sepsis oder eines septischen Schocks, MODS erfüllen. Die Patienten mussten volljährig sein.

Ausschlusskriterien

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

2.2.2 Probanden der Studie

16 männliche Kontrollprobanden mit einem Durchschnittsalter von 28,7+6,6 Jahren wurden in unsere Studie eingeschlossen. 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 zur 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: Bedeutung der TLR-medierte Aktivierung des Immunsystems für die Funktion und Dysfunktion der autonomen und endokrinen Abwehrmechanismen in der Sepsis
AZ: 03-041, Erstantrag: 27.05.2003

2.2.4 Erfassung klinischer Daten und Einteilung der Patienten

Die klinischen Daten der Patienten wurden zu den definierten Zeitpunkten erfasst. Zum Aufnahmezeitpunkt, nach 24h, 72h und nach sieben Tagen wurden Blutdruck, Herzfrequenz, Temperatur, Atemfrequenz, FiO₂, relevante Laborparameter, Glasgow Coma Scale, Beatmungsstatus, sowie aufgetretene Komplikationen, klinische und apparative Untersuchungsbefunde und die medikamentöse Therapie incl. eventuelle Katecholamingabe protokolliert. Außerdem wurden die Mortalität und die Intensiv- und Krankenhausaufenthaltsdauer, sowie zum Aufnahmezeitpunkt potentielle Risikofaktoren und begleitende chronische Grunderkrankungen erfasst.

Folgende Risikofaktoren und chronische Grunderkrankungen wurden protokolliert: Alter, Geschlecht, chronische Herzerkrankungen (Koronare Herzerkrankung, Herzinsuffizienz) chronische Lungenerkrankungen (Asthma bronchiale, chronisch obstruktive Lungenerkrankung), chronische Niereninsuffizienz, chronische Lebererkrankungen, Diabetes mellitus, chronische neurologische Erkrankungen (Krampfleiden, Demenz, cerebrovaskuläre Erkrankungen).

2.2.4.1 Erfassung des Schweregrades der Infektion

Die Klassifikation des Sepsis-Schweregrades zur Einteilung der Patienten haben wir anhand der Definition des *American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine* Konsensus Konferenz 1992, angepasst durch Bone 1997, durchgeführt (10, 11).

Da das klinische Bild einer Sepsis auch in der Abwesenheit einer Infektion entstehen kann, wie z.B. bei Pankreatitis, Ischämie und multiplen Traumata, wurde von der „Society of Critical Care Medicine and American College of Chest Physicians“ der Begriff „**systemic inflammatory response syndrome**“ (SIRS) geprägt. SIRS beschreibt danach den systemischen inflammatorischen Prozess unabhängig von seiner Ursache.

„**Sepsis**“ ist demgegenüber eine systemische inflammatorische Antwort auf eine Infektion. Die zu erfüllenden klinischen Manifestationen für die Diagnosestellung sind für SIRS und Sepsis identisch. Mindestens zwei der folgenden Bedingungen müssen erfüllt sein:

Temperatur > 38 oder < 36 °C

Herzfrequenz > 90 Schläge/ Min

Atemfrequenz > 20 oder $P_{CO_2} < 32$ mm Hg

Leukozyten > 12.000/ mm³ oder < 4.000/ mm³

Die Änderungen der physiologischen Messwerte sollten dabei akute Abweichungen vom Normalzustand in der Abwesenheit anderer bekannter Gründe für diese Abnormalitäten sein. Ist eine Infektion Ursache der Erkrankung sind die Begriffe SIRS und Sepsis gleichbedeutend. Die schwere Sepsis, „**severe Sepsis**“, ist definiert als Sepsis mit Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotension. Zu der Organdysfunktion zählen akute Niereninsuffizienz (Anstieg der Retentionswerte, Oligurie, Anurie), Leberinsuffizienz (Anstieg der Leberenzyme, Gerinnungsstörungen als Zeichen einer gestörten Lebersynthese), disseminierte intravasale Gerinnung, akute ZNS-Störung (Bewusstseinsstörungen bis zum Koma) oder Lungenversagen (ARDS). Hypotonie ist definiert als systolischer Blutdruck <90 mmHg oder Blutdruck-Reduktion >40 mmHg mit Stabilisierung des Blutdrucks nach Flüssigkeitsgabe. Zu Hypoperfusion kann Laktatazidose, Oligurie oder eine akute Änderung des mentalen Status gehören.

Der „**septische Schock**“ ist eine severe Sepsis mit einer sepsisinduzierten Hypotonie trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution, so dass eine Katecholamintherapie notwendig wird.

Der Begriff „**multiple organ dysfunction syndrome**“ (MODS) bezeichnet die Anwesenheit mehrerer Organdysfunktionen, so dass die Homöostase ohne Intervention nicht sichergestellt werden kann. Die „Society of Critical Care Medicine and American College of Chest Physicians“ unterscheidet hier zwischen primärem MODS, als direktem Ergebnis, und dem sekundären MODS, als Konsequenz auf die inflammatorische Antwort des Wirtes.

Entsprechend dieser Einteilung haben wir den Zustand der Patienten zum Aufnahmezeitpunkt, nach 24h, 72h und nach 7 Tagen bestimmt.

2.2.4.2 Einteilung der Patienten in zwei Gruppen

Für die Auswertung wurden die Patienten dann in zwei Gruppen eingeteilt. „Sepsis“ und „schwere Sepsis“ wurden zu Schweregrad A zusammengefasst und „septischer Schock“ und „MODS“ zu Schweregrad B.

2.2.4.3 APACHE II und APS

Als prognostisches System haben wir am Aufnahmetag den APACHE (Acute Physiology, Age, Chronic Health Evaluation) II Score verwendet. 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 der Acute Physiology Score (APS), eine Bewertung des Alters des Patienten, sowie die Bewertung chronischer Vorerkrankungen ein. Der APS setzt sich zusammen aus einer Bewertung von 12 routinemäßig erfassten, physiologischen Parametern und dem Glasgow Coma Scale, letzter als Instrument zur Erfassung der neurologischen Funktion. Der ansteigende Score ergibt dann einen Rang von 0 bis 71. 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 (29). Abbildung 2 zeigt den verwendeten APACHE II Score.

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

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

| 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, O2 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 |
| | | |

| APS | | | | | | | | | | |
|--|--------|------|----------|---------|----------|-----------|---------|-----------|-----------|---------|
| Parameter | Punkte | +4 | +3 | +2 | +1 | 0 | +1 | +2 | +3 | +4 |
| Temp. | | ≥41 | 39-40,9 | | | 38,5-38,9 | 36-38,4 | 34-35,9 | 32-33,9 | 30-31,9 |
| mittlerer art. Druck ¹ | | ≥160 | 130-159 | 110-129 | | 70-109 | | 50-69 | | ≥49 |
| Herzfrequenz | | ≥180 | 140-179 | 110-139 | | 70-109 | | 55-96 | 40-54 | ≤39 |
| Atemfrequenz | | ≥50 | 35-49 | | 25-34 | 12-24 | 10-11 | 6-9 | | ≤5 |
| A-aDO ₂ o. PaO ₂ : | | | | | | | | | | |
| a) FiO ₂ ≥ 0,5 A-aDO ₂ ² | | ≥500 | 350-499 | 200-349 | | <200 | | | | |
| b) FiO ₂ < 0,5 PaO ₂ | | | | | | >70 | 61-70 | | 55-60 | <55 |
| art. pH | | ≥7,7 | 7,6-7,69 | | 7,5-7,59 | 7,33-7,49 | | 7,25-7,32 | 7,15-7,24 | <7,15 |
| Serum HCO ₃ ³ | | ≥52 | 41-51,9 | | 32-40,9 | 22-31,9 | | 18-21,9 | 15-17,9 | <15 |
| Natrium (Serum) | | ≥180 | 160-179 | 155-159 | 150-154 | 130-149 | | 120-129 | 111-119 | ≤110 |
| Kalium (Serum) | | ≥7 | 6-6,9 | | 5,5-5,9 | 3,5-5,4 | 3-3,4 | 2,5-2,9 | | <2,5 |
| Creatinin (Serum) ⁴ | | ≥3,5 | 2-3,4 | 1,5-1,9 | | 0,6-1,4 | | <0,6 | | |
| Hk | | ≥60 | | 50-59,9 | 46-49,9 | 30-45,9 | | 20-29,9 | | <20 |
| Leukozyten | | ≥40 | | 20-39,9 | 15-19,9 | 3-14,9 | | 1-2,9 | | <1 |
| 15 - Glasgow Coma Score | | | | | | | | | | |
| APS (gesamt) | | | | | | | | | | |

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

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

² PA₀₂=FI₀₂ x (P_B-P_{H2O})-(PaCO₂/RQ) = FI₀₂ x713 - PaCO₂/0,8; A-aDO₂= PA₀₂ - 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

Patienten

Es wurden bei den Patienten vier Blutentnahmen durchgeführt:

Bei Aufnahme in die Studie und an den folgenden drei Zeitpunkten wurde den Patienten jeweils ca. 40 ml Blut abgenommen. Hierfür wurden Lithium-Heparin Monovetten und 10ml Spritzen mit 2ml 3,8% Natrium-Citrat verwendet.

30ml Natriumcitratblut wurden für die PBMC-Isolierung verwendet, welcher schließlich die Quantifizierung der PRR-Expression mittels FACS-Scan Messung folgte.

2,6 ml Lithium Heparin Blut wurden in den Vollblutassay für spätere Zytokinbestimmung mittels ELISA eingesetzt.

Probanden

Gesunden Probanden (n=13) wurde venöses Blut entnommen. Es wurde die Expression von TLR2, -4 und CD14 mittels Flow Cytometrie gemessen.

2.2.6 Zellisolierung

Zuerst wurden die MNK aus 30ml Natriumcitratblut durch Ficoll Dichtegradient-Zentrifugation unter sterilen Bedingungen isoliert. Dazu wurde das Natriumcitratblut mit 1*PBS im Verhältnis 1:2 in einem sterilen Becherglas gemischt. Das verdünnte Blut wurde nun im Verhältnis 1:4 mit einer Pipette vorsichtig auf das in zwei 50ml Röhrchen befindliche Bicoll/Ficoll geschichtet. Anschließend wurden die beiden Röhrchen für 20min bei 1600rpm zentrifugiert.

Die **MNK** befanden sich nach der Zentrifugation aufgrund ihrer Dichte im oberen Ring des Überstandes. Dieser wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein 50ml Röhrchen überführt. Dieses wurde mit 1*PBS aufgefüllt, gemischt und für 10min bei 1600rpm zentrifugiert. Der Überstand der gewaschenen MNK wurde abgesaugt und das klare Zellpellet in Medium resuspendiert. Waren noch Erythrozyten im Pellet enthalten, wurde noch ein Schritt zum Lysieren der Erythrozyten vor die Resuspendierung gesetzt. Zum Lysieren wurde das Pellet in 1ml H₂O resuspendiert. Nach Zugabe weiterer 4ml und kurzen Schwenkens, wurden 5ml warmes 2*PBS hinzugegeben. Nach Zentrifugation und Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in definierter Menge Medium 1640 aufgenommen.

Aus der Zellsuspension wurde dann ein Cytopräparat hergestellt, die Zellzahl in der Zählkammer bestimmt und ein Vitalitätstest gemacht.

Ein Teil der MNK-Zellsuspension wurde nun für die FACS-Messung mit Antikörpern markiert und anschließend gemessen.

2.2.8 Flowzytometrische Messung

Der nächste Schritt war die flowcytometrische Messung der antikörpermarkierten, isolierten MNK. Die Messung fand *in vivo*, direkt nach der Isolierung statt.

2.2.8.1 Flowzytometrie

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse, auch Facs-Scan (fluorescence activated cell separation) genannt, ist ein quantitatives Verfahren, welches auf Einzellzebene sowohl morphologische Eigenschaften von Zellen, als auch Fluoreszenz erfassen kann.

Hämatopoetische Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche zahlreiche Proteine. Diese Antigene können durch monoklonale Antikörper detektiert werden. Sind diese Antikörper mit einem Farbstoff konjugiert, ist das Flowcytometer in der Lage über die Fluoreszenzintensität die Antigenmenge pro Zell zu quantifizieren.

Die Zellen werden zunächst durch hydrodynamische Fokussierung in Einzellzellsuspension gebracht. Die Zellsuspension wird im Probenstrom aus dem Probenreservoir angesaugt. Um diesen herum fließt der Mantelstrom, der eine schnellere Fließgeschwindigkeit aufweist und damit die Zellsuspension in Einzelzelltröpfchen aufteilt. Die Zellen strömen einzeln hintereinander durch eine dünne Kapillare. Hier werden die Farbstoffe durch einen Argon-Ionen-Laser (488nm) zur Emission von Licht bestimmter Wellenlänge angeregt. Diese Emissionen werden durch Photomultipler elektronisch verstärkt und anschließend von Detektoren erfasst. Die Messwerte werden digitalisiert und mit der CellQuest Software von Becton Dickinson ausgewertet.

Um nur die Zellen einer bestimmten Zellpopulation zu untersuchen, wird zusätzlich zur Fluoreszenz noch die Streuung des Laserlichts durch die Zelle gemessen. Anhand des Streulichts können Aussagen über die Größe und die Granularität der Zelle gemacht und so einer Zellpopulation zugeordnet werden. Das in einem geringen Winkel reflektierte Licht (2-20°) wird als Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter, FSC) bezeichnet. Es korreliert mit der

Zellgröße und dem Brechungsindex, während das im rechten Winkel gestreute „Seitwärtsstreulicht“ (engl. side scatter, SSC) mit der Granularität der Zellen korreliert. Durch die Korrelation von FSC und SSC kann eine morphologische Beurteilung stattfinden. Die Signale werden in einem x/y-Diagramm auf dem Monitor dargestellt und erlauben die Eingrenzung der Fluoreszenzmessung (Gating) auf die zu untersuchende Zellpopulation.

In dieser Studie wurden mit Fluoreszenzfarbstoff PE (Phycoerythrin) markierte Antikörper gegen Toll-like Rezeptor2, Toll-like Rezeptor4 und Oberflächenantigen CD14 verwendet, um die Expression dieser Antigene auf der Zelle zu quantifizieren. Die Daten werden in der Einheit Mean Fluoreszenz Intensität (MFI) angegeben.

Alle für diese Arbeit durchgeführten Messungen wurden am FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, USA) durchgeführt.

Für die Messung wurde in 8 Facsröhrchen 100µl MNK-Zelllösung (10mio/ml) pipettiert. Je 5µl Antikörper (Isotyp IGg2a, TLR2-, TLR4, CD14-Antikörper) wurden in die entsprechenden Röhrchen pipettiert. Nach dem Vortexen wurde eine Inkubationszeit von 20min im Kühlschrank eingehalten. Anschließend wurden 2ml Facs Puffer zugegeben, für 5min bei 1800rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in 200-300µl FACS-Puffer aufgenommen und anschließend wurde im Flowzytometer die Expression von TLR2, TLR4 und CD14 gemessen.

2.2.9 Bestimmung des IL-10, IL-6 und TNFalpha Spiegels im Vollblutüberstand nach Stimulation

2.2.9.1 Vollblut-Assay

Der Vollblut-Assay beruht auf der Inkubation von vollständigem Blut unter Zugabe eines (Nähr-) Mediums und eines Antigenstimulus, wie in diesem Fall Lipopolysaccharid (LPS) oder Lipoteichonsäure (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. beschreiben durchgeführt (17). In sterile 5 ml Polypropylen-Röhrchen wurde je 850 µl RPMI-Medium (1640) und je 50 µl LPS (enthält 1µg LPS) bzw. LTA (100µg) als Stimulus gegeben. Danach wurde in jedes Röhrchen 100µl Blut aus der Lithium-Heparin-Monovette gegeben. Zusätzlich wurden Negativkontrollen ohne

Stimulantien angefertigt. Die Herstellung der Ansätze wurde steril unter der Werkbank durchgeführt. Nach sorgfältiger Vermischung wurden dann die Ansätze bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Inkubation wählten wir einen Zeitraum von 24 Stunden, was sich bei vorausgehenden Studien unserer Arbeitsgruppe für die Zytokinmessung als optimal gezeigt hat (16). Anschließend wurden die zellfreien Überstände abpipettiert, in sterile Eppendorf-Gefäße gegeben und bis zur Zytokinmessung bei – 80° C eingefroren.

2.2.9.2 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 (Zytokin) fest beschichtet. Standardverdünnungen mit bekannten Zytokinkonzentrationen und die zu messenden Proben werden auf die Testplatte aufgetragen. Die in Proben/ Standards enthaltenen Zytokine binden während der ersten Inkubationszeit an die spezifischen Antikörper. Ungebundenes Material wird 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 der im Überschuss hinzugefügte enzymmarkierte Sekundärantikörper an den Antigen-Antikörper-Komplex in der Mikrotiterplatte. Nach der dritten Inkubationszeit und anschließendem Waschvorgang wird die Substratlösung zugegeben. Durch das Enzym wird das Substrat in einer Farbreaktion umgewandelt. Diese Farbreaktion wird durch Zugabe einer Säure beendet. Bei 450nm wird daraufhin die Absorption im Photometer gemessen. Die Intensität der Farbentwicklung ist dabei direkt proportional zur Antigenkonzentration in der Probe.

Alle Proben und Standards werden 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.

Zur Bestimmung der IL-10, IL-6 und TNF Konzentration im Vollblut-Überstand wurden kommerzielle ELISA Kits der Firma BioSource International verwendet.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen wurden mit Statistica 5.1 (StatSoft Inc. 1997, Tulsa USA) durchgeführt. Die ganze Studie hindurch benutzten wir nonparametrische Statistik. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben, p Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Den Mann-Whitney-U-Test verwendeten wir zur Berechnung von unabhängigen, nicht-parametrischen Proben. Mit dem Wilcoxon signed rank Test stellten wir Vergleiche innerhalb einer Gruppe an und für Korrelationen verwendeten wir Spearmans rank correlation.

3. Ergebnisse

3.1 Klinische und demographische Daten der Patienten

Wir haben 29 Patienten mit Sepsis untersucht, von denen 15 Patienten männlich und 14 weiblich waren. Die Patienten hatten ein Durchschnittsalter von 68,55 Jahren mit einer Standardabweichung von $\pm 11,8$ Jahren. Der Sepsis lag bei 14 Patienten eine Pneumonie, bei 8 Patienten eine Urosepsis, bei 2 Patienten eine Meningitis zugrunde. Bei 3 Patienten lag der Focus gastrointestinal, ein Patient wurde mit Endokarditis und 1 Patient mit Phlegmone als Sepsisfocus eingeschlossen. Bei 16 Patienten ließ sich der Erreger durch eine positive Blutkultur nachweisen.

Für jeden Patienten wurden zu jedem Zeitpunkt der Sepsisscore ermittelt. 5 hatten eine Sepsis, 5 eine severe Sepsis, 12 hatten einen septischen Schock entwickelt und 7 Patienten ein Multiorganversagen MODS. Nach sieben Tagen hatten 5 Patienten eine Non-Sepsis. 3 Patienten starben innerhalb der ersten 7 Tage; innerhalb der ersten 28 Tage verstarben insgesamt 8 Patienten.

Wir beobachteten folgende Komplikationen: 19 Patienten mussten künstlich beatmet werden, 19 Patienten zeigten ein septisches Kreislaufversagen, so dass eine Behandlung mit Katecholaminen notwendig wurde, bei 12 Patienten trat ein akutes Nierenversagen auf und bei 7 eine Gerinnungsstörung. Insgesamt entwickelten 11 Patienten mehr als eine septische Komplikation.

Demographische Daten der Patienten, begleitende Grunderkrankungen bzw. Risikofaktoren, sowie aufgetretene Komplikationen sind in **Tabelle 1** zusammengefasst. **Tabelle 2** zeigt den APS und APACHE II Score, das CRP-Maximum, das erreichte Leukozyten- und Fiebermaximum, sowie die durchschnittliche Intensivstations- und Krankenhausaufenthaltsdauer des Gesamtkollektivs

| | |
|-----------------------------|--------------|
| Patienten insgesamt | 29 |
| Alter in Jahren | 68,55 ± 11,8 |
| Geschlecht | |
| männlich | 14 (48,28) |
| weiblich | 15 (51,72) |
| Erregernachweis: | |
| Pos. Blutkultur | 16 (55,17) |
| Diagnose: | |
| Pneumonie | 14 (48,3) |
| Urosepsis | 8 (27,6) |
| Meningitis | 2 (6,9) |
| Gastrointestinal | 3 (10,3) |
| Endokarditis | 1 (3,45) |
| Phlegmone | 1 (3,45) |
| Sepsisscore: | |
| sept. Syndrom | 5 (17,2) |
| severe Sepsis | 5 (17,2) |
| sept. Schock | 12 (41,4) |
| MODS | 7 (24,1) |
| Chron. Erkrankungen: | |
| KHK/ Herzinsuffizienz | 8 (27,6) |
| Niereninsuffizienz | 11 (37,9) |
| neurologische Erkrankung | 4 (13,8) |
| Asthma/ COPD | 9 (31,0) |
| Diabetes mellitus | 7 (24,1) |
| Komplikationen: | |
| Sept. Kreislaufversagen | 19 (65,5) |
| akutes Nierenversagen | 12 (41,4) |
| Beatmung | 19 (65,5) |
| Gerinnungsstörung | 7 (24,1) |
| Tod innerhalb 28d | 8 (27,6) |
| ≤1 sept. Komplikation | 5 (17,2) |

Tabelle 1: Demographische Daten, positiver Erregernachweis, Diagnosen, Einteilung nach Sepsisscore, Grunderkrankungen und beobachtete Komplikationen der Patienten; absolute Zahlen und relative Zahlen () bezogen auf das Patientenkollektiv.

| | Mean | ±Std.Dev. |
|---------------------------|--------|-----------|
| APS max. | 21,55 | ± 7,50 |
| APACHE max. | 30,86 | ± 9,72 |
| CRP max. (mg/l) | 211,05 | ± 102,22 |
| Leukozyten max. (/µl) | 30,71 | ± 21,05 |
| Temperatur max. (°C) | 38,52 | ± 1,17 |
| Dauer Intensivstation (d) | 14,96 | ± 21,95 |
| Dauer Krankenhaus (d) | 26,17 | ± 23,96 |

Tabelle 2: APS und APACHE II Score, CRP-Maximum, Leukozyten- und Fiebermaximum, sowie durchschnittliche Intensivstations- und Krankenhausaufenthaltsdauer des Gesamtkollektivs (Mittelwert ± Standardabweichung).

3.2 Klinische Daten der Patientengruppen, Sepsis-Schweregrad und klinischer Verlauf

Die Patienten wurden von uns in zwei Schweregrade eingeteilt. In Schweregrad A fallen die Patienten mit Sepsis oder schwerer Sepsis (nach der Definition des *American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine* Konsensus Konferenz 1992, angepasst durch Bone 1997) und in Schweregrad B die Patienten mit septischem Schock oder MODS. APS und APACHE II Score, als auch die klinischen Daten der Patienten in ihren jeweiligen Schweregraden sind in **Tabelle 3** dargestellt. Hier wird deutlich, dass die beiden Schweregrade sich signifikant im APACHE II Score und APS unterscheiden. APS und APACHE II korrelieren also, wie in der Literatur bekannt, mit dem Schweregrad der Sepsis (Mann-Whitney-U-Test, APACHE/APS alle Zeitpunkte $p < 0,001$ APACHE/APS max $p < 0,01$). Bei den untersuchten laborchemischen Entzündungsparametern CRP und Leukozyten ist kein signifikanter Unterschied zu beobachten, ebenso bei der gemessenen Körpertemperatur. Diese Parameter allein scheinen also nicht geeignet zu sein auf den Schweregrad einer septischen Erkrankung zu schließen. In Bezug auf die Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation zeigt der Schweregrad B eine signifikant längere Verweildauer ($p < 0,01$).

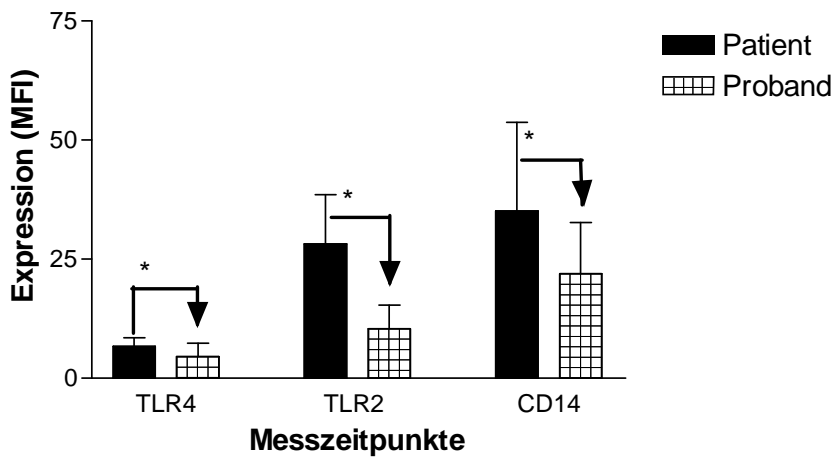
| Schweregrad A n=10 | | | Schweregrad B n=19 | | |
|---------------------------|-------|-----------|---------------------------|--------|-----------|
| | Mean | ±Std.Dev. | | Mean | ±Std.Dev. |
| APS max. | 16,70 | ± 6,90 | APS max. | 24,11 | ± 6,62 |
| APACHE max. | 24,00 | ± 9,90 | APACHE max. | 34,47 | ± 7,63 |
| CRP max. (mg/l) | 171,0 | ± 84,70 | CRP max. (mg/l) | 228,85 | ± 106,39 |
| Leuk. max. (/µl) | 28,50 | ± 25,0 | Leuk. max. (/µl) | 31,81 | ± 19,61 |
| Temp. max. (°C) | 39,14 | ± 1,10 | Temp. max. (°C) | 38,23 | ± 1,10 |
| Tage Intensiv | 5,75 | ± 4,92 | Tage Intensiv | 18,84 | ± 25,15 |
| Tage Krankenh. | 22,83 | ± 14,22 | Tage Krankenh. | 27,28 | ± 26,69 |

Tabelle 3: APS und APACHE II Score, CRP-Maximum, Leukozyten- und Fiebermaximum, sowie durchschnittliche Intensivstations- und Krankenhausaufenthaltsdauer (Mittelwert ± Standardabweichung), Schweregrad A und Schweregrad B.

3.3 Die PRR-Expression von Probanden im Vergleich mit Sepsispatienten

3.3.1 PRR Muster auf der Oberfläche von Monozyten bei Sepsispatienten verglichen mit denen gesunder Probanden

Die Expression von TLR4, TLR2 und CD14 war signifikant höher auf Monozyten von Sepsispatienten verglichen mit denen gesunder Probanden (TLR4: 6,63MFI vs. 4,55MFI, $p < 0,001$; TLR2: 28,22MFI vs. 10,39MFI, $p < 0,001$; CD14: 35,12MFI vs. 21,92MFI, $p = 0,023$). Verglichen wurde der Zeitpunkt des Einschlusses der Patienten in die Studie (0h) mit dem Zeitpunkt 8h nach LPS-Infusion der Probanden.

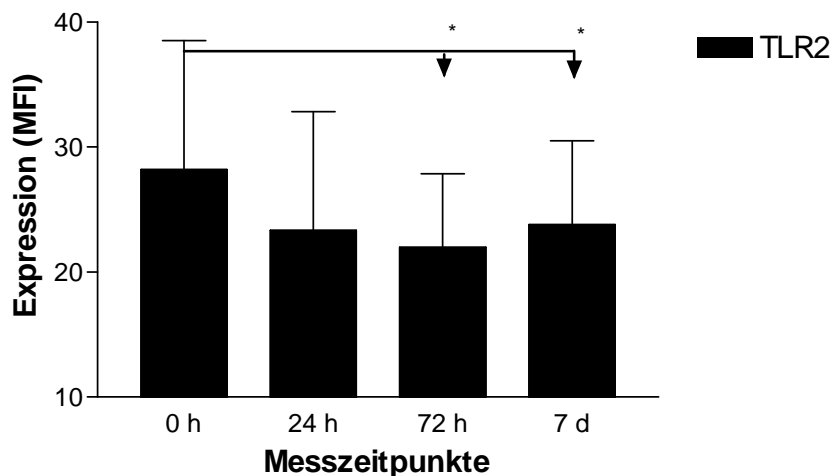


Figur 3.3.1 Flow zytometrische Expression von TLR4, TLR2 und CD14 auf Monozyten. MFI \pm SD wird gezeigt von Kontrollprobanden und Sepsispatienten. $*=p<0.03$

3.4 Die PRR-Expression von Sepsispatienten

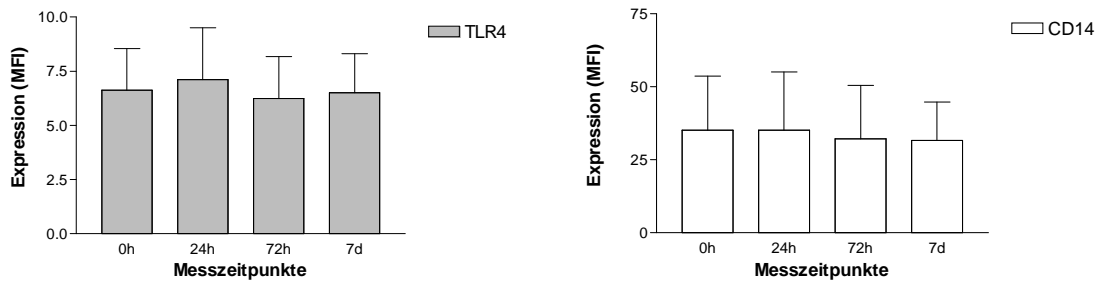
3.4.1 PRR-Expression während der ersten 7 Tage im Gesamtkollektiv

Bei Sepsispatienten zeigte sich auf Blutmonozyten nach 72 Stunden eine signifikante Downregulation von TLR2 im Vergleich zum Aufnahmezeitpunkt (0h: 28,22MFI vs. 72h: 21,98MFI, $p=0,019$) und im Vergleich zu Tag 7 (0h: 28,22MFI vs. 7d: 23,79MFI, $p=0,012$).



Figur 3.4.1a Flowzytometrische Expression von TLR2 auf Monozyten zu den verschiedenen Messzeitpunkten. $* p<0,05$, Data not shown: (24h vs. 72h, $p=0,044$; 24h vs. 7d, $p=0,01$)

TLR4 und CD14 hingegen zeigten keine signifikante Regulation während des Verlaufs der Krankheit (TLR4: 0h: 6,63MFI vs. 7d: 6,50MFI; CD14: 0h: 35,12MFI vs. 7d: 31,63MFI).

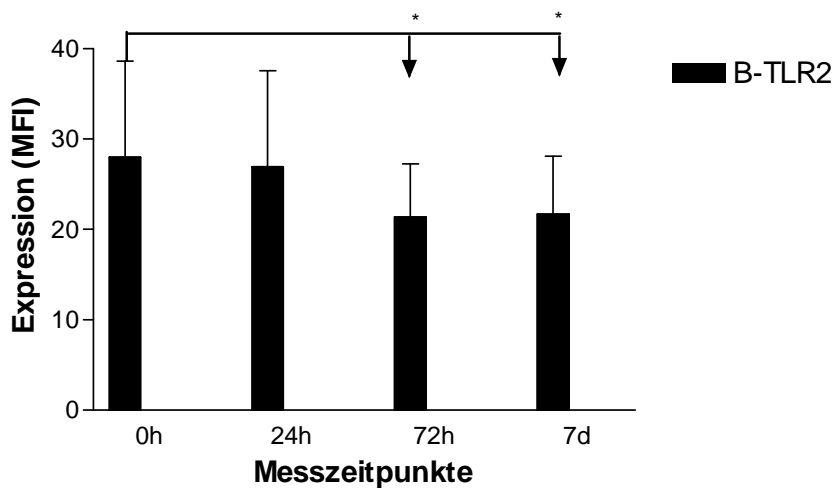


Figur 3.4.1b und c Flowzytometrische Expression von TLR4 und CD14 auf Monozyten zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

3.4.2 PRR-Expression während der ersten 7 Tage in Bezug auf die Sepsisschwere

Vergleich innerhalb der Schweregrade:

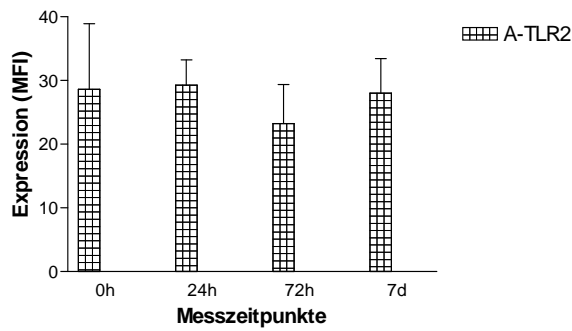
Bei Patienten mit schwerer Sepsis (Schweregrad B) kam es auf Blutmonozyten nach 72h (und 7 Tagen) zu einer signifikanten Downregulation der TLR2-Expression (0h: 28,0MFI vs. 72h: 21,37MFI, $p=0,026$), (0h: 28,0MFI vs. 7d: 21,7MFI, $p=0,017$). Nach 7 Tagen war die TLR2-Expression um 22,5% downreguliert.



Figur 3.4.2a Flow zytometrische Expression von TLR2 auf Monozyten während des Verlaufs der Sepsis. MFI \pm SD wird gezeigt von Schweregrad B. * $p<0,05$

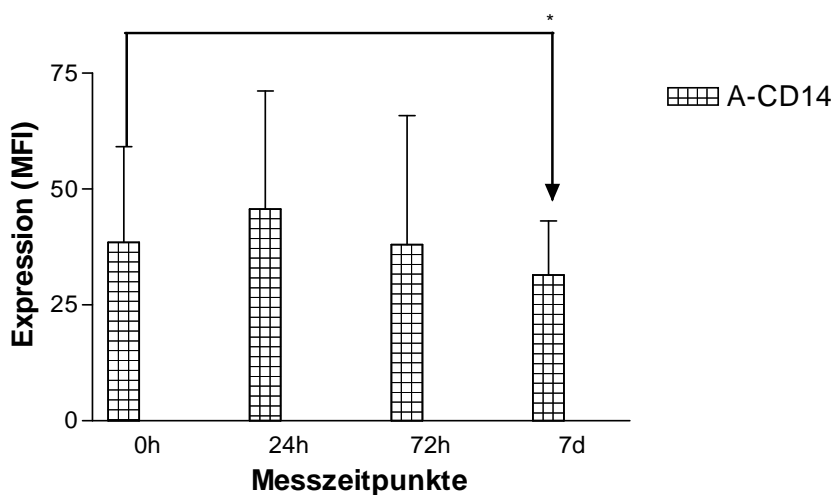
Data not shown: (24h vs. 72h: $p=0,041$; 24h vs. 7d: $p=0,041$)

Bei leichter Sepsis (Schweregrad A) fand sich keine signifikante Downregulation für TLR 2.



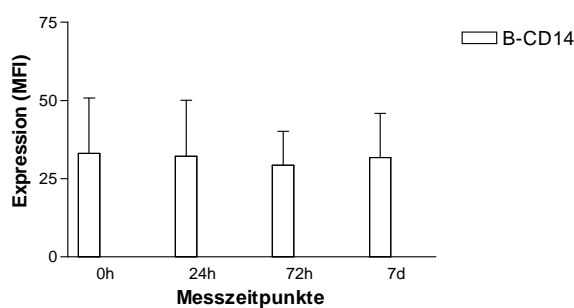
Figur 3.4.2b Flow zytometrische Expression von TLR2 auf Monozyten während des Verlaufs der Sepsis. MFI \pm SD wird gezeigt von Schweregrad A.

Die **CD14**-Expression in Schweregrad A zeigte eine Downregulation nach 7 Tagen (0h: 38,55MFI vs. 7d: 31,45MFI, $p=0,043$).



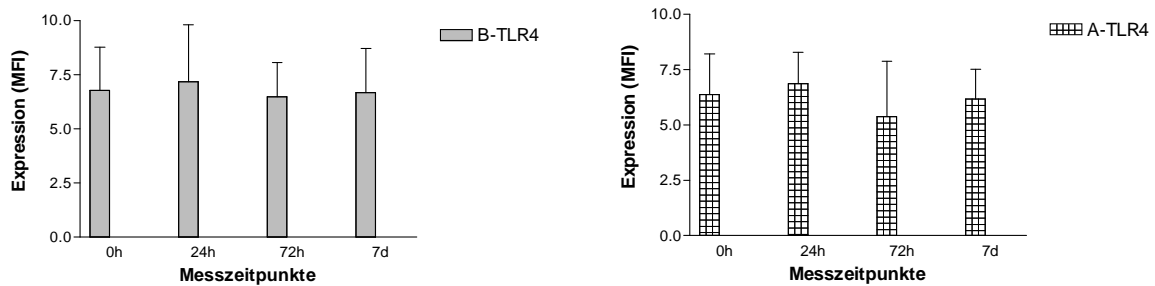
Figur 3.4.2c Flow zytometrische Expression von CD14 auf Monozyten während des Verlaufs der Sepsis. MFI \pm SD wird gezeigt von Schweregrad A. * $p<0,05$

Schweregrad B zeigt keine signifikante Regulation der CD14-Expression.



Figur 3.4.2d Flow zytometrische Expression von CD14 auf Monozyten während des Verlaufs der Sepsis. MFI \pm SD wird gezeigt von Schweregrad B.

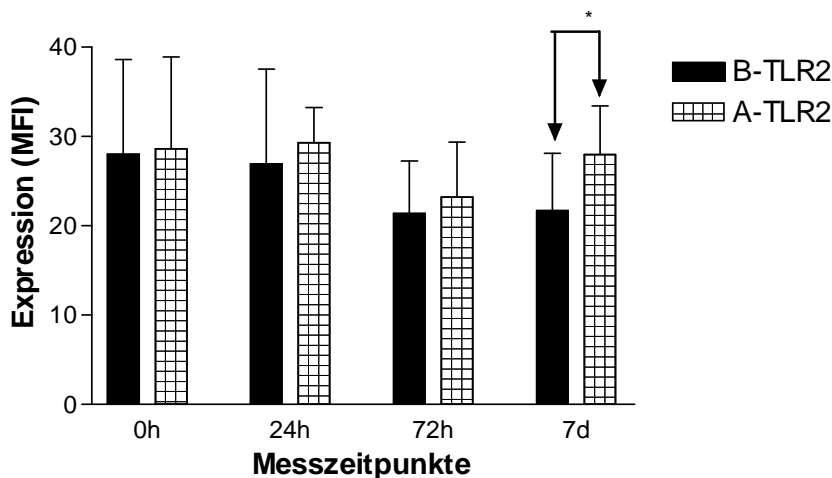
Wie schon im Gesamtkollektiv, fand sich auch in den einzelnen Schweregraden keine signifikante Regulation von **TLR4** (A: 0h: 6,37MFI vs. 7d: 6,18MFI; B: 0h: 6,79MFI vs. 7d: 6,67MFI).



Figur 3.4.2e/f Flow zytometrische Expression von TLR4 auf Monozyten während des Verlaufs der Sepsis. MFI \pm SD wird gezeigt von Schweregrad B und A.

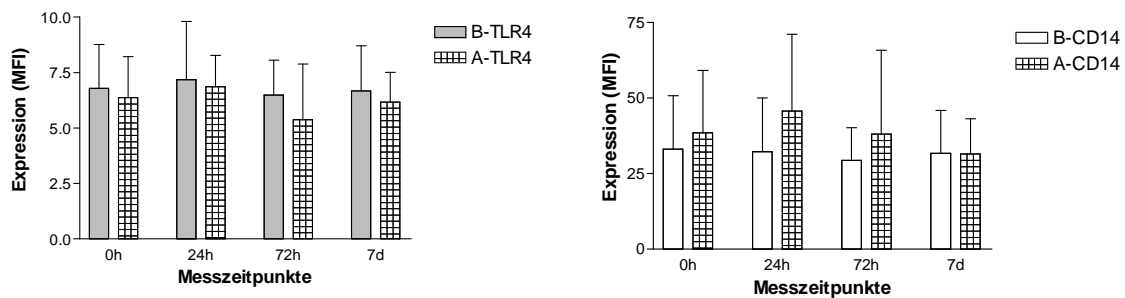
Vergleich zwischen den Gruppen:

Zum Aufnahmezeitpunkt (0h) gab es keinen Unterschied in der **TLR2**-Expression zwischen Patienten mit Schweregrad B und Patienten mit Schweregrad A ($28,0 \pm 10,63$ MFI [B] vs. $28,60 \pm 10,32$ MFI [A]). Bei 7d war die TLR2-Expression in Schweregrad B signifikant niedriger (B: $21,70 \pm 6,43$ MFI vs. A: $27,98 \pm 5,42$ MFI, $p=0,038$).



Figur 3.4.2g Flow zytometrische Expression von TLR2 auf Monozyten während des Verlaufs der Sepsis. MFI \pm SD wird gezeigt von Schweregrad B und A. * $p < 0,05$

Im Gegensatz hierzu gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der **TLR4**- und **CD14**-Expression der beiden Schweregrade.



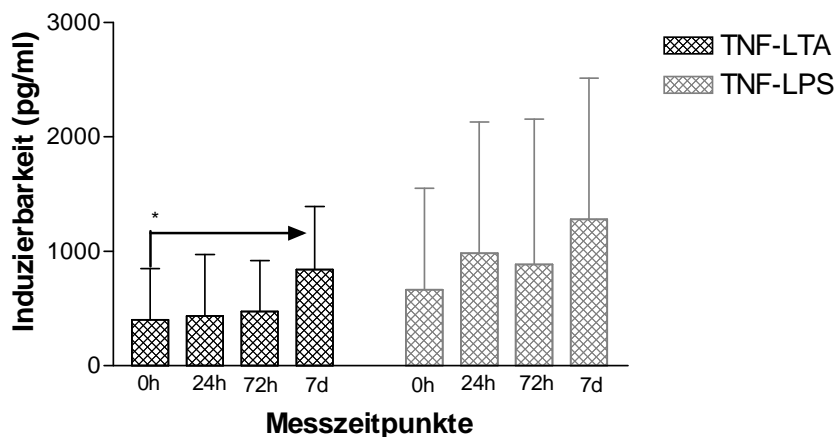
Figur 3.4.2h/i Flow zytometrische Expression von TLR4/CD14 auf Monozyten während des Verlaufs der Sepsis. MFI \pm SD wird gezeigt von Schweregrad B und A.

3.5 Die Zytokininduzierbarkeit bei Sepsispatienten in mit LPS und LTA stimuliertem Vollblutassay

3.5.1 Zytokin-Induzierbarkeit während der ersten 7 Tage im Gesamtkollektiv:

3.5.1.1 TNF- α

Die Stimulation im LTA-Vollblutassay (VBA für 24h mit LTA) zeigte die niedrigste TNF- α -Induzierbarkeit am Aufnahmezeitpunkt (im Sinne einer Hyporesponsibilität) und eine ansteigende Produktion während der 7 Tage (LTA: 0h: 401,46pg/ml vs. 7d: 841,36pg/ml, $p=0,0086$). Es fand sich keine Signifikanz unter LPS-Stimulation (LPS: 0h: 664,29pg/ml vs. 7d: 1278,31pg/ml).

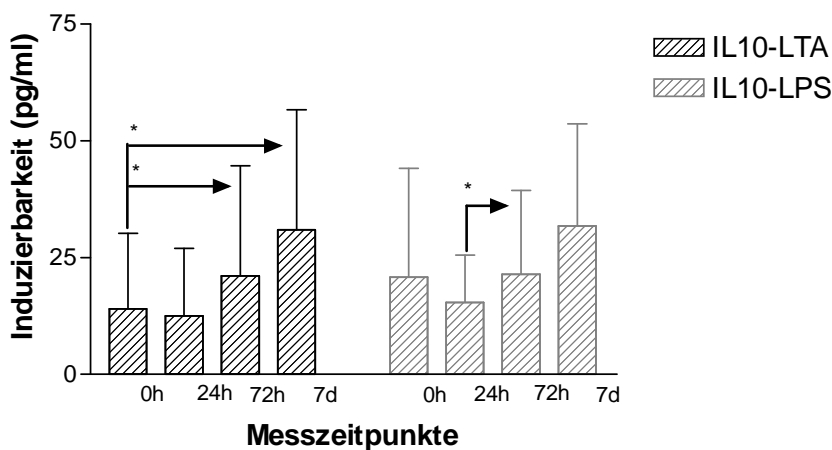


Figur 3.5.1.1 TNF- α Sekretion im Vollblutassay als Antwort auf LTA- und LPS-Stimulation im Verlauf der Krankheit. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. * $p < 0.05$

Data not shown: (LTA: 24h vs. 7d, $p = 0,0076$)

3.5.1.2. IL-10

Die Stimulation im LTA-Vollblutassay (VBA für 24h mit LTA) zeigte die niedrigste IL-10 Induzierbarkeit am Aufnahmezeitpunkt (im Sinne einer Hyporesponsibilität) und eine ansteigende Produktion während der 7 Tage. (0h: 14,06pg/ml vs. 7d: 30,99pg/ml, $p = 0,02$). Der signifikante Anstieg zeigte sich auch schon nach 3 Tagen (0h: 14,06pg/ml vs. 72h: 21,08pg/ml, $p = 0,023$). Die Stimulation mit LPS zeigte einen Trend in diese Richtung (0h: 20,84pg/ml vs. 7d: 31,80pg/ml), sowie einen signifikanten Anstieg von 24h auf 72h (24h: 15,41pg/ml vs. 72h: 21,44pg/ml, $p = 0,047$).

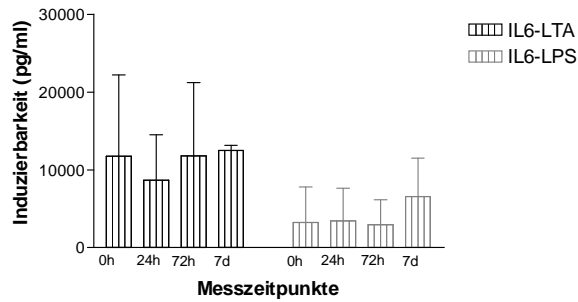


Figur 3.5.1.2 IL-10 Sekretion im Vollblutassay als Antwort auf LTA- und LPS-Stimulation im Verlauf der Krankheit. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. * $p < 0.05$

Data not shown: (LTA: 24h vs 7d, $p = 0,016$; 24h vs. 72h, $p = 0,047$)

3.5.1.3 IL-6

Bei IL-6 findet sich keine signifikante Modulation über die 7 Tage. (LPS: 0h: 3226,67 pg/ml vs. 7d: 6563,41pg/ml) (LTA: 0h: 11771,57 pg/ml vs. 7d: 12513,12pg/ml)

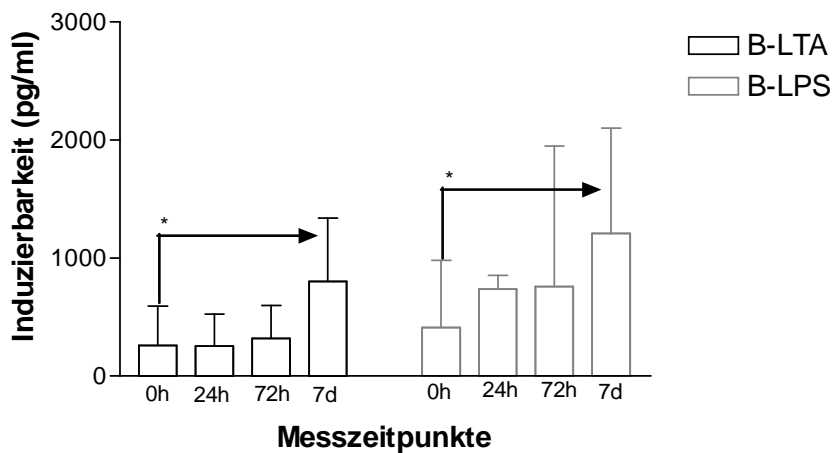


Figur 3.5.1.3 IL-6-Sekretion im Vollblutassay als Antwort auf LTA- und LPS-Stimulation im Verlauf der Krankheit. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD ausgedrückt.

3.5.2 Zytokin-Induzierbarkeit während der ersten 7 Tage in Bezug auf die Sepsisschwere, Vergleich innerhalb der Schweregrade

3.5.2.1 TNF- α

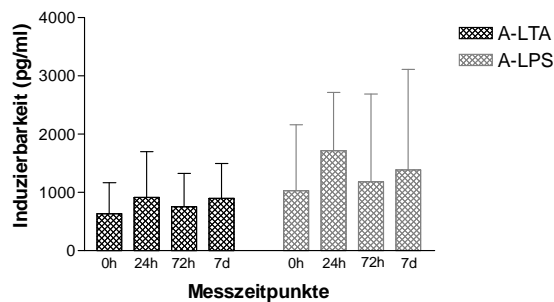
In Schweregrad B gab es eine signifikant ansteigende Induzierbarkeit nach 7 Tagen unter LTA-Stimulation (0h:261,65pg/ml vs. 7d: 802,15pg/ml, $p=0,011$) sowie unter LPS-Stimulation (0h:412,24pg/ml vs. 7d: 1208,86pg/ml, $p=0,036$).



Figur 3.5.2.1a TNF-Sekretion im Vollblutassay als Antwort auf LTA- und LPS-Stimulation im Verlauf der Krankheit. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Schweregrad B.

*= $p<0,05$, Data not shown: (B-LTA: 24h vs. 7d, $p=0,013$; 72h vs. 7d, $p=0,026$)

In Schweregrad A zeigte sich solch ein signifikanter Anstieg nicht.

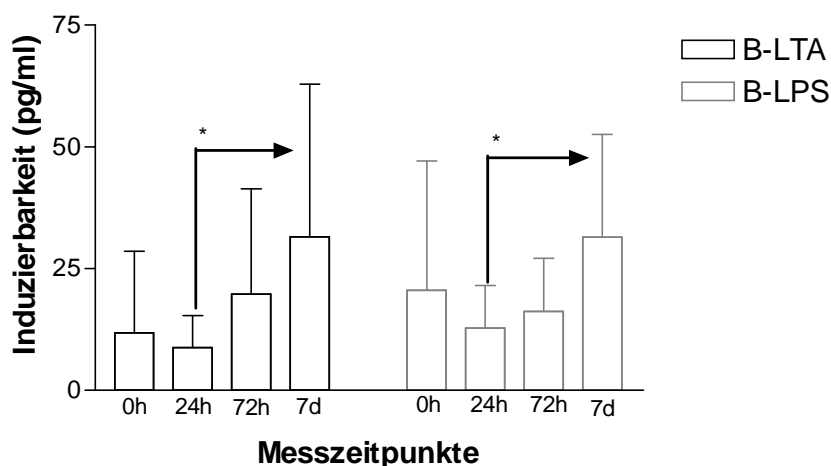


Figur 3.5.2.1b TNF-Sekretion im Vollblutassay als Antwort auf LTA- und LPS-Stimulation im Verlauf der Krankheit. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Schweregrad A.

3.5.2.2 IL-10

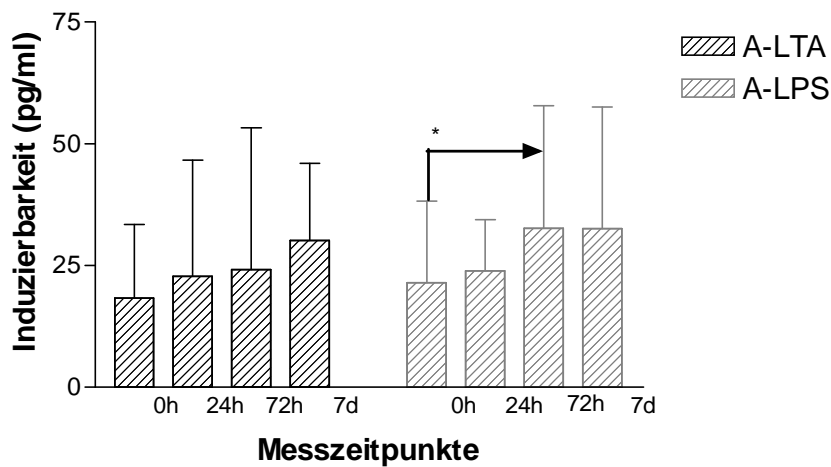
In Schweregrad B fand sich ein Trend in Richtung gesteigerter Induzierbarkeit unter LTA-Stimulation (0h vs. 7d, $p=0,066$), sowie eine signifikant gesteigerte Induzierbarkeit unter LTA-Stimulation der Messwerte bei 24h zu 7 Tagen (24h: 8,69pg/ml vs. 7d: 31,53pg/ml, $p=0,015$).

Unter LPS-Stimulation fand sich eine gesteigerte Induzierbarkeit von Messzeitpunkt 24h zu 7d (24h: 12,76pg/ml vs. 7d: 31,42pg/ml, $p=0,05$)



Figur 3.5.2.2a IL-10-Sekretion im Vollblutassay als Antwort auf LTA- und LPS-Stimulation im Verlauf der Krankheit. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Schweregrad B.

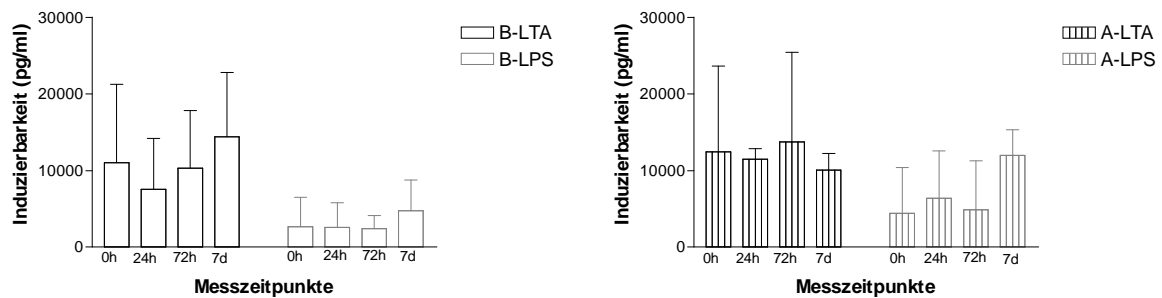
In Schweregrad A fand sich eine gesteigerte Sekretion von IL-10 beim Vergleich von 0h mit 72h unter LPS-Stimulation (0h: 21,47pg/ml vs. 72h:32,66pg/ml, p=0,028).



Figur 3.5.2.2b IL-10-Sekretion im Vollblutassay als Antwort auf LTA- und LPS-Stimulation im Verlauf der Krankheit. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Schweregrad A.

3.5.2.3 IL-6

Sowie in A als auch in B findet sich keine signifikante Regulation während des Verlaufs der Krankheit.

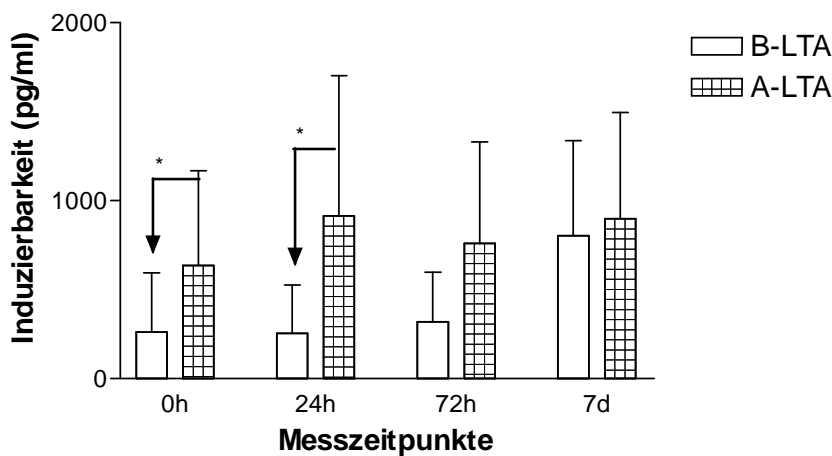


Figur 3.5.2.3 a/b IL-6-Sekretion im Vollblutassay als Antwort auf LTA- und LPS-Stimulation im Verlauf der Krankheit. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Schweregrad B links, Schweregrad A rechts.

3.5.3 Zytokin-Induzierbarkeit während der ersten 7 Tage in Bezug auf die Sepsisschwere, Vergleich zwischen den Schweregraden

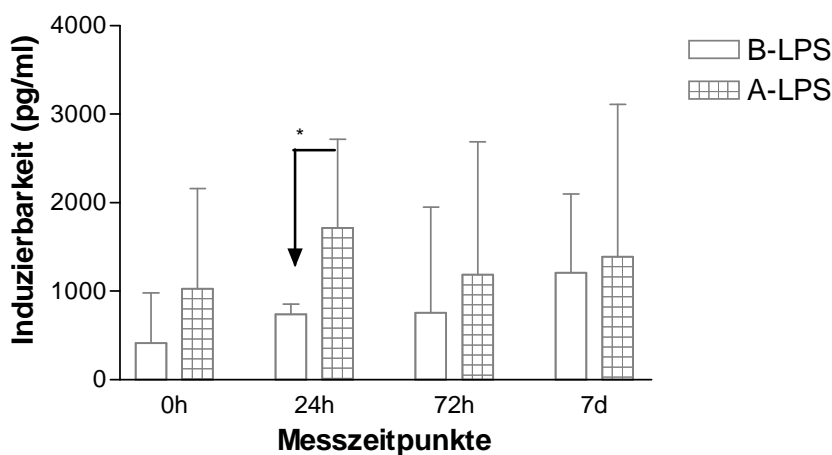
3.5.3.1 TNF- α

Die TNF- α -Produktion nach LTA Stimulation war für Schweregrad B niedriger bei 0h (B: 261,65pg/ml vs. A: 634,47pg/ml, $p=0,015$), als auch bei 24h (B: 254,14pg/ml vs. A: 914,62pg/ml, $p=0,033$).



Figur 3.5.3.1.c TNF-Sekretion im Vollblutassay als Antwort auf LTA-Stimulation im Verlauf der Krankheit. MFI \pm SD wird gezeigt von Schweregrad B und A. * $p<0,05$

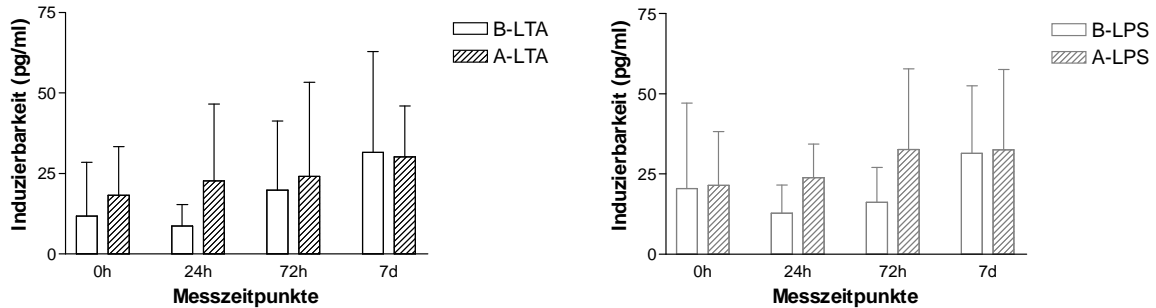
Nach LPS Stimulation war die TNF- α -Produktion für Gruppe B bei 24h signifikant niedriger als in Schweregrad A (B:737,98pg/ml vs. A:1716,23pg/ml, $p=0,05$)



Figur 3.5.3.1.d TNF-Sekretion im Vollblutassay als Antwort auf LPS-Stimulation im Verlauf der Krankheit. MFI \pm SD wird gezeigt von Schweregrad B und A. * $p<0,05$

3.5.3.2 IL-10

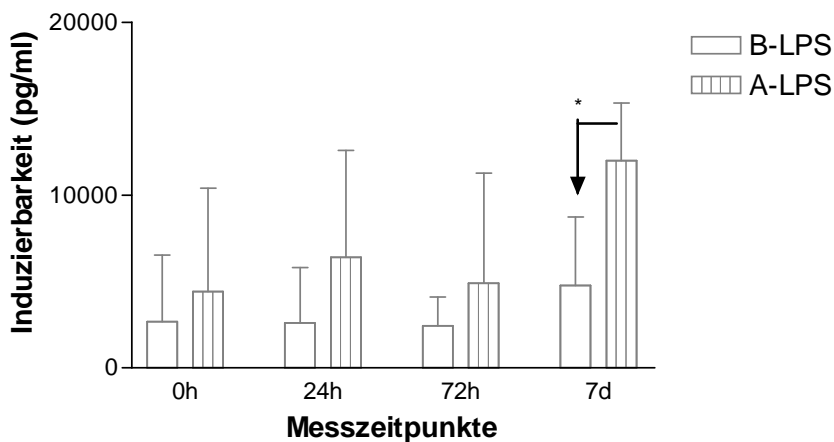
Es gibt keinen Unterschied zwischen beiden Schweregraden unter LTA bzw. LPS Stimulation.



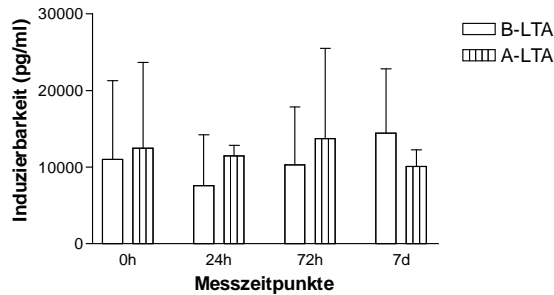
Figur 3.5.3.2 c/d TNF-Sekretion im Vollblutassay als Antwort auf LTA/LPS-Stimulation im Verlauf der Krankheit. MFI \pm SD wird gezeigt von Schweregrad B und A.

3.5.3.3 IL-6

Die IL-6-Produktion nach LPS Infusion war in Schweregrad B zum Zeitpunkt 7d niedriger (A: 7d: 11986,27pg/ml vs. B: 7d: 4755,79pg/ml, $p=0,013$).



Figur 3.5.3.3d IL-6-Sekretion im Vollblutassay als Antwort auf LPS-Stimulation im Verlauf der Krankheit. MFI \pm SD wird gezeigt von Schweregrad B und A. * $p<0,05$



Figur 3.5.3.3 c IL-6-Sekretion im Vollblutassay als Antwort auf LTA-Stimulation im Verlauf der Krankheit. MFI \pm SD wird gezeigt von Schweregrad B und A. * $p < 0,05$

3.5.4 Korrelationen zu den PRR:

3.5.4.1 TNF- α

Die TNF- α -Produktion nach LPS- Stimulation korrelierte bei 72h mit der CD14 Expression ($p=0.035$, $R=0,62$).

3.5.4.2 IL-10

Bei 7d korrelierte die TLR2 Expression mit der IL-10 Produktion nach LTA Stimulation ($R=0,54$; $p=0.014$). Bei 72h korrelierte die TLR2 Expression mit der IL-10 Produktion nach LPS Stimulation ($R=0,52$; $p=0,018$). Ebenso bei 72h korrelierte die CD14-Expression mit der IL-10 Produktion ($R=0,49$; $p=0,021$).

3.5.4.3 IL-6

Bei 24h korrelierte IL-6 unter LPS-Stimulation mit CD14 ($p=0,04$, $R=0,49$). Bei 0h korrelierte IL-6 unter LTA-Stimulation mit TLR4 ($p=0,013$, $R=0,6$)

4. Diskussion

Die Toll-like Rezeptoren (TLR) spielen eine Schlüsselrolle im angeborenen Immunsystem. Sie erkennen als Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRR) molekulare Muster von Mikroorganismen auf Leukozyten und epithelialen Zellen. Die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren führt über den Transskriptionsfaktor NFkappaB zu einer erhöhten Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-1 und IL-6.

Die zentrale Rolle von TLR2 und TLR4 in der Antwort auf mikrobielle Erreger im Rahmen des angeborenen Immunsystems legt die Vermutung nahe, dass sie in die Pathophysiologie und das Outcome der humanen Sepsis involviert sind.

Im ersten Schritt unserer Studie untersuchten wir die Expression von TLR2, TLR4 und CD14 auf Monozyten von Gesunden und Sepsispatienten.

Hierfür wurde die Oberflächenexpression der genannten PRR auf den Monozyten von Gesunden und Sepsispatienten per FACS-Scan quantifiziert. Verglichen wurde die PRR-Expression der Patienten zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie, also direkt nach Diagnosestellung, mit den Daten von unbehandelten Kontrollprobanden.

Hier zeigt sich bei den Sepsispatienten eine im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöhte Expression von TLR2, TLR4 und CD14 auf Monozyten.

Dies konnte bereits in mehreren Studien übereinstimmend nachgewiesen werden. Bei Härter et al. wiesen sowohl Monozyten, als auch PMN von Sepsispatienten eine deutlich höhere TLR2 und -4 Expression auf (21). Armstrong et al. beobachteten signifikant hochregulierte TLR2-mRNA auf Monozyten von Sepsispatienten mit erhöhten Leveln von TLR2-Protein auf der Oberfläche der Zellen. Auch die TLR4-mRNA zeigte sich erhöht, wobei sich jedoch entsprechend erhöhte Oberflächenprotein-Level nicht fanden (5).

Als Schlüsselfaktor in der Pathophysiologie der Sepsis wird eine prolongierte zelluläre Hyporesponsivität (im Folgenden auch bezeichnet als „Toleranz“) gegenüber bakteriellen Antigenen mit konsekutiv reduzierter Zytokinantwort vermutet. Dies limitiert die Fähigkeit eine angemessene inflammatorische Abwehr gegenüber Sekundärinfektionen aufzubauen. Der exakte Mechanismus der Endotoxintoleranz auf menschlichen Monozyten ist noch nicht vollständig geklärt. Es besteht die Hypothese, dass Endotoxintoleranz ein Ergebnis von Toll-like-Rezeptor Downregulation ist (21). Auch die Ergebnisse anderer Studien deuten darauf

hin, dass der TLR-Regulation eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Hyporesponsivität zukommt.

So konnte gezeigt werden, dass eine prolongierte LPS-Stimulation von humanen Makrophagen zu einer TLR2-Downregulation führt (18). Weiterhin ist Toleranz in vitro gegenüber bakteriellem Lipoprotein mit reduzierter TLR2-Expression assoziiert, was zu einer verminderten TNF und IL-6-Produktion führte (60). An Mausmakrophagen, an denen eine LPS-Toleranz induziert wurde, konnte ein Abfall der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen registriert werden, welcher mit der Downregulation der Expression von TLR4 an der Oberfläche der Makrophagen korrelierte (42).

Im Gegensatz hierzu konnte ein Anstieg von TLR2- und TLR4-mRNA, sowie der Proteinexpression bei endotoxintoleranten Mäusen gezeigt werden (62). Im menschlichen Modell berichteten Medvedev et al. über eine ansteigende TLR2- Expression in LPS-toleranten humanen Monozyten (38). Weiterhin wurde in der humanen Sepsis ansteigende Proteinexpression (21) und mRNA (5) von TLR2 und TLR4 auf Neutrophilen und Monozyten gefunden.

Wir nahmen an, dass die Hyporesponsivität der Monozyten in der humanen Sepsis mit der Regulation von TLR2, TLR4 and CD-14 assoziiert ist. Daher untersuchten wir die TLR2-, TLR4- und CD14-Expression bei 29 Sepsispatienten im zeitlichen Verlauf.

Bei Diagnosestellung, nach 24h, 72h und 7 Tagen wurde den Patienten jeweils Blut abgenommen, die Monozyten isoliert und die Oberflächenexpression der genannten PRR per FACS-Scan gemessen.

Hier zeigt sich eine signifikante Downregulation von TLR2 im Gesamtkollektiv der Sepsispatienten über die 7 Tage. Für CD14 lässt sich ein nicht signifikanter Trend in diese Richtung nachweisen, für TLR4 findet sich keine signifikante Modulation im zeitlichen Verlauf.

Daten zur TLR-Expression in Assoziation zum klinischen Verlauf und zum Outcome der Patienten fehlen bisher in der Literatur. Wir führten eine genaue Beobachtung der klinischen Entwicklung der 29 eingeschlossenen Patienten durch. Zu den genannten 4 Messzeitpunkten wurde jeweils die Körpertemperatur, Blutdruck, Herzfrequenz und Atemfrequenz protokolliert. Weiterhin erfolgte die Erfassung von Blutgasanalysen und laborchemischen Parametern (Na, K, Creatinin, Hk, Leukozyten). Der Glasgow Coma Scale wurde jeweils bestimmt. Weiterhin wurden einmalig neben dem Alter der Patienten die chronischen

Erkrankungen erfasst. Aus diesen gesammelten Daten errechneten wir den prognostischen APACHE II-Score.

Weiterhin führten wir eine Einstufung unserer Patienten in die Sepsis-Schweregrade (SIRS, Sepsis, Severe Sepsis, Septischer Schock, MODS) durch. Die Einteilung fand anhand der Definition des *American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine* Konsensus Konferenz 1992, angepasst durch Bone 1997, statt (11).

Zur Beantwortung der Frage, ob sich die TLR-Regulation von schwer erkrankten Patienten mit schlechtem Outcome von denen der weniger schwer erkrankten unterscheidet, teilten wir die Patienten nach Schweregrad der Erkrankung in zwei Gruppen ein.

Hier zeigt sich interessanterweise die beobachtete signifikante Downregulation von TLR2 am ausgeprägtesten in der Gruppe der schweren Sepsis mit schlechterem Outcome (Gruppe B: septischer Schock und MODS). Nach 7 Tagen weist diese Gruppe eine signifikant niedrigere TLR2-Expression auf als die Gruppe der Patienten mit einer leichteren Erkrankung und besserem Outcome. Betrachtet man nur das Kollektiv der Patienten, die an der Sepsis verstorben sind, zeigt sich diese Beobachtung sogar noch deutlicher. Hier ist der Tod assoziiert mit signifikant niedrigeren Werten für TLR2 zum Zeitpunkt 0h, 24h und 72h, sowie bei CD14 zum Zeitpunkt 0.

Zusammengenommen deuten unsere Daten also darauf hin, dass eine reduzierte TLR2-Expression und zum Teil auch die Expression von CD14 im Verlauf der Sepsis mit einem schlechten Outcome assoziiert ist.

Als zusätzlichen Schritt untersuchten wir in unserer Studie ebenfalls die Zytokininduzierbarkeit im Verlauf der Erkrankung.

Die Daten anderer Autoren deuten darauf hin, dass verminderte Zytokinfreisetzung mit der Gegenwart von Sepsis zusammenhängt (61) und niedrige Level von insbesondere TNF im Vollblut mit schlechterem klinischen Outcome von Patienten auf Intensivstationen assoziiert sind (22). Ähnliches berichteten auch West et al (61). Sie untersuchten Daten von Patienten von chirurgischen Intensivstationen und fanden heraus, dass niedrige Level von LPS stimuliertem TNF und IL-6 mit der Dauer des Intensivaufenthaltes, prolongierter mechanischer Beatmung, einer höheren Inzidenz an sekundären Infektionen und erhöhten Leukozytenzahlen assoziiert waren. Sfeir et al berichteten, dass die TNF Freisetzung aus LPS-stimulierten „septischen“ Monozyten abgeschwächt war, wohingegen die IL-10-Freisetzung signifikant anstieg (52).

In unserer Studie untersuchten wir die Zytokininduzierbarkeit, indem wir Vollblutassays für 24h mit jeweils LPS und LTA inkubierten. Anschließend wurden aus den Überständen die IL-6-, IL-10, und TNF-Level per ELISA gemessen.

Als Ergebnis zeigt sich eine ansteigende Zytokininduzierbarkeit von TNF und IL-10 im zeitlichen Verlauf nach jeweils 24stündiger Stimulation mit LTA im Gesamtkollektiv. Nach LPS-Stimulation zeigt sich nur ein signifikanter Anstieg für IL-10. Für IL-6 lässt sich kein signifikanter Trend sowohl nach LPS-, als auch nach LTA-Stimulation, über den zeitlichen Verlauf aufweisen.

Diese Daten deuten an, dass die Rezeptoren im Verlauf der Erkrankung wieder funktionale Aktivität zurückerlangen. Dieser Verlauf deutet sich auch für die Gruppe der schwerer Erkrankten an, jedoch mit insgesamt niedrigerer Induzierbarkeit über alle Zeitpunkte betrachtet. Statistisch signifikant lässt sich dies für TNF nach 0h und 24 h und für IL-6 nach 7 Tagen nachweisen. Dies werten wir ebenfalls als Hinweis auf die beschriebene Monozytenhyposensitivität. Diese Daten deuten also darauf hin, dass niedrigere Level von TNF und IL-6 mit einem schlechteren Outcome assoziiert sind.

Um die pathophysiologische Rolle von TLR2, TLR4 und CD14 im Rahmen der Aktivierung des Immunsystems und der Monozytenhyposensitivität in der humanen Sepsis zu unterstreichen, hofften wir eine eindeutige statistische Korrelation zwischen der PRR-Expression und der Zytokininduzierbarkeit zu finden.

In Makrophagen von Mäusen konnte durch Medvedev et al. nachgewiesen werden, dass die TLR-Expression mit der Induzierbarkeit einer proinflammatorischen Antwort auf LPS korreliert (38), wohingegen eine Stimulation der Monozyten mit TLR2-Agonisten eine Assoziation zur Freisetzung von IL-10 aufwies.

In unserer Studie ließ sich eine Korrelation zwischen der PRR-Expression und der Zytokininduzierbarkeit nur teilweise nachweisen. TLR2 korreliert mit der IL-10-Induzierbarkeit nach 72h unter LPS-Stimulation und nach 7 Tagen unter LTA-Stimulation. CD14 korreliert mit der IL-6 /-10 und TNF-Induzierbarkeit nach 72h unter LPS-Stimulation. TLR4 korreliert zum Aufnahmezeitpunkt mit der IL-6-Induzierbarkeit unter LTA-Stimulation.

Anfangs dachte man, dass Endotoxintoleranz eine vorteilhafte adaptive Antwort sein könnte. Es könnte aber auch eine Komponente der immunogenen Dysregulation sein, die das Management von Patienten mit schwerer Sepsis verkompliziert.

Therapien, die in die Signalkaskade der TLR eingreifen, werden aktuell für mehrere Krankheiten untersucht. Es wird derzeit diskutiert, ob eine TLR-Blockierung oder TLR-Agonisten in der Sepsis gebraucht wird. Umfangreiches Wissen über die Regulation der TLR induzierten Signalkaskaden wird benötigt, um den klinischen Effekt vorausszusehen.

Unsere Daten deuten darauf hin, dass eine zusätzliche TLR-Blockierung bei Sepsispatienten eventuell gefährlich sein könnte.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit untersucht die Rolle der Toll-like Rezeptor-Expression auf Blutmonozyten in der humanen Sepsis.

Während einer Infektion triggern bakterielle Antigene die initiale Zytokinantwort, welche wichtig ist um die eindringenden Pathogene zu beseitigen. Eine überschießende Zytokinantwort mit exzessiver Produktion von proinflammatorischen Zytokinen jedoch wird für die klinischen Manifestationen des septischen Schocks verantwortlich gemacht. Weiterhin wird vermutet, dass neben der initialen Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen eine prolongierte zelluläre Hyporesponsivität gegenüber bakteriellen Antigenen mit konsekutiv reduzierter Zytokinantwort ein Schlüsselfaktor in der Pathophysiologie der Sepsis darstellt. Dies limitiert die Fähigkeit eine angemessene, inflammatorische Abwehr gegenüber Sekundärinfektionen aufzubauen.

TLR2 und TLR4 spielen eine große Rolle bei der Antwort auf mikrobielle Erreger im Rahmen des angeborenen Immunsystems. Man geht davon aus, dass sie auch in der Pathophysiologie und dem Outcome der humanen Sepsis eine wichtige Stellung einnehmen.

In unsere Studie wurden 29 Sepsispatienten eingeschlossen. Es erfolgte eine Blutentnahme zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie, nach 24h, 72h und nach 7 Tagen. Auf antikörpermarkierten, isolierten Monozyten wurde per flowzytometrischer Messung die Oberflächenexpression von TLR2, TLR4 und CD14 bestimmt. Die Daten zum Einschlusszeitpunkt wurden mit denen von 16 Kontrollprobanden verglichen. Darüber hinaus bestimmten wir mittels Enzymimmunoassay (ELISA) die IL-10, IL-6 und TNFalpha Spiegel im Vollblutüberstand, nach Stimulation mit LPS und LTA, den Bestandteil von gramnegativen bzw. grampositiven Bakterien.

Eine Auswertung erfolgte sowohl im Gesamtkollektiv, als auch nach Einteilung der Patienten in zwei Gruppen. Die Sepsisschweregradeinteilung wurde anhand standardisierter Kriterien anhand der Definition des *American College of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine* Konsensus Konferenz 1992, angepasst durch Bone 1997, durchgeführt. In Gruppe B fallen die Patienten mit „Septischem Schock“ und „Multiorganversagen“ (MODS), in Gruppe A wurden Patienten mit „Sepsis“ und „Severe Sepsis“ zusammengefasst.

Es zeigte sich, dass Sepsispatienten durch eine deutlich erhöhte Expression von TLR2, TLR4 und CD14 auf Monozyten charakterisiert sind.

Es fand sich eine signifikante Downregulation von TLR2 im Krankheitsverlauf der schwerer erkrankten Patienten, was bedeutet, dass eine erniedrigte TLR2-Expression mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist.

Weiterhin zeigte sich, dass niedrigere Level von TNFalpha und IL-6 mit einem schlechteren Outcome assoziiert sind. Dies werten wir als Hinweis auf Monozytenhyposensitivität.

Als Nachweis der funktionalen Aktivität von TLR2, TLR4 und CD14 ließen sich Korrelationen zur Zytokininduzierbarkeit nachweisen.

Zusammengefasst weisen unsere Daten also darauf hin, dass Patienten mit einem schlechten Outcome durch eine erniedrigte TLR2-Expression mit konsekutiv erniedrigter Zytokininduzierbarkeit charakterisiert sind.

Die präzise Rolle der TLR-Regulation in der humanen Sepsis sollte in weiteren klinischen und experimentellen Studien untersucht werden, insbesondere bevor TLR-blockierende Wirkstoffe in der klinischen Phase eingesetzt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(7):499-511.
2. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992 Jun; 20(6):864-74.
3. Amersfoort van E, Berkel van T, Kuiper J. Receptors, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical Mikrob Reviews* 2003; 4(7):379-414.
4. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001 Jul; 29(7):1303-10.
5. Armstrong L, Medford AR, Hunter KJ, Uppington KM, Millar AB. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clin Exp Immunol* 2004; 136(2):312-319.
6. Berg DJ, Kühn R, Rajewsky K, Müller W, Menon S, Davidson N, Grünig G, Rennick D. 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.* 1995 Nov; 96(5):2339-47.
7. Beutler B, Poltorak A. Sepsis and evolution of the innate immune response. *Crit Care Med.* 2001 Jul; 29(7 Suppl):S2-6; discussion S6-7.
8. Bochud P, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatments. *BMJ* 2003 Feb; Volume 326:262-266.
9. Bone RC. Immunologic dissonance. A continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med.* 1996 Oct 15;125(8):680-7.
10. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of

innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 Jun;101(6):1644-55.

11. Bone RC, Grodzin CJ, Bak RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. Chest 1997 July; 112:235-43.
12. Brightbill, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R. B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, P. J. Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski, and R. L. Modlin. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science 285:732-736.
13. Burchardi H, Schneider H. Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. Pharmacoeconomics. 2004;22(12):793-813.
14. Chow, J. C., D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ, and F. Gusovsky. 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. J.Biol.Chem. 274:10689-10692.
15. Cristofaro P, Opal SM. The Toll-like receptors and their role in septic shock. Expert Opin Ther Targets 2003; 7(5):603-612.
16. Dalhoff, K, F Hansen, D Dromann, B Schaaf, S P Aries, J Braun, 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., v. 178, p. 891-895.
17. De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F, Pirenne J, Gathy R, Lopez M, Dehart I. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. Cytokine 1992, Vol 4: 239-248.
18. Droemann, D., T. Goldmann, T. Tiedje, P. Zabel, K. Dalhoff, and B. Schaaf. 2005. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. Respir.Res. 6:68.

19. Dziarski R, Wang Q, Miyake K, et al.: MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components. *J Immunol* 2001, 166:1938..
20. Greisman SE, Young EJ, Carozza FA, Jr. Mechanisms of endotoxin tolerance. V. Specificity of the early and late phases of pyrogenic tolerance. *J Immunol* 1969; 103(6):1223-1236.
21. Härter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock* 2004; 22(5):403-409.
22. Heagy W, Hansen C, Niemann K, et al: Impaired ex vivo lipopolysaccharide-stimulated whole blood tumor necrosis factor production may identify "septic" intensive care unit patients. *Shock* 2000; 14:271-277
23. Holmes CL, Russel JA, Walley KR. Genetic Polymorphism in Sepsis and Septic Shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest*. 2003 Sep;124(3):1103-15.
24. Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Anaesthesist*. 2004 Jan; 53(1):10-28.
25. Hshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al.: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for Tlr4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162:3749-3752.
26. Imler JL, Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol* 2001; 11(7):304-311.
27. Jacobi J. Pathophysiology of sepsis. *Am J Health Syst Pharm*. 2002 Feb 15; 59 Suppl 1:S3-8.
28. Jones BW, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT et al. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol* 2001; 69(6):1036-1044.

29. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985, Vol 13, No 10: 818-829.
30. Knuefermann P, Nemoto S, Baumgarten G, Misra A, Sivasubramanian N, Carabello BA et al. Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll-like receptors? *Chest* 2002; 121(4):1329-1336.
31. Lawton JA, Ghosh P. Novel therapeutic strategies based on toll-like receptor signaling. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7(4):446-451.
32. Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol*. 2001 Apr 15; 166(8):5161-7.
33. Lien E, Ingalls R. Toll-like receptors. *Crit Care Med* 2002; Vol.30, No1:1-10.
34. Lien, E., T. J. Sellati, A. Yoshimura, T. H. Flo, G. Rawadi, R. W. Finberg, J. D. Carroll, T. Espevik, R. R. Ingalls, J. D. Radolf, and D. T. Golenbock. 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J.Biol.Chem.* 274:33419-33425.
35. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003 Apr 17; 348(16):1546-54.
36. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343(5):338-344.
37. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397.
38. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol*. 2000 Jun 1;164(11):5564-74.
39. Murphy TJ, Paterson HM, Mannick JA, Lederer JA. Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptor responses. *J Leukoc Biol* 2004; 75(3):400-407.

40. Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Prahlanan MK, Mantovani A. Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *J Leukoc Biol* 2000; 67(4):450-456.
41. Netea MG, van der Meer JW, van Deuren M, Kullberg BJ. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends Immunol.* 2003 May; 24(5):254-8.
42. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol.* 2000 Apr 1; 164(7):3476-9.
43. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Related Articles, Links Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med.* 2002 Jan; 30(1 Suppl):S58-63.
44. Ogle CK, Guo X, Chance WT, Ogle JD. Induction of endotoxin tolerance in rat bone marrow cells by in vivo infusion of tumor necrosis factor. *Crit Care Med.* 1997 May; 25(5):827-33.
45. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al.: Defective LPS-signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998, 282:2085-2088.)
46. Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, et al.: Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor-4(Tlr4). *J Exp Med* 1999; 189:615-625.
47. Read RC, Wyllie DH. Toll receptors and sepsis. *Curr Opin Crit Care* 2001; 7(5):371-375.
48. Riedemann NC, Guo R, Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 2003; 112:460-467.
49. Sanchez-Cantu L, Rode HN, Christou NV. Endotoxin tolerance is associated with reduced secretion of tumor necrosis factor. *Arch Surg.* 1989 Dec; 124(12):1432-5; discussion 1435-6.

50. Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K, Akira S. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol*. 2000 Dec 15; 165(12):7096-101.
51. Schuster JM, Nelson PS. Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease. *J Leukoc Biol* 2000; 67(6):767-773.
52. Sfeir T, Saha DC, Astiz M, et al: Role of interleukin 10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock. *Crit Care Med* 2001; 29:129-133.
53. Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, et al: Chromosomal localisation of TIL, a gene encoding a protein related to Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics* 1996; 32: 486-488.
54. Tamandl D, Bahrami M, Wessner B, Weigel G, Ploder M, Furst W, Roth E, Boltz-Nitulescu G, Spittler A. Modulation of toll-like receptor 4 expression on human monocytes by tumor necrosis factor and interleukin-6: tumor necrosis factor evokes lipopolysaccharide hyporesponsiveness, whereas interleukin-6 enhances lipopolysaccharide activity. *Shock*. 2003 Sep; 20(3):224-9.
55. Thoma-Uszynski, S., S. M. Kiertscher, M. T. Ochoa, D. A. Bouis, M. V. Norgard, K. Miyake, P. J. Godowski, M. D. Roth, and R. L. Modlin. 2000. Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J. Immunol*. 165:3804-3810.
56. Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit*, 2005; 11(3):RA76-85.
57. Ulevitch RJ. Regulation of receptor-dependent activation of the innate immune response. *J Infect Dis* 2003; 187 Suppl 2:S351-S355.
58. Ulloa L, Tracey KJ. The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med*. 2005 Feb;11(2):56-63.
59. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; 401(6755):811-815.

60. Wang, J. H., M. Doyle, B. J. Manning, Q. Di Wu, S. Blankson, and H. P. Redmond. 2002. Induction of bacterial lipoprotein tolerance is associated with suppression of toll-like receptor 2 expression. *J.Biol.Chem.* 277:36068-36075.
61. West MA, Heagy W. Related Articles, Links Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med.* 2002 Jan; 30(1 Supp):S64-S73.
62. Williams DL, Ha T, Li C, Kalbfleisch JH, Schweitzer J, Vogt W et al. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. *Crit Care Med* 2003; 31(6):1808-181

7. Publikationen

46. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie in Berlin 16. - 19. März 2005

Überexpression von Toll-like Rezeptor 2-, 4- und CD14 auf Monozyten in der schweren humanen Sepsis im Vergleich zur experimentellen Endotoxinämie.

Luitjens K, Droemann D, Dodt C, Zabel P, Rupp J, Dalhoff K, Schaaf B

European Respiratory Society, Annual Congress 17.-21. September 2005, Copenhagen, Denmark

Sepsis and endotoxaemia differentially modulate Toll-like receptor 2, 4 and CD14 expression on human monocytes

B. Schaaf, D. Droemann, K. Luitjens, P. Zabel, C. Dodt, K. Dalhoff (Lübeck, Borstel, Germany)

B. Schaaf, K. Luitjens et al. Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. Diagnostic Pathology 2009, 4:12doi:10.1186/1746-1596-4-12