

**REGULATION DER CHOLESTEROLBIOSYNTHESE ALS  
SPEZIFISCHE ADAPTIVE WIRTSREAKTION IN MURINEN  
SEPSISMODELLEN**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

Universitätsklinikum Jena  
Center for Sepsis Control & Care  
Arbeitsgruppe: Experimentelle Anästhesie

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Franz Alisch  
geboren am 18. April 1988 in Dresden**

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Michael Bauer, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. Ulrich A. Maus, Medizinische Hochschule Hannover
3. Prof. Dr. med. Hortense Slevogt, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 23.10.2013

## Zusammenfassung

**Hintergrund** Sepsis beschreibt das Kontinuum eines sehr heterogenen Krankheitsbildes, welches durch die komplexe systemische inflammatorische Wirtsreaktion auf eine generalisierte Infektion ausgelöst wird. Dabei wurde in vielen klinischen Studien eine Assoziation von Hypocholesterolemie mit schlechtem Outcome von Patienten nachgewiesen. Ein Großteil der Pathogen-Host Interaktionen im Wirtsorganismus ist allerdings bisher unzureichend erforscht und behindert so die Entwicklung von kausalen, erregerspezifischen Therapien.

**Fragestellung und Ziele** Vor diesem Hintergrund soll eine Analyse der Regulation der Cholesterolsynthese im murinen Lebergewebe für die zwei häufigsten Infektionsfoki bei Sepsis, *S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie (durch Pneumokokken unterschiedlicher Virulenz) und polymikrobielle Peritonitis, erfolgen. Auf Ebene des Transkriptom werden die für die Regulation der Cholesterolsynthese entscheidenden Transkriptionsfaktoren und Enzyme untersucht. Diese Daten werden auf Ebene des Metaboloms durch die Konzentrationen der Synthesewenigenprodukte (Lanosterol, Desmosterol) sowie des Endproduktes Cholesterols in Lebergewebe und Plasma ergänzt und anschließend in einer integrativen Datenanalyse ausgewertet. Es soll geklärt werden, ob die Regulation der Cholesterolsynthese eine differenzierte adaptive Wirtsreaktion auf die untersuchten Infektionsfoki darstellt.

**Methodik** Weibliche C57/BL/6 Jackson Mäuse wurden auf zwei experimentelle Gruppen aufgeteilt: pulmonale Infektion durch intra-tracheale Instillation von Pneumokokkenserotypen unterschiedlicher Virulenz und polymikrobielle Peritonitis durch intraperitoneale Injektion einer humanen Faeces-Suspension sowie entsprechende Kontrollgruppen.

Nach 6h und 24h wurde das benötigte Gewebe nach Euthanasie der Versuchstiere entnommen und nach Lyse mittels Real-Time-quantitative-PCR auf Expressionsveränderungen der Zielgene untersucht. Die Metabolomdaten wurden durch Massenspektroskopie und automatisierte Analyse erhoben.

**Ergebnisse und Diskussion** Für beide Sepsismodelle zeigte sich eine differenzierte Regulation der Cholesterolsynthese. Die Infektion von Mäusen mit Pneumokokken führte zu einer konzertierten Hochregulation der Cholesterolsynthese, welche als erregerspezifische adaptive Wirtsantwort gewertet wird. Der pneumokokkenspezifische Virulenzfaktor Pneumolysin kann nicht für die Steigerung der Cholesterolsynthese bei Sepsis verantwortlich sein, da der Pneumolysin-defiziente Stamm im Transkriptom wesentlich stärkere Expressionssteigerungen zeigte als der verwendete Wildtyp. Ein weiterer hochvirulenter Stamm (S2) hingegen zeigte keine Veränderungen in Transkriptom und Metabolom. In diesem Fall liegt möglicherweise eine maladaptive Wirtsantwort auf diesen Pneumokokkenstamm vor. Im Gegensatz zum Pneumoniemodell zeigte die Cholesterolsynthese bei Peritonitis eine konzertierte Herabregulation. Daraus lässt sich eine deutliche Abhängigkeit der adaptiven Wirtsantwort von Infektionsfokus und Erregerspektrum im Rahmen bei Sepsis ableiten.

**Schlussfolgerungen** Da die Cholesterolsynthese bei Sepsis allein bei den zwei häufigsten septischen Foki differenziert reguliert ist, sollte dies für zukünftige klinische Studien Anlass geben, den Eintrittsort und beteiligte Erreger stärker zu berücksichtigen sowie ein engmaschiges Cholesterolmonitoring vorzunehmen, um dem pathogenetischen Aspekt in der Entwicklung der Sepsistherapie mehr Bedeutung beizumessen.

## Abkürzungsverzeichnis

Actb	β-Actin
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare (Einheit)
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
CAP	<i>community acquired pneumonia</i> = ambulant erworbene Pneumonie
CDC	<i>cholesterol-dependent cytolysins</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CoA	Coenzym A
COPII	<i>coat protein complex II</i>
CRP	C-reaktives Protein
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i>
DAMP	<i>damage associated molecular pattern</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl: <i>-acid</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FC	<i>fold change</i>
Fdps	Farnesyldiphosphat-Synthase
g	Erdbeschleunigung $g \approx 9,81\text{m/s}^2$ (Formelzeichen)
G	Gauge, Kanüldurchmesser bei Spritzen (Einheit)
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gusb	β-Glucuronidase
Hmbs	Hydroxymethylbilan-Synthase
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A -Reduktase

---

Hmgcr	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A -Reduktase
Hprt1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
Insig1	<i>insulin-induced gene 1</i>
Insig2	<i>insulin-induced gene 2</i>
IQR	<i>interquartile range</i>
ITS	Intensivstation
KBE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton (Einheit)
MAC	<i>membrane attack complex</i>
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Mvd	Mevalonat-Decarboxylase
M-W-U-Test	Mann–Whitney-U-Test
Norm. Fluoro.	<i>normalized fluorescence</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCI	<i>Peritoneal Infection &amp; Contamination</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PLY	Pneumolysin
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
PPR	<i>pattern recognition receptor</i>
RAMP	<i>resolution-associated molecular pattern</i>
LC-ESI-MS/MS	<i>liquid chromatography + electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl: <i>-acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RNFW	RNase freies Wasser
RQI	<i>RNA Quality Indicator</i>
RTq-PCR	Real-Time-quantitative-PCR
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
S19-dP	Serotyp 19-EF3030 $\Delta$ PLY
S19-W	Serotyp19-EF3030

S2	Serotyp 2-D39
S3-6	Serotyp 3-6303
S3-A	Serotyp 3-A66.1
Scap	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
SRE	<i>sterol regulatory element</i>
Srebf1	<i>SRE binding transcription factor 1</i>
Srebf2	<i>SRE binding transcription factor 2</i>
SREBP	<i>SRE binding proteins</i>
THB	<i>Todd-Hewitt Broth</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
$T_m$	Schmelztemperatur
VBA	<i>Visual Basic for Applications</i>

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: wichtige Virulenzfaktoren von Pneumokokken mit ihren Funktionen .....	4
Tab. 2: Bakterielle Zusammensetzung der verwendeten humanen Faeces .....	19
Tab. 3: Komponenten zur Herstellung des Präinkubationsmix .....	24
Tab. 4: Komponenten zur Herstellung des Maininkubationsmix .....	25
Tab. 5: Basensequenzen der verwendeten Primer .....	28
Tab. 6: Temperatur und Zeitprotokoll der real-time quantitativen PCR .....	30
Tab. 7: Gegenüberstellung der PCR-Produktlängen des Herstellerdatenblattes und der Gelelektrophorese .....	34

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der transkriptionellen Regulation der HMG-CoA-Reduktase .....	10
Abb. 2: vereinfachte Einordnung der Erregervirulenz im Pneumoniemodell .....	15
Abb. 3: Darstellung der Behandlungsgruppen bei <i>S. pneumoniae</i> - induzierter Pneumonie.....	16
Abb. 4: Darstellung der Behandlungsgruppen im PCI-Modell (polymikrobielle Peritonitis).....	16
Abb. 5: Qualitätskontrolle durch RNA-Gelelektrophorese mit Experion® .	24
Abb. 6: Ermittlung von Ct-Werten .....	32
Abb. 7: Gelelektrophorese der PCR-Produkte zur Qualitätssicherung .....	34
Abb. 8: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Primereffizienz .....	36
Abb. 9: Darstellung der Expressionsstabilitätswerte der Housekeeperanalyse mittels geNorm und Normfinder für Pneumonie und Peritonitis.....	43
Abb. 10: hepatische Expression von <i>Hmgcr</i> im Pneumoniemodell (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> ) und Peritonitismodell (B) .....	50
Abb. 11: hepatische Expression von <i>Mvd</i> im Pneumoniemodell (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> ) und Peritonitismodell (B) .....	53
Abb. 12: hepatische Expression von <i>Fdps</i> im Pneumoniemodell (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> ) und Peritonitismodell (B) .....	56
Abb. 13: hepatische Expression von <i>Scap</i> im Pneumoniemodell (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> ) und Peritonitismodell (B) .....	59
Abb. 14: hepatische Expression von <i>Insig1</i> im Pneumoniemodell (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> ) und Peritonitismodell (B) .....	62



---

Abb. 15: hepatische Expression von <i>Insig2</i> im Pneumoniemodell (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> ) und Peritonitismodell (B) .....	65
Abb. 16: hepatische Expression von <i>Srebf1</i> im Pneumoniemodell (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> ) und Peritonitismodell (B) .....	68
Abb. 17: hepatische Expression von <i>Srebf2</i> im Pneumoniemodell (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> ) und Peritonitismodell (B) .....	71
Abb. 18: Lanosterolspiegel in Pneumonie (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> ) - und Peritonitismodell (B).....	74
Abb. 19: Desmosterolspiegel in Pneumonie (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> ) - und Peritonitismodell (B).....	76
Abb. 20: Cholesterolspiegel im Pneumoniemodell (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> ).....	77
Abb. 21: Übersicht der Ergebnisse der Metabolomanalyse für Pneumonie- und Peritonitismodell .....	79
Abb. 22: Übersicht der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für Pneumonie- und Peritonitismodell.....	80

---

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungs-, Tabellen-, Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III - VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>13</b>
<b>3 Material und Methodik</b> .....	<b>14</b>
3.1 Studiendesign .....	14
3.2 Tierexperimente .....	17
3.2.1 Versuchstiere .....	17
3.2.2 <i>S.pneumoniae</i> -induzierte Pneumonie .....	18
3.2.3 Polymikrobielle Peritonitis.....	18
3.2.4 Euthanasie und Organentnahme.....	19
3.3 Prä-PCR-Analytik.....	20
3.3.1 RNA-Isolation aus Lebergewebe.....	20
3.3.2 Qualitätssicherung der isolierten RNA.....	21
3.3.2.1 Konzentrationsbestimmung / Kontaminationskontrolle..	21
3.3.2.2 RNA Qualitätskontrolle.....	22
3.3.3 Reverse Transkription .....	24
3.4 Real-Time-quantitative-PCR .....	26
3.4.1 Primerdesign .....	27
3.4.2 Primeretablierung .....	28
3.4.3 Experimentelles Setting.....	29
3.4.4 Bestimmung von Ct – Werten.....	31
3.4.5 Schmelzkurvenanalyse .....	32
3.4.6 PCR-Produkt Überprüfung durch Gelelektrophorese .....	33
3.4.7 Primereffizienzbestimmung durch Standardkurven .....	35
3.5 Post-PCR-Analytik .....	37
3.5.1 Referenzgen-Analyse mit geNorm und Normfinder.....	37
3.5.2 Relative Quantifizierung .....	38
3.5.3 Statistische Auswertung .....	40

---

3.6 Gewinnung und Auswertung der Metabolomdaten .....	41
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
4.1 Referenzgenanalyse .....	43
4.2 Genexpressionsanalyse.....	45
4.2.1 Expressionsmuster: Enzyme .....	48
4.2.1.1 Hmgcr .....	48
4.2.1.2 Mvd .....	51
4.2.1.3 Fdps .....	54
4.2.2 Expressionsmuster: Transkriptionsfaktorenaktivität modifizierende Membran- und Transportproteine.....	57
4.2.2.1 Scap.....	57
4.2.2.2 Insig1 .....	60
4.2.2.3 Insig2 .....	63
4.2.3 Expressionsmuster: Transkriptionsfaktoren.....	66
4.2.3.1 Sreb1 .....	66
4.2.3.2 Sreb2 .....	69
4.3 Metabolomanalyse.....	72
4.3.1 Lanosterol.....	73
4.3.2 Desmosterol .....	75
4.3.3 Cholesterol .....	77
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>78</b>
<b>6 Schlussfolgerungen.....</b>	<b>96</b>
<b>7 Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>8 Danksagung.....</b>	<b>114</b>
<b>9 Lebenslauf .....</b>	<b>115</b>
<b>10 Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>116</b>

## 1 Einleitung

Die adaptive Wirtsreaktion gehört zum körpereigenen System zur Abwehr der Auswirkungen akuter Zellschäden auf die Funktion lebenswichtiger Organe. Eine entscheidende Rolle für das Outcome des Organismus spielt vor allem die Ausprägung und Dauer dieser Reaktion, denn bei einer überschießenden, unbalancierten Wirtsreaktion wird ein komplexes Netzwerk aus molekularen Kaskaden ausgelöst, welches auch zu Gewebeschäden, Organversagen und letztendlich zum Tode des Wirtes führen kann (Hotchkiss und Karl 2003, Gustot 2011).

Die schwerste Manifestation einer adaptiven Wirtsreaktion ist das Multiorgan-dysfunktionssyndrom (MODS). Es handelt sich hierbei um eine progressive, potentiell reversible Dysfunktion in zwei oder mehr Organen oder Organsystemen, die bei kritisch kranken Patienten auftritt. Auslöser sind Traumata, Schockzustände, Verbrennungen, Pankreatitis, schwere Infektionen und Sepsis (Moerer et al. 2002, Wang und Ma 2008). Insbesondere die Lunge, das Gerinnungssystem, die Leber, der Gastrointestinaltrakt und die Nieren sind betroffen (Deitch 1992, Wickel et al. 1997). Die Entwicklung eines Multiorgan-dysfunktionssyndroms tritt häufig im Zusammenhang mit Sepsis auf und ist mit einer schlechten Prognose verbunden (Wang und Ma 2008).

Sepsis beschreibt das Kontinuum eines sehr heterogenen Krankheitsbildes, welches durch die komplexe systemische inflammatorische Wirtsreaktion auf eine generalisierte Infektion ausgelöst wird (Bone et al. 1989). Mit einer bei ITS Patienten in Deutschland auftretenden Prävalenz von 11% für schwere Sepsis und einer Krankenhaussterblichkeit von 55%, stellt dieses Erkrankung nach wie vor eine große medizinische und ökonomische Herausforderung dar (Engel et al. 2007).

Die Wirtsantwort auf Sepsis beinhaltet viele gleichzeitig ablaufende Prozesse, die häufig auch antagonistisch wirken: Sie umfasst sowohl

Hyperinflammation als auch Immunsuppression, welche durch eine komplexe dynamische Interaktion zwischen Pathogenen und der Wirtsimmunabwehr verursacht werden (van der Poll und Opal 2008).

Die Hyperinflammation kann laut einer Studie von Shields et al. von 2011 durch sogenannte körpereigene RAMPs (*resolution-associated molecular patterns*) begrenzt bzw. beendet werden, indem den inflammatorischen Effekten von exogenen PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) und endogenen DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) entgegengewirkt wird (Shields et al. 2011). PAMPs sind evolutionär konservierte, nicht redundante mikrobielle Moleküle, welche mittels PPRs (*pattern recognition receptor*) vom Wirtsimmunsystem erkannt werden und so eine angeborene Immunreaktion triggern können (Janeway 1989). DAMPs hingegen sind endogene Moleküle, welche bei zellulärem Stress, Insult oder Nekrose schnell freigesetzt werden und zu einer Gewebsentzündung führen können (Matzinger 2002).

Eine große Bedeutung für die Pathogendisseminierung und Verursachung von schwerer Sepsis, haben dabei die Faktoren Erregervirulenz, Infektionsdosis und Infektionsfokus. Sie beeinflussen wesentlich, ob Pathogene die angeborenen und erworbenen immunologischen Abwehrmechanismen durchbrechen können (van der Poll und Opal 2008). Allerdings ist bisher ein Großteil dieser Pathogen-Host Interaktionen nur unzureichend erforscht, so dass sich bei genauerer Aufklärung mögliche Ansätze für eine kausale, erregerspezifische Therapie ergeben könnten.

### **Pneumonie als häufiger Auslöser einer Sepsis**

Häufigste infektiöse Foki bei Patienten mit schwerer Sepsis in den USA und Europa sind Atemwegsinfektionen, gefolgt von intra-abdominellen Infektionen (Martin et al. 2003, Engel et al. 2007, Blanco et al. 2008).

*Streptococcus pneumoniae* ist die Hauptursache von ambulant erworbenen Pneumonien (Ortqvist et al. 2005). Dabei entwickeln bei schwerer

Ausprägung einer CAP fast 50% der Patienten septische Komplikationen (Dremsizov et al. 2006). Diese weisen bis zu 50%ige Mortalitätsraten auf und sind in Abhängigkeit von Risikofaktoren, wie Alter und Vorerkrankungen, zu betrachten (Leroy et al. 1995, Ewig und Torres 2002, Kaplan et al. 2002).

Es handelt sich bei den Erregern (Pneumokokken = *S. pneumoniae*) um Polysaccharidkapseln-bildende Gram-positive Diplokokken, welche, besonders bei Kindern, asymptomatisch in der physiologischen Flora des Nasopharynx vorkommen können (Shouval et al. 2006). Pneumokokken sind in der Lage vom Infektionsort aus zu disseminieren und verursachen neben Pneumonie außerdem Otitis media, Meningitis und Bakteriämie (Paterson und Orihuela 2010). Über 90 verschiedene Serotypen werden anhand der Polysaccharidkapselantigene unterschieden, von denen nur eine begrenzte Zahl pathogene Eigenschaften besitzt (McGee et al. 2001). Früher wurde die Polysaccharidkapsel, welche das Bakterium primär vor Phagozytose durch Makrophagen schützt, als wichtigster Virulenzfaktor der Pneumokokken angesehen, da kapsellose Pneumokokken apathogen sind (Kalin 1998). Heutzutage jedoch gelangen weitere Proteine als Virulenzfaktoren in den Fokus, die direkte Wirkungen auf das Gewebe des Wirtes haben bzw. der Verbergung der körperfremden Bakterienoberfläche vor dem Wirtsimmunsystem dienen (Jedrzejewski 2001). Diese sind unter anderem Hyaluronidasen, Neuraminidase A und B, Autolysine (Lock et al. 1988), Pneumokokken-Oberflächenprotein A (McDaniel et al. 1991), Pneumokokken-Oberflächenadhäsine A (Sampson et al. 1994) und Pneumolysin (Feldman et al. 1991). In Tab. 1 sind wichtige Virulenzfaktoren mit ihren Funktionen für den Erreger dargestellt.

**Tab. 1: wichtige Virulenzfaktoren von Pneumokokken mit ihren Funktionen**

erstellt nach dem Review: „*Streptococcus pneumoniae* : virulence factors and variation“ (Mitchell 2010)

Virulenzfaktor	Funktion
Polysaccharidkapsel	Schutz vor Phagozytose durch Makrophagen
Pneumolysin (PLY)	membrancholesterolabhängige Wirtszellyse
Hyaluronidase (Hyl)	Zerstörung der extrazellulären Matrix => Disseminierung
Neuraminidasen (NanA, NanB)	Freilegung potentieller Bindungsstellen für Adhäsion
Autolysine (LytA, LytB, LytC)	Degradierung der Bakterienzellwand, Pneumolysinfreisetzung
Pneumokokken-Oberflächenantigen A (PsaA)	Adhäsion an E-Cadherin
Pneumokokken-Oberflächenproteine (PspA, PspC)	Adhäsion, Faktor H Bindung => Inhibition des Komplementsystems
Pneumokokken-Adhärenz und Virulenz-faktor A (PavA)	Fibronectinbindung => Adhäsion an endotheliale Zellen
Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase und Enolase	Plasminogenbindung => erleichterte Membranmigration
Pneumokokken Pili	Adhäsion, Kommunikation zwischen Pneumokokken

Pneumolysin (PLY) nimmt unter diesen Virulenzfaktoren eine bedeutende Rolle ein. Es handelt sich um einen multifunktionellen Virulenzfaktor, welcher entscheidend zur intrapulmonalen Disseminierung in der frühen Pathogenese einer *S. pneumoniae* Infektion beiträgt (Marriott et al. 2008). Durch seine zytotoxische Wirkung auf respiratorisches Epithel und Endothel, zerstört PLY pulmonale Gewebsbarrieren, welche als mechanische Erregerabwehr dienen (Steinfurt et al. 1989, Rayner et al. 1995). Zudem wird ein Alveolarödem gebildet, das wichtige Substrate für das Bakterienwachstum liefert und somit die weitere Invasion und systemische Ausbreitung der Pneumokokken erleichtert (Rubins und Janoff 1998). Durch direkte inhibitorische Effekte auf Chemotaxis und bakterizide Wirkungen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowie durch Aktivierung des

Komplementsystems wird außerdem die immunologisch gesteuerte bakterielle Clearance aus Interstitium und Blut gestört (Rubins und Janoff 1998). Das 53kDa große Protein konnte in nahezu allen klinischen Pneumokokkenisolaten nachgewiesen werden (Kalin et al. 1987, Paton et al. 1993) und wird aus dem Cytoplasma nach Autolyse durch Autolysine oder mögliche aktive Sezernierung freigesetzt (Balachandran et al. 2001).

PLY gehört zudem zur Gruppe der Cholesterol abhängigen Zytolysine (*cholesterol-dependent cytolysins*, CDC), die als Virulenzfaktoren pathogener Gram-positiver Bakterien wirken (Jedrzejewski 2001). Nach Bindung am Cholesterol der Wirtszellmembran werden, ähnlich dem MAC (*membrane attack complex*) des Komplementsystems, aus wasserlöslichen PLY-Monomeren große Transmembranporen aus 30-50 PLY-Einheiten polymerisiert, die schließlich zur Zytolyse führen (Rubins und Janoff 1998, Kelly und Jedrzejewski 2000, Gilbert 2010). Dabei ist eine Pneumolysin bedingte Lyse ohne Cholesterolkomponente in der Wirtszellmembran nicht möglich (Watson et al. 1972, Andrew et al. 1997). In vitro Studien und in vivo Studien an Mäusen zeigten zudem, dass die Gabe von freiem Cholesterol eine Störung der zytolytischen Effekte von PLY zur Folge haben kann (Nollmann et al. 2004, Weber et al. 2012).

Außerdem ist das Wirtsimmunsystem in der Lage, Pneumolysin über den Pattern Recognition Receptor TLR4 zu erkennen (Malley et al. 2003, Srivastava et al. 2005). Pneumolysin spielt somit eine ambivalente Rolle für Wirtsreaktion: zum einen als pathogenitätsvermittelnder Virulenzfaktor und zum anderen als PAMP, der die schützende angeborene Immunreaktion auslösen kann (Marriott et al. 2008).

Es existieren zahlreiche Modelle für Pneumokokkensepsis, darunter die intranasale- oder intratracheale Instillation (Bergeron et al. 1998, Moine und Mazoit 1999) und das Niedrigdosis Aerosolmodell (Nueremberger et al. 2005). Andonegui et al. zeigten, dass intratracheale Inokulation von



*S. pneumoniae* im murinen Modell nicht nur zu Pneumonie, sondern auch zur Bildung eines MODS führt, auch in dem Falle, dass nur wenigen Pneumokokken die Invasion ins Blut gelingt. Dieses Modell ist damit geeignet für die Untersuchung der Progression von einer Pneumonie zu einem septischem MODS (Andonegui et al. 2009).

### **Sekundäre Peritonitis als zweithäufigster Fokus bei schwerer Sepsis**

Die sekundäre Peritonitis als zweithäufigster infektiöser Fokus bei Patienten mit schwerer Sepsis ist definiert als die Invasion des sterilen Peritonealraumes mit Mikroorganismen nach Perforation des Gastrointestinaltraktes (Calandra und Cohen 2005). Häufige Ursachen sind Divertikulitis, Appendizitis und Anastomoseninsuffizienz nach chirurgischen Interventionen (Marshall 2004). Aufgrund der Pathogenese handelt es sich in der Regel um eine polymikrobielle Infektion (Brook 2008). Die Letalität schwankt dabei zwischen 5% in Geringrisikogruppen und 90% in Hochrisikogruppen mit einer durchschnittlichen Letalität von 18% (Koperna und Schulz 1996, Evans et al. 2001).

Die sekundäre Peritonitis lässt sich im septischen Kontext durch das PCI-Modell (*Peritoneal Infection and Contamination*) an Ratten und Mäusen simulieren (Gonnert et al. 2011). Dabei führt eine, in den Peritonealraum gespritzte, Suspension humaner Faeces zu einer polymikrobiellen sekundären Peritonitis, welche sich zu einer progressiven Multiorgandysfunktion weiterentwickelt (Bauhofer et al. 2002, Gonnert et al. 2012).

### **Die Rolle der Leber bei Sepsis**

Bei Sepsis spielt die Leber eine Schlüsselrolle für die Abwehrmechanismen des Wirtes (Arias et al. 1988). Neben Hepatozyten kommen drei weitere nicht parenchymale Zelltypen in den Lebersinusoiden vor: Kupf-

fer-Zellen, sinusoidale endotheliale Zellen und Ito-Zellen (Kmiec 2001). Eine wichtige Rolle spielen dabei die Kupffer-Zellen: Sie sorgen für die Bakterien-clearance im Organ, die Inaktivierung bakterieller Produkte und Produktion aber auch Entfernung inflammatorischer Mediatoren (Cerra 1987). Sie sind in der Lage Bakterien sowie Endotoxine am Übertritt in die systemische Zirkulation zu hindern und stellen damit einen primären Abwehrmechanismus gegen portale Bakteriämie und Endotoxin-ämie dar (Ulevitch et al. 1979, Katz et al. 1991).

Hepatozyten dagegen können ihren Stoffwechsel über Rezeptoren für proinflammatorische Cytokine an die Begebenheiten einer Entzündungsreaktion anpassen, in dem sie die Gluconeogenese und die Aminosäureaufnahme steigern und außerdem die Synthese und Freisetzung von Akut-Phase Proteinen sowie Gerinnungs- und Komplementfaktoren erhöhen (Dhainaut et al. 2001).

Im Rahmen von Sepsis kommt es in der Leber als stoffwechselaktivstes Organ aber auch zu Schädigungen. Eine primäre Dysfunktion entsteht in den ersten Stunden der septischen Progression durch Schock und Leberhypoperfusion, welche zu Einschränkungen der Leberfunktion mit disseminierter intravasaler Gerinnung und häufigen Blutungskomplikationen führt (Bankey 1992). Die sekundäre Dysfunktion hingegen bildet sich durch eine Überreaktion der adaptiven Wirtsantwort, welche eine Akkumulation an proinflammatorisch aktiven Zellen und Mediatoren verursacht und in einem erheblichen Kollateralschaden der Lebersinusoide münden kann (Cerra et al. 1979). Durch diese Prozesse kann es zu einer Translokation von Bakterien, Endotoxinen und inflammatorischen Mediatoren in den systemischen Kreislauf kommen und somit kann zu einer Entstehung oder Aufrechterhaltung des Multiorganversagens beigetragen werden (Spapen 2008).

Eine Studie von Baratta et al. untersuchte die zelluläre Organisation der murinen Leber und ergab, dass das Organ Lebern anderer Säugetiere

gleich und daher als Tiermodell für Untersuchungen zur Leberstruktur und Funktion geeignet ist (Baratta et al. 2009).

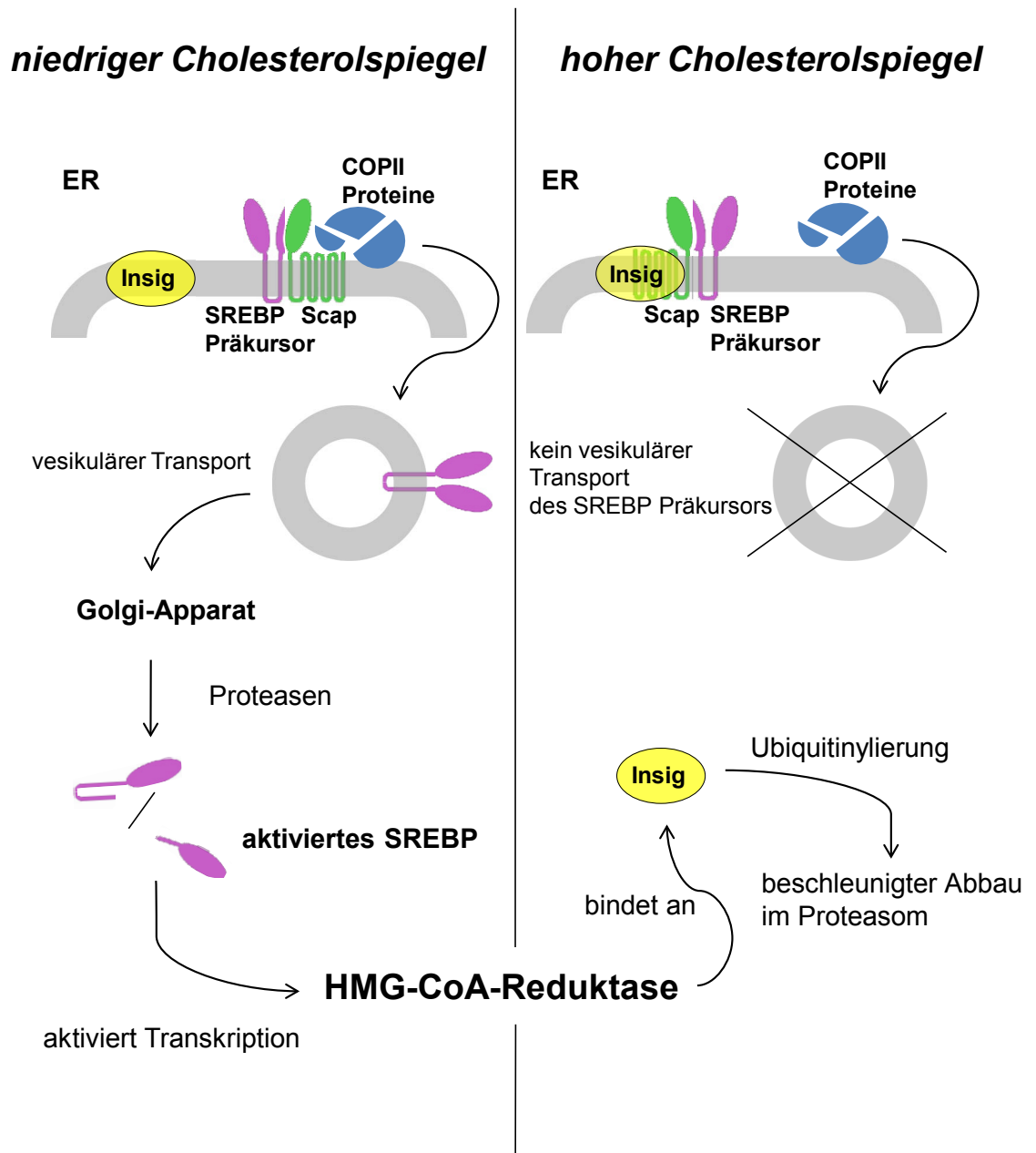
### **Cholesterolsynthese und ihre Regulation**

Im Kontext der beobachteten Einschränkung der Lebersinusoidsgewebsbarriere bei Sepsis ist eine nähere Betrachtung der Cholesterolsynthese von Bedeutung, welche maßgeblichen Einfluss auf die Membranintegrität von Zellen hat (Yeagle 1985). Observationsstudien zeigen, dass Sepsis mit Multiorganversagen oft mit einer Senkung der Cholesterolevel einhergeht (Fraunberger et al. 1999, Chiarla et al. 2004). Die Ausprägung der Hypcholesterolämie kombiniert mit einer gleichzeitigen Erhöhung des CRP-Spiegels (*C-reaktives-Protein*) korreliert dabei mit der Schwere der Akute-Phase Reaktion und der Wahrscheinlichkeit der Entwicklung septischer und metabolischer Dekompensation (Chiarla et al. 2004, Chiarla et al. 2010). Da diese Korrelation für alle drei Beobachtungszeitpunkte (Aufnahme in die ITS; 2 Tage nach Aufnahme; Entlassung/Tod des Patienten) in der Studie vom Memis et al. konsistent war, könnte der Befund, Hypcholesterolämie und erhöhte CRP-Konzentration, bei schwerer Sepsis als hilfreicher Prädiktor zur Erkennung von Hochrisikopatienten genutzt werden (Memis et al. 2007). Die hier beschriebenen Beobachtungen wurden allerdings unabhängig vom Infektionsfokus gemacht und genauere kausale Zusammenhänge zwischen Hypcholesterolämie, Infektionsfokus und Prognose sind noch nicht ausreichend erforscht.

Cholesterin ist nicht nur ein wichtiger Bestandteil für die Architektur und Funktion von Zellmembranen, sondern dient auch als Grundbaustein für die Biosynthese von Vitamin D, von Steroidhormonen und von Gallensäuren (Rodriguez-Acebes et al. 2009). Es ist aus Acetat-Einheiten aufgebaut und wird bevorzugt in der Leber gebildet.

In den ersten Schritten im Cytosol verknüpft die Thiolase zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA und durch Kondensation mit einem weiteren Acetyl-CoA entsteht  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Im nächsten Schritt wird HMG-CoA im endoplasmatischen Retikulum (ER) durch die HMG-CoA-Reduktase (*Hmgcr*) unter Verbrauch von zwei Molekülen NADPH zu Mevalonat reduziert. Diese irreversible Reaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Cholesterolsynthese und die HMG-CoA-Reduktase fungiert als Schlüsselenzym (Miziorko 2011). Die weiteren Reaktionen finden hauptsächlich in den Peroxisomen statt. Hier reagiert Mevalonat durch die Mevalonat-Decarboxylase (*Mvd*) zu 5-Phosphomevalonat. Die folgenden Syntheseschritte umfassen Phosphorylierungen mittels Kinasen, Decarboxylierung zu Isopentenylpyrophosphat als aktive Isopren-Einheit und nachfolgende Umsetzung zu Geranyldiphosphat und durch Farnesyldiphosphat-Synthetase (*Fdps*) zu Farnesyldiphosphat. Anschließend entsteht im glatten endoplasmatischen Retikulum in einer Kopf-Kopf Kondensation Squalen (Miziorko 2011). Im gleichen Zellkompartiment wird über ein reaktives Zwischenprodukt Lanosterol gebildet, welches schließlich in 19 aufeinanderfolgenden Reaktionen über die direkte Vorstufe Desmosterol zu Cholesterol umgewandelt wird (Avigan und Steinberg 1961). Die Bedeutung von Cholesterol für den Organismus wird durch die Energiebilanz dieses Prozesses unterstrichen: Für die Synthese eines Cholesterolmoleküls werden Energieäquivalente in Form von Acetyl-CoA verbraucht, welche bei vollständiger oxidativer Phosphorylierung ca. 180 ATP Moleküle ergeben würden (Brown und Goldstein 1986, Goldstein und Brown 1990, Stark 2003).

Von großer Bedeutung für die Anpassung der Biosyntheseaktivität an die Bedürfnisse des Zellstoffwechsels ist die komplexe transkriptionelle Regulation des Schlüsselenzyms der Cholesterolsynthese HMG-CoA-Reduktase (Abb. 1).



**Abb. 1: Darstellung der transkriptionellen Regulation der HMG-CoA-Reduktase**

Diese vereinfachte Darstellung wurde adaptiert nach Goldstein et al. 2002.  
 Erläuterung: siehe Text.

Eine wichtige Rolle spielen dabei *sterol regulatory element binding proteins* (SREBPs), welche als Vorläuferproteine in die Membran des glatten ER eingebaut werden (Brown und Goldstein 1997, Horton et al. 2002). Zur SREBP Familie in der Leber gehören die Isoformen SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP-2: SREBP-1a und SREBP-1c werden durch das Gen **Srebf1** kodiert und beeinflussen vor allem die Fettsäure-, Phospholipid- und Triglyceridsynthese (Horton et al. 1998). SREBP-2 hingegen wird durch **Srebf2** kodiert und beeinflusst hauptsächlich die Cholesterolsynthese (Horton et al. 2002, Rodriguez-Acebes et al. 2009). Dabei sind die Wirkungen der SREBP-Isoformen nicht auf einen Stoffwechselweg festgelegt und überschneiden sich teilweise (Shimano et al. 1997).

Die SREBP Präkursorproteine binden direkt nach ihrer Synthese an das Membranprotein Scap (*SREBP cleavage-activating protein*, Transkript: **Scap**) (Sakai et al. 1997). Ist Cholesterol in den Zellmembranen aufgebraucht, vermittelt Scap den Transport des SREBP Komplexes mit Hilfe von COPII (*coat protein complex II*)-umhüllten Vesikeln vom ER zum Golgi Apparat (Aridor et al. 1998, Antony et al. 2001, Barlowe 2002). Daraufhin erfolgt im Golgi-Apparat die sequentielle Spaltung der Präkursor-SREBPs durch Site-1- und Site-2 Proteasen, unter Freisetzung der N-terminalen Domäne des Proteins, welche dem aktivierten Transkriptionsfaktor SREBP entspricht (Espenshade et al. 1999, Zelenski et al. 1999). Dieser gelangt in den Zellkern, bindet an die spezifische Nukleotidsequenz der SREs (*sterol regulatory elements*) in der Promotorregion der Zielgene und aktiviert so unter anderem die Transkription der HMG-CoA-Reduktase (Brown und Goldstein 1999).

Steigt der Cholesterolgehalt in der ER Membran an, führt dies zu einer Konformationsänderung von Scap, so dass nun eine Bindung an die Ankermembranproteine des ER Insig-1 und Insig-2 (Produkte der insulin-induced Gene 1 und 2) ermöglicht wird. Diese Interaktion verhindert die Bildung von Transportvesikeln zum Golgi-Apparat und letztlich die

Freisetzung des maturierten SREBP Transkriptionsfaktors (Goldstein et al. 2002, Sun et al. 2005). Die beschriebene Inhibition funktioniert nur dann, wenn sowohl genügend Cholesterol als auch genügend am SREB-Scap Komplex stabilisiertes Insig vorhanden ist (Goldstein et al. 2006). Insig-1 und Insig-2 unterscheiden sich in der Regulation ihrer Genexpression: **Insig1** mRNA wird nur bei Anwesenheit des aktiven Transkriptionsfaktor SREBP im Zellkern gebildet und degradiert, wenn es nicht an Scap gebunden ist, innerhalb von 30 min (Mohn et al. 1991, Gong et al. 2006). **Insig2** hingegen wird auf niedrigem konstitutivem Niveau unabhängig von SREBP exprimiert und hat eine wesentlich längere Halbwertszeit (Yabe et al. 2002, Lee und Ye 2004, Gong et al. 2006).

Zusätzlich zu Regulation der Transkription existiert für die HMG-CoA-Reduktase ein weiterer Mechanismus: Bei Akkumulation von Cholesterol und seinen Zwischenprodukten kommt es zu einer beschleunigten Degradierung (Skalnik et al. 1988). Das Enzym bindet in diesem Falle in der ER-Membran an Insig und wird nach Ubiquitynylierung sowie Extraktion aus der Membran im Proteasom mit einer Halbwertszeit von einer Stunde abgebaut (siehe Abb. 1) (Gil et al. 1985, Sever et al. 2003, Song et al. 2005). Die Effekte von Sterolen auf Scap und HMG-CoA-Reduktase werden über ihre sterol-sensing Domänen vermittelt, welche in beiden Fällen durch Konformationsänderung bei Anwesenheit von Sterolen die Bindung an Insig bewirken (Yang et al. 2000, Sever et al. 2003). Die Konsequenzen sind äußerst unterschiedlich: Während Scap im ER verbleibt, wird HMG-CoA abgebaut.

Die hier dargestellten Zusammenhänge implizieren die Notwendigkeit einer Untersuchung harter Parameter der Wirtsreaktion auf Cholesterolbiosyntheseebene in definierten Modellen für häufige Infektionsfoki mit spezifischen Erregerspektren, für ein besseres Verständnis spezifischer adaptiver Wirtsreaktionen bei Sepsis.

## 2 Zielsetzung

In einer vorangegangenen pangenomischen experimentellen Studie im Mausmodell zeigte sich eine differentielle Veränderung der Regulation der Cholesterolsynthese bei *S. pneumoniae* induzierter Pneumonie mit einem Sepsis verursachenden, hochvirulenten Serotyp (S2) und einer Lobärpneumonie verursachenden, niedrigvirulenten Serotyp (S19) sowie bei gemischt, Grampositiv-Gramnegativer Peritonitis (Weber 2009).

Folgende **Arbeitshypothesen** wurden aufgestellt:

Die Regulation der Cholesterolsynthese ist eine adaptive Wirtsreaktion der Leber bei Sepsis und ist dabei wesentlich vom Infektionsfokus und dessen Erregerspektrum abhängig. Durch Interaktion mit Pneumolysin stellt die selektive Induktion der Cholesterolsynthese bei Pneumonie einen Pathogen-spezifischen, protektiven Wirtszellmechanismus gegen die Progression einer Lobärpneumonie zur Sepsis dar. Bei polymikrobieller Peritonitis liegt diese Induktion nicht vor.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen soll eine Analyse der Regulation der Cholesterolsynthese im murinen Lebergewebe für die zwei häufigsten Infektionsfoki bei Sepsis, *S. pneumoniae*-Pneumonie (durch Pneumokokken unterschiedlicher Virulenz) und polymikrobielle Peritonitis, erfolgen. Auf Ebene des Transkriptom werden mittels RTq-PCR die für die Regulation der Cholesterolsynthese entscheidenden Transkriptionsfaktoren und Enzyme untersucht. Diese Daten werden auf Ebene des Metaboloms durch die Konzentrationen der Synthesewegzwischenprodukte (Lanosterol, Desmosterol) sowie des Endproduktes Cholesterols in Lebergewebe und Plasma ergänzt und anschließend in einer integrativen Datenanalyse ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können einen wichtigen Beitrag zur Erklärung eines Pathomechanismus auf Ebene der adaptiven Wirtsreaktion der Cholesterolsynthese mit einer möglichen klinischen Relevanz leisten.

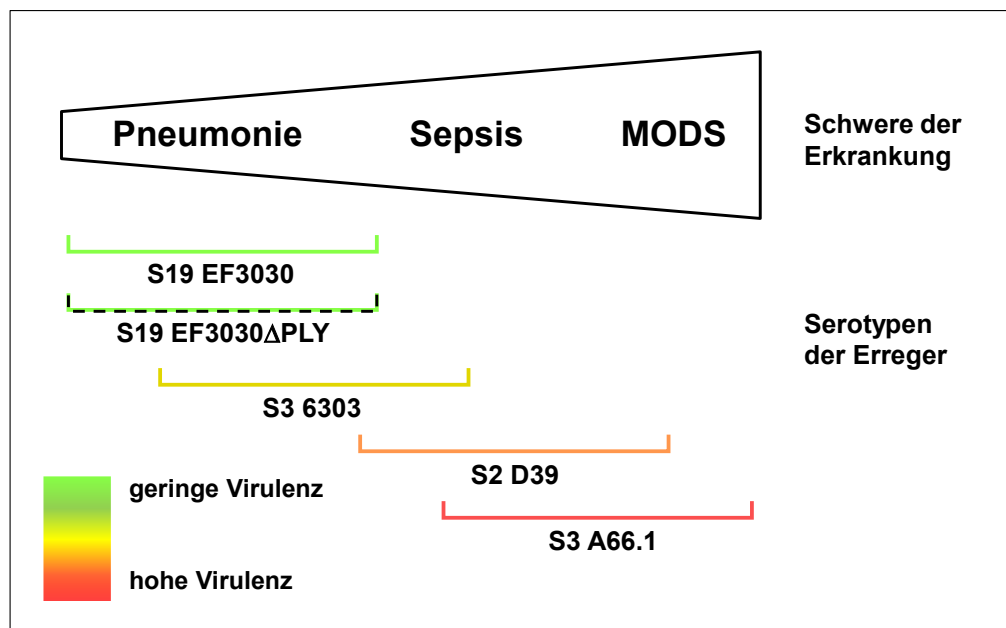


### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Studiendesign

Es handelt sich in der vorliegenden Arbeit um eine tierexperimentelle randomisierte Studie bestehend aus zwei gewichtsadaptierten experimentellen Gruppen:

1. Pulmonale Infektion mit *S.pneumoniae* durch intratracheale Instillation von  $1,0 \times 10^5$  KBE pro Maus (siehe Abb. 2 und Abb. 3)  
Folgende Serotypen des Erregers wurden verwendet:
  - **Serotyp 2 D39** (hochvirulent, sepsisauslösend)
  - **Serotyp 19 EF3030** (niedrigvirulent, lokale Pneumonie)
  - **Serotyp 19 EF3030 pneumolysindefizienter Stamm**
  - **Serotyp 3 A66.1** (hochvirulent, Sepsis innerhalb kürzester Zeit)
  - **Serotyp 3 6303** (niedrigvirulent, Bakteriämie)
2. Polymikrobielle Peritonitis, gemischt Gram-positiver und Gram-negativer Pathogene, durch intraperitoneale Injektion einer humanen Faeces-Suspension von  $5,5 \times 10^6$  KBE pro Maus (Abb. 4).

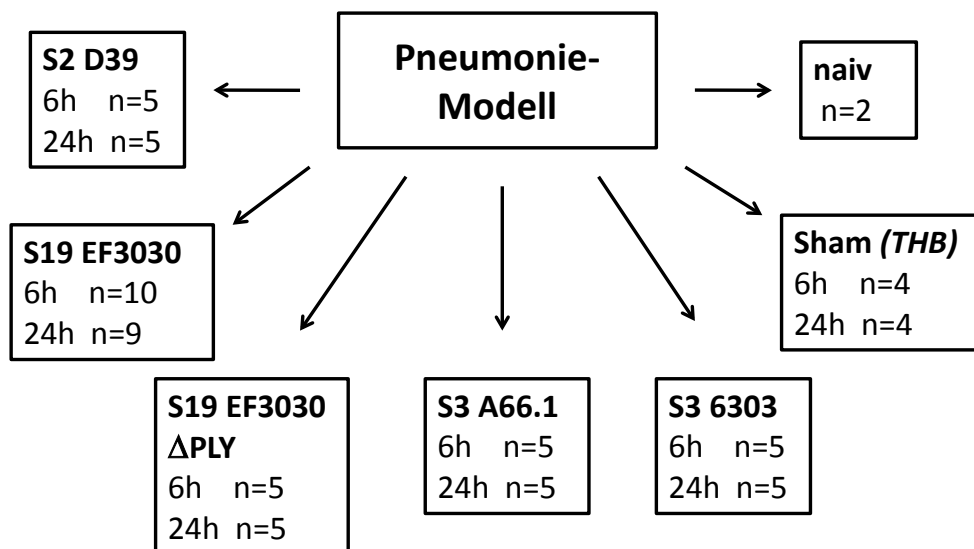


**Abb. 2: vereinfachte Einordnung der Erregervirulenz im Pneumoniemodell**

Der Farbcode entspricht der Darstellung im Ergebnisteil.

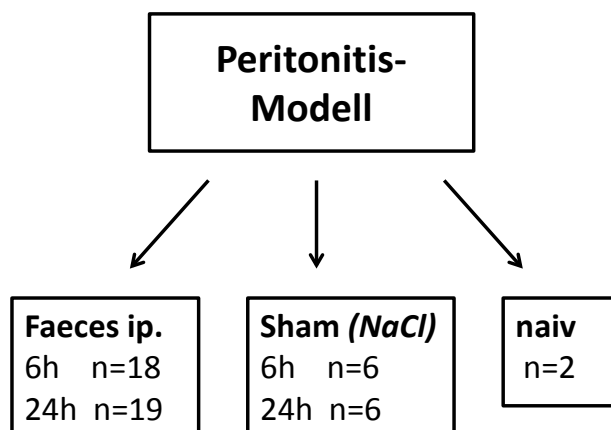
Eine weitere Einteilung der Gruppen erfolgte entsprechend den Organentnahmezeitpunkten mit Euthanasie 6h und 24h nach Infektion. Zur Abgrenzung von Effekten, die rein durch die experimentelle Prozedur der Infektion bedingt sind, wurde für beide Modelle eine Scheinbehandlungsgruppe („sham“) mitgeführt. Die Versuchstiere dieser Gruppen wurden, wie die Tiere der Infektionsgruppen, prinzipiell den gleichen experimentellen Abläufen unterzogen und bekamen statt der Bakteriensuspensionen nur die Trägersubstanz (*Todd-Hewitt Broth* bzw. physiologische Kochsalzlösung) verabreicht. Es wurden außerdem Lebern von unbehandelten Tieren in die Studie einbezogen, um eventuelle Stalleffekte zu identifizieren.

Stalleffekte sind Unterschiede in der Genexpression von Versuchstieren, die trotz formal gleicher Bedingungen durch die Aufzucht in verschiedenen Laboratorien auftreten können. Das experimentelle Design ist in den folgenden beiden Abbildungen dargestellt (Abb. 3 und Abb. 4.)



**Abb. 3:** Darstellung der Behandlungsgruppen bei *S. pneumoniae* - induzierter Pneumonie

Die jeweiligen Bezeichnungen der *S.pneumoniae* Serotypen, die Scheinbehandlung mit *Todd-Hewitt Broth* [„sham (THB)“] und unbehandelte Tiere [„naiv“] sind dick gedruckt. Die Organentnahme erfolgte zum Zeitpunkt von 6h und 24h nach Infektion. Für jede Gruppe wurde für die beiden Zeitpunkte die Anzahl „n“ der Versuchstiere gekennzeichnet.



**Abb. 4:** Darstellung der Behandlungsgruppen im PCI-Modell (polymikrobielle Peritonitis)

Für jede Behandlungsgruppe wurde die Anzahl der in dieses Experiment eingegangenen Versuchstiere für die Entnahmezeitpunkte 6h und 24h nach Infektion mit „n“ angegeben.

## 3.2 Tierexperimente

Die Tierexperimente an der Maus erfolgten für die beiden untersuchten Modelle in verschiedenen Laboratorien: Die Induktion der Pneumokokken-Pneumonie (Kapitel 3.2.2) mit nachfolgender Organentnahme wurde im Labor der Experimentellen Pneumologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Ulrich A. Maus durchgeführt und die Induktion der polymikrobiellen Peritonitis (Kapitel 3.2.3) fand in den Experimentierräumen des Infektionstierhauses 5 am Forschungszentrum Jena-Beutenberg in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Martina Weber und Herrn Benedikt Acht statt.

Die Versuche wurden nach Genehmigung durch die lokalen Tierschutzbehörden, dem *Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz* und dem *Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, durchgeführt.

### 3.2.1 Versuchstiere

Für die Tierexperimente wurden weibliche, 8 Wochen alte Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6 Jackson (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 16 – 20g verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte in einer je einer separaten Einheit des Infektionstierhauses 5 (Forschungszentrum Beutenberg, Jena) sowie des zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover unter vergleichbaren standardisierten Rahmenbedingungen. Bei 20-24°C Raumtemperatur, einer relativen Luftfeuchte von 50-60% sowie einem festen Tag-Nacht-Zyklus von je 12h hatten alle Tiere freien Zugang zu autoklavierter, pelletierter Standardnahrung und autoklaviertem, angesäuertem Wasser (pH 2,5 – 3,0). Es wurden ausschließlich Tiere mit normalem Fress- und Putzverhalten in die Versuche aufgenommen.

### 3.2.2 *S.pneumoniae*-induzierte Pneumonie

Zur intratrachealen Instillation der in Abschnitt 3.1 genannten Serotypen von *S. pneumoniae* wurden die Tiere mittels intramuskulärer Injektion von Rompun (Xylazinhydrochlorid, Bayer Vita GmbH, Köln, Deutschland) und Ketamin (Ketavet<sup>®</sup>, Pfizer Tiergesundheit, Berlin, Deutschland) anästhesiert. Anschließend wurden die Tiere intubiert (Tubus: 26G Abbocath<sup>®</sup>, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) und die endotracheale Instillation von *S.pneumoniae* ( $10^5$  KBE/Maus) bzw. eines äquivalenten Volumens (50µl) des Kulturmediums *Todd-Hewitt Broth* (THB, Difco Laboratories, Augsburg, Deutschland) bei den sham-Tieren durchgeführt. Die Tiere wurden nach dem Erwachen aus der Narkose weiter, wie unter Kapitel 3.2.1 beschrieben, bis zur Euthanasie versorgt.

### 3.2.3 Polymikrobielle Peritonitis

Nach lokaler Sprühdesinfektion wurden den Versuchstieren 200µl einer humanen Faeces-Suspension intraperitoneal mit einer Kanüle (20G, Sterican 100, Braun, Melsungen, Deutschland) in den linken unteren Quadranten des Abdomens injiziert. Die Suspension wurde aus 50µl Ausgangs-Faeces (Tab. 2) und 150µl steriler physiologischer Kochsalzlösung (Fresenius, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) hergestellt und ergab eine Infektionsdosis von  $5,5 \times 10^6$  KBE in 200µl. Dieses Tiermodell simuliert eine polymikrobielle Peritonitis (Lorenz et al. 1994, Bauhofer et al. 2002, Gonnert et al. 2011, Gonnert et al. 2012), wie sie beispielsweise nach Perforation des Colons bei Divertikulitis auftreten kann. Die Letalität in diesem Modell lag bei durchschnittlich 70% pro 24h. Den Mäusen der sham-Gruppe wurden 200µl einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung ohne Faeces-Suspension gespritzt.

**Tab. 2: Bakterielle Zusammensetzung der verwendeten humanen Faeces**

Es wurden humane Faeces Proben fünf gesunder Nicht-Vegetarier gepoolt und die Koloniezahlen durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena ermittelt. Angabe in der Koloniezahl in Kolonie bildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml)

obere Tabelle: Einteilung nach Bakterienspezies

untere Tabelle: Einteilung nach übergeordneter Gruppe

Bakterienspezies	Koloniezahl [KBE/ml]
<i>Escherichia coli</i>	$4,8 \times 10^5$
<i>G Streptokokken</i>	$2 \times 10^5$
<i>Enterokokken</i>	$5 \times 10^5$
<i>Klebsiella oxytoca</i>	$5 \times 10^4$
<i>Peptostreptokokken</i>	$3,6 \times 10^7$
<i>Veillonella</i>	$3,2 \times 10^7$
<i>Bacteroides</i>	$4,1 \times 10^7$
<i>Pervotella</i>	$1 \times 10^6$
<b>Gesamtkeimzahl</b>	<b><math>1,11 \times 10^8</math></b>

Übergeordnete Gruppen	Koloniezahl [KBE/ml]
<i>Aerobier</i>	$1,23 \times 10^6$
<i>Anaerobier</i>	$1,1 \times 10^8$
<i>Gram-positiv</i>	$3,67 \times 10^7$
<i>Gram-negativ</i>	$7,45 \times 10^7$

### 3.2.4 Euthanasie und Organentnahme

Die Euthanasie zur Organentnahme erfolgte durch intraperitoneale Gabe einer letalen Ketamindosis (200µl pro Tier; Ketavet® 1:1 verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung) im PCI-Modell oder durch Isofluranüberdosierung (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) im Pneumoniemodell. Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch Test des Lidreflexes erfolgte die Laparotomie und Eröffnung des Peritonealraumes mit Präparation und Punktion der *Vena cava caudalis* zur Blutentnahme. Zur Entnahme

wurden mit 200µl PAXgene Reagenz (PreAnalytix®, Qiagen, Hilden, Deutschland) vorbereitete Spritzen verwendet. Außerdem wurden Lungen, Herz, Leber, Nieren und die Milz steril entnommen, geteilt und jeweils ein Teil in 2,0ml Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C zur späteren RNA-Isolation sowie proteomischen Analysen gelagert. Der zweite Teil wurde in 4%iger Paraformaldehyd-lösung für 24h zur weiteren histologischen Aufarbeitung fixiert. Im Rahmen dieser Arbeit fanden ausschließlich schockgefrorene Leberproben sowie vorher entnommene Blutproben weitere Verwendung. Die übrigen Organe und die Proben zur histologischen Aufarbeitung sind Gegenstand anderer Untersuchungen und werden in dieser Arbeit nicht diskutiert.

### **3.3 Prä-PCR-Analytik**

#### **3.3.1 RNA-Isolation aus Lebergewebe**

Die Isolation wurde im RNA-Labor des Tierhaus 5, Forschungszentrum Beutenberg, Jena, nach dem Protokoll „Purification of total RNA from Animal Tissues“ des RNeasy Mini Kits von Qiagen® (Hilden, Deutschland) durchgeführt. In Rahmen der vorgelegten Arbeit wird RNA ausschließlich aus Lebergewebe, welches bei -80°C gelagert wurde, isoliert. Im gesamten molekularbiologischen Teil wurde eine Negativkontrolle ohne Lebergewebe mitgeführt um systematische Fehler im Ablauf auszuschließen. Die Leberproben wurden unter einer Sicherheitswerkbank mittels Einwegskalpellens (Dahlhausen®, Köln, Deutschland) auf maximal 30mg zugeschnitten (Feinwaage: Sartorius®, Göttingen, Deutschland). Hierbei wurden als Unterlage, auf Trockeneis gesetzte, Petrischalen (Tissue Culture Dishes, Greiner Bio-one®, Kremsmünster, Österreich) verwendet, um die Wirkung von RNasen während des Zuschneidens zu minimieren. Vor diesem Schritt ist der Lysepuffer aus 10,0µl β-Mercaptoethanol

pro ml RLT-Puffer des RNeasy Kits vorzubereiten.

Die geschnittenen Proben wurden sofort in, mit 600µl RLT-Buffer gefüllte, 2,0ml Safe-Lock Tubes der Firma Eppendorf® (Hamburg, Deutschland) gegeben und nach Zugabe von je einer 5mm Stahlkugel der Firma Retsch® (Haan, Deutschland) mit Hilfe des TissueLyser (Qiagen®, produziert von Retsch, Haan, Deutschland) für 4min bei 30Hz mechanisch aufgeschlossen.

Das Homogenisat wurde daraufhin mit Stahlkugel auf Trockeneis durchgefroren, um beim nächsten Arbeitsschritt eine Gleichbehandlung der Proben sicherzustellen. Nach Abpipettierung des Lysats in 1,5ml Spitzboden-Tubes (Sarstedt®, Nümbrecht, Deutschland) erfolgte eine drei-minütige Zentrifugation bei 13000xg (Biofuge® Fresco, Heraeus®, Hanau, Deutschland) zur Entfernung von Zelltrümmern. Die RNA des Überstands wurde daraufhin vollautomatisiert im QIAcube (Qiagen®, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll „Large Sample for animal tissues and cells“ für das RNeasy Mini Kit, extrahiert. Im Gerät wird den Proben 70%iger Ethanol hinzugefügt, um eine selektive Bindung der RNA an die Säulenmembran zu ermöglichen. Über Zentrifugationsschritte mit den Waschpuffern „Buffer RW1“ und „Buffer RPE“ werden Kontaminationen ausgewaschen. Im letzten Schritt wird die RNA in RNAase freiem Wasser eluiert. Während nachfolgender Untersuchungen wurde die gewonnene RNA ausschließlich in Eiswasserbad stehend verarbeitet, um die Gefahr des Verdauens der RNA zu verringern.

### **3.3.2 Qualitätssicherung der isolierten RNA**

#### **3.3.2.1 Konzentrationsbestimmung / Kontaminationskontrolle**

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Spektrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies®, Wilmington, USA) im Tierhaus 5, Beutenberg Campus in Jena. Jede Probe wurde vor der Messung mit einer 20µl Pipette gemischt und in 2-3-fach Bestimmung vermessen. 1,5µl Probe pro



Messung wurden zwischen zwei fiberoptische Fasern gebracht. Durch Oberflächenspannung bildet sich eine Brücke der Probe zwischen beiden Fasern, so dass mittels eines gepulsten Xenon-Lasers der Lichtdurchtritt im Sample durch das Spektrometer erfasst werden kann. Die Auswertung erfolgte mit der Software des Gerätes: ND-1000 v3.71. Neben der RNA-Konzentration bei 260 nm werden die Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm/280nm und 260 nm/230nm ermittelt.

260/280: zeigt mögliche Kontaminationen durch Proteine, Phenole und andere Stoffe die bei 280 nm absorbieren. Quotienten um 2,0 sind allgemein als „rein“ für RNA akzeptiert. Werte kleiner als 1,5 indizieren eine starke Verunreinigung, welche die nachfolgenden Untersuchungen ungünstig beeinflussen kann.

260/230: Dieser Quotient ist ein sekundäres Merkmal für die Reinheit der Nukleinsäureprobe und erfasst niedermolekulare Verunreinigungen mit z.B. Puffersubstanzen und Detergentien. Im Idealfall liegen die Werte zwischen 1,8 und 2,2. Sämtliche gemessenen Quotienten lagen bei Werten von ca. 2, waren aber nie kleiner als 1,7. So konnten alle RNA Proben uneingeschränkt in folgende Analysen mit einbezogen werden. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80°C.

### **3.3.2.2 RNA Qualitätskontrolle**

Die Beurteilung der RNA-Qualität ist der erste kritische Schritt, um aussagekräftige Genexpressionsdaten zu ermöglichen, da die Verwendung von RNA mit niedriger Qualität die Ergebnisse nachfolgender Experimente erheblich stören kann (Fleige und Pfaffl 2006). Ein messbarer Einfluss der RNA Integrität auf die Variation von Referenzgenen wurde bereits nachgewiesen (Vermeulen et al. 2011). Die Qualitätskontrolle erfolgte mit Hilfe automatisierter Elektrophorese des Experion® Systems (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, USA) nach Kurzprotokoll des „RNA Standard Sens Kit“ im Forschungszentrum Lobeda. Diese auf Mikrokapillarelektrophorese

basierende Methode zeichnet sich durch geringe benötigte RNA-Mengen aus und ist weitestgehend nutzerunabhängig. Damit wird eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht (Imbeaud et al. 2005). Die zu untersuchenden Proben werden in einen Gel tragenden Chip pipettiert und durch ein elektrisches Feld der Größe nach aufgetrennt. Durch einen intercalierenden Farbstoff werden die RNA Fragmente in einer laseroptischen Messung erfasst.

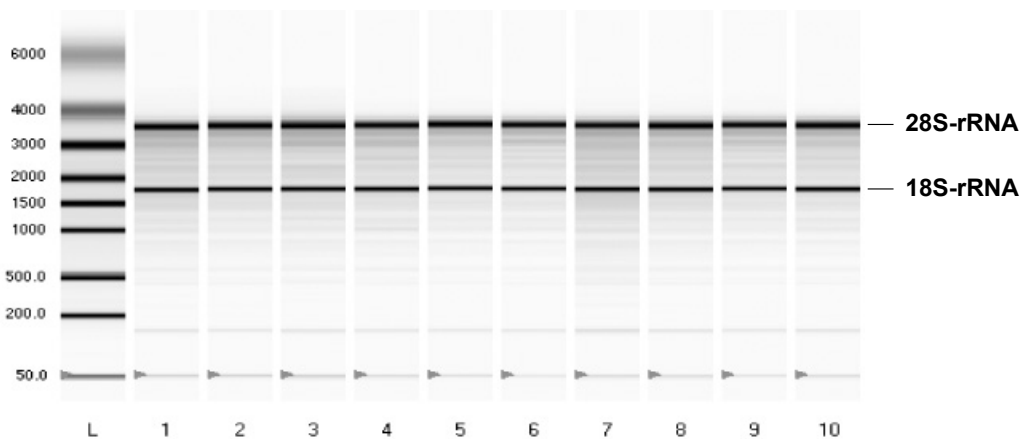
Zur Vorbereitung wurden je 2,0µl Aliquots der Proben auf eine einheitliche Ausgangskonzentration verdünnt (z.B. 300ng/µl), um im Elektrophoresegel eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen. Danach wurden je 2,0µl dieser Verdünnungen und 1,3µl des RNA Ladders bei 70°C für 2min denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzuschließen, und anschließend auf Eis abgeschreckt.

Nach Priming des Elektrophoresechips und Pipettieren der Proben in die entsprechenden Sample Wells erfolgte die Elektrophorese laut Protokoll des Herstellers.

Die RNA-Integrität lässt sich zum einen über die Schärfe der ribosomalen 18S und 28S Banden der Elektrophorese (Abb. 5) und zum anderen über den RQI (RNA Quality Indicator) bestimmen. Dabei nutzt die Software des Gerätes einen Algorithmus, welcher die Elektropherogramme der untersuchten RNA-Proben mit einer Reihe von standardisierten, degradierten RNA-Proben vergleicht. Ein Wert von 1 entspricht hierbei stark degradierter RNA und ein Wert von 10 einer völlig intakten RNA.

Wie in Abb. 5 ersichtlich, zeigten sich in der Elektrophorese des Experion Systems jeweils zwei prominente, scharf abgegrenzte Banden, welche der ribosomalen 28S RNA und 18S RNA entsprechen. Als diffuses Bandenmuster sind mRNA Moleküle unterschiedlicher Länge zu erkennen. Da alle detektierten Banden eine definierte Form aufweisen und nicht verschmieren, kann von einer guten bis sehr guten RNA-Integrität ausgegangen werden. Außerdem lagen die RQI-Werte minimal bei einem Wert von 6,5.

Damit konnten alle RNA-Proben uneingeschränkt in weiterführenden Analysen verwendet werden.



**Abb. 5: Qualitätskontrolle durch RNA-Gelelektrophorese mit Experion®**

Die repräsentative Abbildung zeigt das Bandenmuster von 10 RNA-Proben und des Standardladders L (Nukleotidanzahl links angegeben). Es zeigen sich klar definierte 28S und 18S-rRNA Banden ohne Verschmierungen, so dass von strukturell einwandfreier RNA ausgegangen werden kann. mRNA zeichnet sich durch blässere Banden ab. Dargestellte Dreiecke bei 50,0 Nukleotiden sind Indikatoren für die korrekte Messung des Systems.

### 3.3.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription erfolgte mit dem RevertAid® First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas® (St. Leon-Rot, Deutschland). Die Proben wurden auf eine RNA Menge von 1,5µg in 9,8µl DEPC Wasser verdünnt. Anschließend erfolgte die Herstellung des Präinkubationsmix für alle zu synthetisierenden c-DNA-Proben aus folgenden Komponenten:

**Tab. 3: Komponenten zur Herstellung des Präinkubationsmix**

Komponente	Volumen pro Reaktion
Oligo (dT)18	1,2µl
Random Hexamer	1,0µl

Die Proben wurden mit je 2,2µl dieser Mischung versetzt, im Peltier Thermo Cycler (Bio-Rad®, München, Deutschland) 5min bei 65°C inkubiert. (ProGramm: Main\Ferm65) und anschließend mind. 2min auf 4°C abgekühlt. Dieser Schritt bewirkt die Denaturierung der RNA-Stränge der Proben und der hinzugegebenen Primer (Oligo(dT)<sub>18</sub>, Random Hexamer), um in der nachfolgenden Maininkubation eine bessere Bindung der reversen Transkriptase an das Template zu ermöglichen.

**Tab. 4: Komponenten zur Herstellung des Maininkubationsmix**

Komponente	Volumen pro Reaktion
5 x Reaction Buffer	4,0µl
dNTP (10mM)	2,0µl
RiboLock RNase Inhibitor (20u/µl)	1,0µl
Revert AID RT (200u/µl)	1,0µl

Vom hergestellten Maininkubationsmix (Tab. 4) werden je 8,0µl in die Sampletubes gegeben und durch wiederholtes Aufziehen mit einer 20µl Pipette gemischt.

Die Inkubation erfolgte im Thermocycler in folgendem Schritten:

(ProGramm: Main\FermRT)

1. 5min bei 25°C
2. 60min bei 42°C
3. 5min bei 70°C
4. mind. 2min bei 4°C

Im zweiten Schritt bindet die Reverse Transkriptase an den RNA-Strang im Sample und synthetisiert basenkomplementär einen Tochterstrang aus dNTPs, gleichzeitig baut die RNase H Aktivität den RNA-Matrizenstrang zu Oligonukleotiden ab.

Laut Hersteller schützt der hinzugefügte RNase Inhibitor die Quell-RNA zuverlässig vor Degradationen bei Temperaturen bis zu 55°C. Im dritten Schritt erfolgt die Inaktivierung der RNA-abhängigen DNA-Polymerase bei 70°C. Für nachfolgende Berechnungen wird von der Annahme ausgegangen, dass bei der reversen Transkription die RNA vollständig in c-DNA umgeschrieben wurde, damit liegen c-DNA-Proben mit einer Konzentration von 75ng/µl vor (1,5µl auf 20,0µl). Da für die nachfolgende Genexpressionsanalyse via RTq-PCR c-DNA Samples in 5ng/µl Konzentrationen benötigt werden, wurden die Proben im Verhältnis 1:15 mit RNFW verdünnt. Außerdem wurde ein cDNA Pool aus Aliquots von je 5,0µl pro cDNA-Probe hergestellt, welcher zur Primeretablierung genutzt wurde (Kapitel 3.4.2). Daraufhin wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3.4 Real-Time-quantitative-PCR**

Die RTq-PCR ist eine 1992 entwickelte molekularbiologische Methode zur Amplifizierung von Nukleinsäuren, die zusätzlich in Echtzeit eine quantitative Analyse der PCR-Produkt Menge ermöglicht (Higuchi et al. 1992). Sie gilt als Goldstandard für die Validierung von Microarraystudien (Canales et al. 2006). Die in dieser Arbeit verwendete Methodik nutzt den intercalierenden Farbstoff SYBR® Green, dieser bindet mit höherer Affinität an dsDNA, als an einsträngige Nukleinsäuren und zeigt dies durch ein stärkeres Fluoreszenzsignal an. Die gemessene Fluoreszenz korreliert dabei direkt mit der Menge an hergestellten PCR-Produkten in jedem Zyklus. Da der Farbstoff sequenzunabhängig bindet, können Primer Dimer Artefakte sowie Amplifizierungsfehler zur gemessenen Fluoreszenz beitragen und somit Fehlerquellen darstellen (Zipper et al. 2004). Eine hohe Primerqualität und Spezifität ist damit Voraussetzung für aussagekräftige Genexpressionsdaten.

### 3.4.1 Primerdesign

In Vorbereitung der RTq-PCR werden Primer benötigt, welche spezifisch an die Transkripte der zu untersuchenden Gene binden und so eine spezifische Analyse auf Genexpressionsniveau möglich machen.

Die Transkriptsequenzen und splicing-Varianten der Zielgene wurden mit Hilfe des *Ensembl Genome Browsers* (<http://www.ensembl.org/index.html>) ermittelt und anschließend erfolgte das Design der Primer mittels *Primer3* Software unter <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> (Rozen und Skaletsky 2000). Da ein Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit vorangegangenen Mirco-Array Studien angestrebt wird, wurden die Primersequenzen im Transkript möglichst auf oder in unmittelbarer Nähe der, vom Array verwendeten, SONDENSEQUENZEN der Zielgene platziert. Die Vorschläge der Primer3 Ausgabe wurden anschließend einer Qualitätskontrolle unterzogen. Mittels *Oligo Analyzer* (<http://eu.idtdna.com/analzer/applicatons/oligo-analyzer>, Integrated DNA Technologies®, Coralville, USA) wurde die Bildung von Sekundärstrukturen, wie Haarnadelschleifen sowie von Homo- und Heterodimeren, geprüft. Sind diese Strukturen zu stabil, wird der Primer während der PCR in seiner Bindung an den Matrizenstrang gestört und verfälscht damit die Genexpressionsanalyse. Die BLAST-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) vergleicht die Basensequenz des Primerpaares mit einer Sequenzdatenbank der Zielspezies und identifiziert Sequenzen mit ähnlicher Basenabfolge. Mit Hilfe dieser Überprüfung lässt sich abschätzen, inwieweit zusätzliche unspezifische PCR-Produkte entstehen können. Primer, die den geforderten Qualitätsstandards nicht entsprachen, wurden verworfen.

Die geeigneten Primerpaare wurden bei [biomers.net](http://biomers.net) (Ulm, Deutschland) bezogen und laut Herstellerprotokoll mit RNFW auf 100pmol/μl eingestellt. Aus diesen Primerstocklösungen wurde daraufhin ein Primermix aus 20μl forward-Primer, 20μl reverse-Primer und 960μl DEPC-Wasser für die Verwendung in der RTq-PCR hergestellt und bei -20°C gelagert.

**Tab. 5: Basensequenzen der verwendeten Primer**

Sequenzen der forward und reverse Primer sowie Produktlängen von potentiellen Referenzgenen (*Actb*, *Hmbs*, *Hprt1*, *Gusb*) und Zielgenen (*Hmgcr*, *Mvd*, *Fdps*, *Scap*, *Insig1*, *Insig2*, *Srebf1*, *Srebf2*) für die Spezies *mus musculus*

Primer-name	forward-Primer (5'→3')	reverse-Primer (5'→3')	Produkt (bp)
<i>m_Actb</i>	GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT	CGGATGTCAACGTCACACTT	92
<i>m_Hmbs</i>	GAAATCATTGCTATGTCCACCA	GCGTTTTCTAGCTCCTTGGTAA	98
<i>m_Hprt1</i>	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	94
<i>m_Gusb</i>	GAAACCCGCCGCATATTAC	CCCAGGTCTGCATCATATT	109
<i>m_Hmgcr</i>	ACTGAACTGAAGCGCGGGCA	GCCAGAAACCAAGCAGGGGTGT	127
<i>m_Mvd</i>	CTTCCAGCACTCCAGACA	CGCTTAGATGGTTACTGAGG	96
<i>m_Fdps</i>	GCCCCTGCCCCATCCATCT	CCTCCCTCCCAGCCTCTCCAAT	90
<i>m_Scap</i>	CGGGATAGCTGCGGAGGTGG	AGAGGGAAGGCGGTGGAGGC	142
<i>m_Insig1</i>	GAGTCCCCGAACCCGAGCAC	GGCTCCGCTGCACCAAGTCG	102
<i>m_Insig2</i>	CGTGCGGTGTTCTGTTGGTAT	CAGTGCAGCCAGTGTGAGGGAA	88
<i>m_Srebf1</i>	ATAGCCAGGTCAAAGCCCAGCG	ATGCCCCAGCCGAAAAGCGA	133
<i>m_Srebf2</i>	AGGCAGGCGACCAGGAAGAAGA	ACCTGAGCACGGAAGTCTGGA	129

### 3.4.2 Primeretablierung

Neu bestellte Primer und Primer potentieller Referenzgene wurden auf ihre Funktion bei Reaktionsbedingungen vor Ort getestet.

Zuerst erfolgte eine Gradienten-PCR mit dem iCycler (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, USA), um die optimale Annealing Temperatur der Primerpaare zu ermitteln. Dafür wurden PCR-Ansätze aus cDNA-Pool Proben

(siehe Kapitel 3.3.3) und „RT<sup>2</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Mastermix“ (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Deutschland) analog Kapitel 3.4.3 hergestellt. Anschließend wurden die zu untersuchenden Primer und ihre Negativkontrollen (Target ist DEPC-behandeltes Wasser statt cDNA) bei sechs verschiedenen Temperaturen (62.0/61.2/60.3/59.0/58.1/57.0°C) getestet. Dabei zeigte sich das beste Primerbindungsverhalten bei 60,3°C, so dass folgende PCR-Reaktionen bei einer Annealingtemperatur von 60,0°C durchgeführt werden konnten.

Im Rotor-Gene Experiment zur Etablierung, in dem jeder Primer mit dem cDNA-Pool bzw. DEPC-Wasser-Proben getestet wurde (Ablauf siehe Kapitel 3.4.3), bestätigte sich die optimale Annealing-Temperatur von 60,0°C.

### 3.4.3 Experimentelles Setting

Ein kompletter PCR-Ansatz (20,0µl) besteht aus:

- 10,0µl Brilliant II SYBR<sup>®</sup> Green qRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies, La Jolla, USA)
- 5,0µl Primermix (forward- und reverse Primer)
- 5,0µl Sample (cDNA)

Reagenzien und Proben wurden vor Verwendung auf Eis aufgetaut und durch Nutzung des Vortexers (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA) und Abzentrifugation homogenisiert. Zur Zusammenstellung der PCR-Ansätze wurde der Pipettierroboter Corbett CAS-1200 (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Deutschland) mit der Steuersoftware „CAS Robotics4 v4.9.1“ genutzt. Maximal 72 PCR-Ansätze können pro Pipettierlauf erstellt werden und darauf hin in einer RTq-PCR analysiert werden. Es wurde angestrebt in einem RTq-PCR-Lauf, einen Primer mit allen relevanten Proben zu amplifizieren, um Fehler in der Analyse durch Abweichungen zwischen den Läufen zu gering zu halten. Da 121 Proben pro Primermix vermessen wurden, erfolgte die Aufteilung auf zwei PCR-



Laufreihen. Pro Primermix wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt, welche statt der cDNA-Probe DEPC-behandeltes Wasser enthielt. Dies diente der Überprüfung der Qualität des Primermix, da trotz rechnerischer Analyse „selfpriming“-Ereignisse nie ganz ausgeschlossen werden können.

CAS-1200 stellt pro Primer einen Gesamtmastermix her, bestehend aus Primermix und RTq-PCR Master Mix, der bereits alle weiteren Reagenzien für die RTq-PCR enthält (RT-PCR Puffer, MgCl<sub>2</sub>, Nukleotide [G,A,U,C], SureStart *Taq* DNA-Polymerase, SYBR Green and Stabilisierer) und gibt diesen zu den 5,0µl, aus Lebergewebe gewonnenen, cDNA-Proben. Damit wird jeder Primermix je einmal mit der c-DNA aller Proben (=Versuchstiere) hybridisiert.

Direkt nach Fertigstellung der Pipettierung erfolgt die Vermessung der bis zu 72 PCR-Ansätze im real-time qPCR Cycler Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen®, Hilden, Deutschland) nach folgendem Reaktionsprotokoll.

**Tab. 6: Temperatur und Zeitprotokoll der real-time quantitativen PCR**

Schritt	Reaktionsbedingungen	Funktion
1	95 °C, 10min	Hitzeaktivierung der DNA-Polymerase
2	95°C, 15s	Denaturierung von cDNA und Primern
3	60°C, 30s	Primerannealing
4	72°C, 30s	Elongation
5	50 Zyklen, Wdh. Schritte 2-4	Amplifizierung der PCR Produkte
6	57°C, 90s	Vorbereitung der Schmelzkurvenanalyse
7	57°C → 95°C, +0.5°C je 3s	Schmelzkurvenanalyse

Je 10 PCR-Produktproben pro Primermix wurden bei -20°C für die weitere Verwendung in Standardkurven zur Primereffizienzbestimmung eingefroren (Kapitel 3.4.7), die restlichen PCR-Produkte wurden verworfen.

Zur Quantifizierung von Abweichungen zwischen mehreren PCR-Läufen wurde ein Inter-PCR-Kontroll-Ansatz genutzt. Hierfür wurde ein

cDNA-Pool (Kapitel 3.3.3) mit dem Primermix für *Gapdh* nach obigem Schema in jeder PCR mitgemessen, zudem wurden Messungen von drei Proben (H1-H3) in beiden zeitlich getrennten Laufreihen doppelt vermessen. Die festgestellten Differenzen zwischen den  $C_t$ -Werten beider Laufreihen belaufen sich auf einen Mittelwert von 0,16 mit einer Standardabweichung von 0,44. Die Inter-PCR-Kontrolle liegt bei  $C_t = 12,14$  ( $\pm 0,20$ ). Damit sind die Abweichungen tolerierbar, so dass ein Vergleich von  $C_t$ -Werten zwischen verschiedenen PCR-Läufen möglich ist.

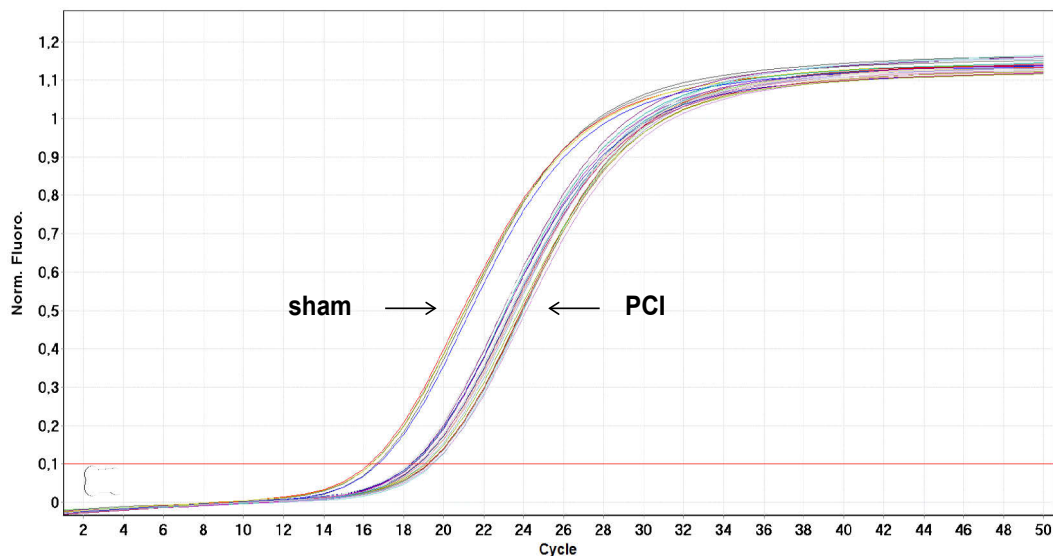
#### 3.4.4 Bestimmung von $C_t$ – Werten

Für die Berechnung der Genexpressionsveränderungen mittels relativer Quantifizierung werden  $C_t$  – Werte, sogenannte „threshold cycles“, benötigt. Das gemessene Fluoreszenzsignal der Real-Time-q-PCR zeigt einen dreiphasischen Verlauf: In der ersten Phase der Amplifikation ist die Templatemenge begrenzt und es wird nur ein langsamer Anstieg der Fluoreszenz beobachtet. Die darauf folgende Phase zeigt einen exponentiellen Anstieg des Signals durch optimale Reaktionsbedingungen. Die Plateauphase schließlich zeigt nur noch einen schwachen Fluoreszenzanstieg, da hier die Quantität der Produkte überwiegt und Edukte zum größten Teil aufgebraucht sind (Pfaffl 2001). Der  $C_t$  – Wert eines Reaktionsansatzes wird über einen Grenzwert für die gemessene Fluoreszenzintensität am Anfang der exponentiellen Phase ermittelt und entspricht dem PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Um verschiedene Messungen miteinander vergleichen zu können, wird stets derselbe Grenzwert verwendet. Für die Quantifizierung in dieser Arbeit wurden die  $C_t$ -Werte bei einem „threshold“ von  $10^{-1,0}$  Norm. Fluoro. (normalized fluorescence) ermittelt.

Abhängig von der Primereffizienz wird in jedem PCR-Zyklus annähernd eine Verdoppelung der PCR Produktmenge erreicht, welche sich durch die

proportional zur Produktmenge verhaltende Fluoreszenzintensität zeigt. Über diesen Zusammenhang lassen sich anhand des Ct – Wertes Rückschlüsse über die Ausgangsmenge des gesuchten Transkriptes ziehen.



**Abb. 6: Ermittlung von Ct-Werten**

Repräsentative Darstellung der Fluoreszenzentwicklung zweier Behandlungsgruppen in der Real-Time-q-PCR. Es sind im Peritonitismodell Scheinbehandlungsgruppe (sham) und Peritonitisgruppe (PCI) zum Beobachtungszeitpunkt 24h für das Transkript *Hmgcr* dargestellt. Die rote Linie entspricht dem Grenzwert von  $10^{-1.0}$  Norm. Fluoro. (normalized fluorescence). An deren Schnittpunkt mit den Fluoreszenzkurven werden die Ct-Werte für jede Probe (=Versuchstier) abgelesen.

### 3.4.5 Schmelzkurvenanalyse

Nach der Amplifikationsphase (Tab. 6) wird die Temperatur langsam und kontinuierlich von 72°C auf 95°C erhöht und eine Schmelzkurve aufgenommen. Sobald die Schmelztemperatur  $T_m$  erreicht ist, bei der das gebildete PCR-Produkt denaturiert und sich in zwei DNA-Einzelstränge aufspaltet, wird der SYBR Green-Farbstoff schlagartig freigesetzt und es zeigt sich eine Abnahme der Fluoreszenz. Die doppelsträngige DNA der spezifischen PCR-Produkte hat einen höheren Schmelzpunkt, als unspezifisch

entstehende Primerdimere, somit lassen sich Aussagen über die Spezifität der Reaktion treffen. Da die untersuchten PCR-Produkte in der Analyse je nur einen prominenten Peak zeigten, kann von einer zu vernachlässigenden Bildungsrate unspezifischer PCR-Produkte ausgegangen werden.

#### **3.4.6 PCR-Produkt Überprüfung durch Gelelektrophorese**

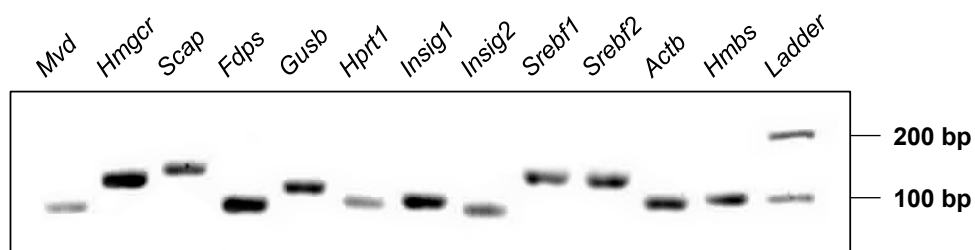
Zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse wurden die amplifizierten Fragmente nach Abschluss der Real-Time-q-PCR mittels DNA-Gelelektrophorese auf die erwartete Basenpaaranzahl sowie auf die Bildung von zusätzlichen, unspezifischen PCR-Produkten überprüft. Es wurden 2,0µl PCR-Produkt eingesetzt, mit DEPC behandeltem Wasser auf 6,0µl Volumen eingestellt und nach Zugabe von jeweils 2,0µl Ladepuffer Orange G in die Taschen eines 2%igen DNA-Gels, versetzt mit SYBR Green I zur Visualisierung, gegeben. Als Größenstandard diente der GeneRuler™ 100bp ready-to-use DNA Ladder von Fermentas® (St. Leon-Rot, Deutschland), von dem 1,0µl Volumen in die Kammer gegeben wurde. Die Gelelektrophorese erfolgte lichtgeschützt für 1,5h bei 80V in 1x TAE Elektrophoresepuffer und wurde anschließend am UV-Transilluminator (Herolab®, Wiesloch, Germany) mit der Software „E.A.S.Y Win32“ (Herolab®, Wiesloch, Germany) dokumentiert und ausgewertet.

Dabei waren die ermittelten Produktlängen mit den erwarteten Basenpaarzahlen des Herstellerdatenblattes konsistent (Tab. 7). Außerdem zeigten sich im Gel keine Hinweise auf unspezifische Konkurrenzreaktionen, so dass alle verwendeten Primer uneingeschränkt für die Analyse der Genexpression geeignet sind (Abb. 7).

**Tab. 7: Gegenüberstellung der PCR-Produktlängen des Herstellerdatenblattes und der Gelelektrophorese**

Angabe der Produktlänge in Basenpaaren (bp)

Gel-taschen-nummer	Transkript	Produktlänge in bp	
		Datenblatt	Electrophorese
1	<i>Mvd</i>	96	99
2	<i>Hmgcr</i>	127	127
3	<i>Scap</i>	142	148
4	<i>Fdps</i>	90	99
5	<i>Gusb</i>	109	120
6	<i>Hprt1</i>	94	101
7	<i>Insig1</i>	100	101
8	<i>Insig2</i>	88	92
9	<i>Srebf1</i>	133	130
10	<i>Srebf2</i>	129	125
11	<i>Actb</i>	92	97
12	<i>Hmbs</i>	98	102



**Abb. 7: Gelelektrophorese der PCR-Produkte zur Qualitätssicherung**

Dargestellt sind die Elektrophoresemuster der untersuchten Transkripte und der potentiellen Referenzgene. Standard ist ein 100bp Ladder rechts. Angabe der Produktlänge in Basenpaaren (bp)

### 3.4.7 Primereffizienzbestimmung durch Standardkurven

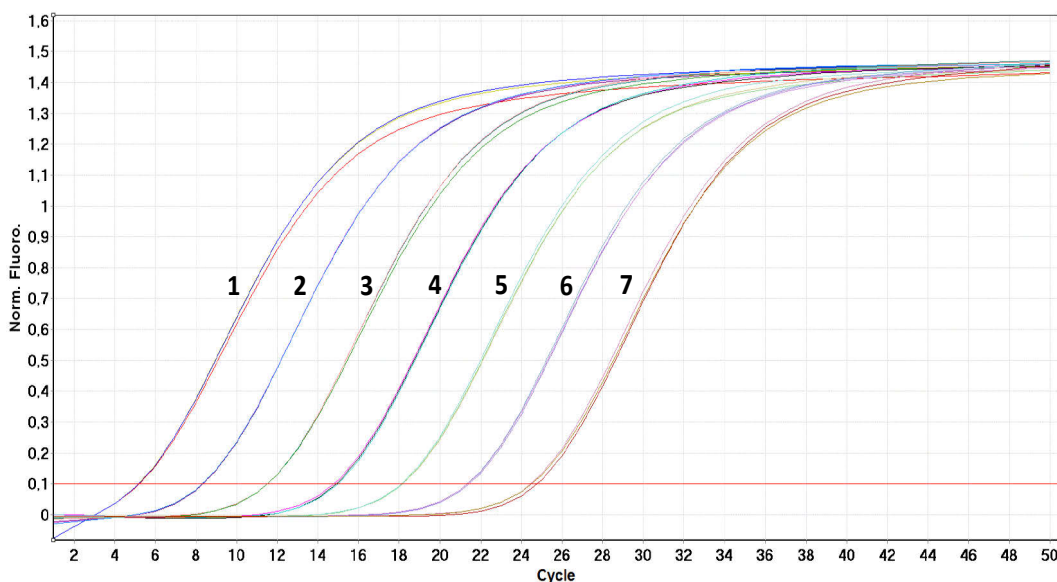
Jeweils fünf PCR-Ansätze pro Primermix wurden nach der Probenvermessung mittels Real-Time-q-PCR (siehe Kapitel 3.4.3) gepoolt und die so erhaltenen 100µl PCR-Produkt Volumina mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von Qiagen® (Hilden, Deutschland), dem Protokoll des Herstellers folgend, aufgereinigt. Im ersten Schritt wird die cDNA an die Säulenmembran gebunden, es folgt das Auswaschen von Verunreinigungen durch Buffer PE Waschpuffer. In Schritt drei schließlich wird die aufgereinigte cDNA in 30µl Elutionspuffer gelöst.

Anschließend erfolgte die Quantifizierung der cDNA am NanoDrop ND-1000 mit DNA-spezifischen Messeinstellungen (NanoDrop Technologies®, Wilmington, USA) und die Verdünnung der Proben mit DEPC Wasser auf 10ng/µl.

Die aufgereinigten PCR-Produkte dienten als Ausgangsmaterial für serielle Verdünnungen im Verhältnis 1:10 mit Endkonzentrationen von 1pg/µl, 100fg/µl, 10fg/µl, 1fg/µl, 100ag/µl, 10ag/µl und 1ag/µl. Pro Verdünnungsstufe wurden jeweils 5,0µl als „template“ in eine weitere Real-Time-q-PCR mit den entsprechenden Primerpaaren (z.B. *Hmgcr* fw-/rv-Primer bei *Hmgcr*- PCR-Produkt usw.) eingesetzt und die Ansätze, wie bereits beschrieben, zusammenpipettiert (Kapitel 3.4.3), amplifiziert (Tab. 6) und analysiert (Kapitel 3.4.4 und 3.4.5). Jede Konzentrationsstufe wurde in Dreifachbestimmung vermessen (Abb. 8) und die ermittelten Ct-Werte in Abhängigkeit von der halblogarithmischen Konzentration des PCR-Produktes aufgetragen. So erhält man eine abfallende lineare Funktion, aus deren negativem Anstieg die Effizienz E des jeweiligen Primerpaares berechnet werden kann. Verwendet wird folgende Formel (Pfaffl 2001):

$$E = 10^{-1/\text{Anstieg}}$$

Primereffizienzen werden für die relative Quantifizierung (Kapitel 3.5.2) benötigt und dienen außerdem der Kontrolle der Primerqualität. Dabei ist zu berücksichtigen, dass durch Standardkurven ermittelte Effizienzen immer etwas höher ausfallen als die realen Effizienzen der Primer, da hier von idealisierten Reaktionsbedingungen ausgegangen wird: Die Matrize für den Primer ist sein aufgereinigtes PCR-Produkt und daher ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Verunreinigungen und störenden Fremdtranskripten minimiert. Die Effizienzen wurden mit Hilfe der Analysefunktion für Verdünnungsreihen der Rotor-Gene 6000 Software (Qiagen®, Hilden, Deutschland) ermittelt.



**Abb. 8: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Primereffizienz**

Repräsentative Darstellung der Fluoreszenzentwicklung bei Verdünnungsreihen. Hier wird das PCR-Produkt für *Mvd* 7fach im Verhältnis 1:10 mit Endkonzentrationen von 1pg/ $\mu$ l (1), 100fg/ $\mu$ l (2), 10fg/ $\mu$ l (3), 1fg/ $\mu$ l (4), 100ag/ $\mu$ l (5), 10ag/ $\mu$ l (6) und 1ag/ $\mu$ l (7) verdünnt und amplifiziert. Anschließend werden die Ct-Werte der Verdünnungen am Grenzwert von  $10^{-1.0}$  Norm. Fluoro. (normalized fluorescence, rote Linie) abgelesen.

### 3.5 Post-PCR-Analytik

#### 3.5.1 Referenzgen-Analyse mit geNorm und Normfinder

Referenzgene, sogenannte „Housekeeper“, sind konstitutiv exprimierte Gene, die in allen kernhaltigen Zellen für die Aufrechterhaltung des Zellbasisstoffwechsels benötigt werden. Damit sind sie theoretisch unabhängig von der Versuchstierbehandlung während der Experimente immer gleich stark exprimiert und stellen so einen geeigneten Vergleichswert für die Normalisierung der Genexpressionsdaten zur relativen Quantifizierung dar (Thellin et al. 1999, Foss et al. 1998).

In vorangegangenen Studien zeigte sich aber, dass ein und dasselbe Gen je nach experimentellem Vorgehen eine konstante Expression zeigen oder einer deutlichen Regulation unterliegen kann (Bas et al. 2004, Gilsbach et al. 2006). Daher ist es für aussagekräftige Ergebnisse erforderlich, dass für jedes Experiment die Expressionsstabilität von vorzugsweise mehreren Referenzgenen validiert wird und ausschließlich ein Panel stabil exprimierter Gene für die Normalisierung der Genexpressionsdaten aus Real-Time-q-PCR Versuchen herangezogen werden (Huggett et al. 2005).

Die in anderen Untersuchungen für murines Gewebe genutzten „Housekeeper“ *Actb*, *Hmbs*, *Gusb* und *Hprt1* (Tatsumi et al. 2008, Sieber et al. 2010) wurden für die Versuchsbedingungen im Rahmen dieser Arbeit auf Stabilität der Expression überprüft. Dies wurde durch eine Analyse der gemessenen  $C_t$ -Werte der potentiellen Referenzgene mit Hilfe der VBAs geNorm und NormFinder für Microsoft Excel realisiert.

Das geNorm ProGramm (Vandesompele et al. 2002) errechnet einen Expressionsstabilitätswert  $M$  aus der mittleren paarweisen Abweichung des Genes von allen anderen untersuchten Genen. Durch schrittweisen Ausschluss des Gens mit dem jeweils höchsten  $M$ -Wert, wird das Paar von zwei Referenzgenen mit der stabilsten Expression ermittelt. Dieser Algorithmus geht von der Annahme aus, dass keine Koregulation vorliegt



([http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm\\_manual.pdf](http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf)).

Die VBA Normfinder wurde zusätzlich genutzt, da sie neben der Einschätzung der Gesamtvariation aller untersuchten Gene, auch eine Analyse der inter- und intra Gruppen-Expressionsvariation ermöglicht ([http://www.mdl.dk/Files/Normfinder\\_documentation\\_v19.pdf](http://www.mdl.dk/Files/Normfinder_documentation_v19.pdf)). Dieser Algorithmus ist weniger anfällig für fehlerhafte Interpretationen durch Co-Regulation von „Housekeepern“.

Da beide Berechnungsmodelle Ausgangsdatensätze auf linearem Skalenniveau benötigen, wurden die detektierten Ct-Werte mittels der komparativen Ct-Methode (Livak und Schmittgen 2001) nach folgender Formel in Expressionsquantitäten umgerechnet.

$$Q_{rel} = (E_{ref})^{\Delta Ct_{ref} (control - sample)}$$

Die relative Expressionsquantität ( $Q_{rel}$ ) wird gebildet aus der Primereffizienz des Referenzgenes in der Basis und der Differenz der Ct-Werte des arithmetischen Mittels der unbehandelten Tiere und des Werts des behandelten Tieres im Exponenten.  $Q_{rel}$  wird für jedes behandelte Tier separat berechnet.

### 3.5.2 Relative Quantifizierung

Für die Beurteilung der Genexpressionsveränderungen zwischen behandelten und unbehandelten Versuchstieren wurde die Methode der relativen Quantifizierung nach Pfaffl genutzt (Pfaffl 2001).

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct_{target} (control - sample)}}{(E_{ref})^{\Delta Ct_{ref} (control - sample)}}$$

Hier wird jedes der zu untersuchenden Zielgene (*target*) im Zähler relativ zur Bezugsgruppe der Referenzgene (*ref*) im Nenner betrachtet, um eine Hoch- bzw. Herabregulation der Zielgene im Vergleich zu erkennen. Dieses Verhältnis wird für jede Probe einzeln berechnet.

Ausgehend von der Primereffizienz des zu untersuchenden Zielgenes ( $E_{target}$ ) und der Differenz der Ct-Werte von Referenz (*control*) und der jew. Probe des behandelten Tieres (*sample*) wird der Zähler der Gleichung berechnet. Als Referenz (*control*) diente das arithmetische Mittel der Ct-Werte der beiden unbehandelten Versuchstiere. Dieser Wert wurde für Pneumonie- und Peritonitismodell separat berechnet.

In den Nenner der Pfaffl-Formel gehen die Referenzgene (*ref*) zur Normalisierung der Daten ein. Es wurden nur die „Housekeeping“-Gene genutzt, die in der vorhergehenden Analyse die beste Eignung zeigten (Kapitel 3.5.1). Die Berechnung erfolgte zunächst analog der für den Zähler beschriebenen Vorgehensweise separat für alle getesteten Referenzgene. Für jede Probe wurde ein Normalisierungsfaktor durch Berechnung des geometrischen Mittels aus den drei stabilsten Referenzgenen gebildet (Vandesompele et al. 2002). Durch dieses Vorgehen werden quantitative Schwankungen und mögliche Ausreißer besser toleriert, als bei Verwendung nur eines Referenzgenes. Es wurde für beide Mausmodelle je eine andere Referenzgenkombination zur Normalisierung verwendet, da es in der Stabilität der Transkription modelspezifische Unterschiede gab.

Anschließend wurden die Daten  $\log_2$ -transformiert, so dass eine Hochregulation durch ein positives Vorzeichen und eine Herabregulation durch ein negatives Vorzeichen zu erkennen ist, außerdem sind so äquidistante Skalenniveaus in Darstellungen möglich. Im Ergebnisteil werden die transformierten Daten als  $\log_2$ -Fold Changes bezeichnet.

### 3.5.3 Statistische Auswertung

Die  $\log_2$ -transformierten Daten wurden zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung getestet. Es zeigte sich, dass im Peritonitismodell nicht von normalverteilten Daten ausgegangen werden kann. Zur relativ geringen Menge an Versuchstieren, wiesen die Daten teilweise eine starke Streuung auf, daher wurden in Folge für beide Modelle robustere nicht-parametrische Tests angewandt.

Die folgende Analyse mit dem Kruskal-Wallis-Test diente der Untersuchung, ob sich zwischen allen Behandlungsgruppen signifikante Unterschiede in der Genexpression des untersuchten Zielgenes nachweisen lassen.

War das Ergebnis signifikant verschieden, so wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt, welcher zwei Gruppen vergleicht und testet, ob sie einer Grundgesamtheit angehören. Der Vergleich wurde jeweils von der sham-Gruppe zur behandelten Gruppe zum Beobachtungszeitpunkt von 6h oder 24h nach Infektion durchgeführt. Für Aussagen zur Genexpressionsveränderung werden die im Mann-Whitney-U-Test ermittelten Signifikanzen herangezogen.

Alle Tests wurden mit dem ProGramm SPSS 19 (IBM Corporation, Ehningen, Deutschland) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als exakte Signifikanzen ausgegeben und bei einem Niveau von  $\alpha < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet. Da die Daten bereits normalisiert waren und nur für geringe Gruppenstärken vorlagen, wurde keine  $\alpha$ -Adjustierung durchgeführt.

### 3.6 Gewinnung und Auswertung der Metabolomdaten

Die in diesem Abschnitt beschriebene Prozedur wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Martina Weber durchgeführt. Die Organe der Infektions- und Scheinbehandlungsgruppen für die Beobachtungszeitpunkte 6h und 24h wurden mit Hilfe eines Gefrierspann Systems (freeze-clamp), in dem die Proben aufgespannt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, vorbereitet.

Aus der *Vena cava caudalis* entnommene Blutproben wurden in Lithium-Heparin Monovetten gegeben und 6min bei 4.600g zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und bei -80°C gelagert.

Zur Aufbereitung der Gewebeproben für die Analyse wurde das *TargetIDQ® Services Kit* (Biocrates Life Sciences®, Innsbruck, Österreich) genutzt. Schockgefrorene Leberproben wurden in 2,0ml Precellys Tubes mit Keramikugeln (PepLab Biotechnologie GmbH®, Erlangen, Deutschland) eingewogen und danach wurde diesen Tubes eine Lösung aus 10mM Ethanol und Phosphat Puffer 85:15 (EtOH/PB) in einem Verhältnis von 1:3 zugegeben. Die anschließende Lyse des Gewebes erfolgte im Precellys24 Homogenizer® (PepLab Biotechnologie GmbH®, Erlangen, Deutschland) unter einer Temperatur von 0-4°C mit folgendem Programm: 5800rpm, 3x30s (Anzahl und Dauer der Zyklen), 25s (Pause zwischen den Cycles). Abschließend wurden die Homogenisate bei 18.000g und 2°C für 5min zentrifugiert, die resultierenden Überstände abpipettiert, in Kryogefäße gegeben (1,5 ml, Biozym, Oldendorf, Germany) und zeitnah analysiert, um Degradierung der Analyte zu vermeiden.

Lanosterol und Desmosterol wurden anschließend durch reversed phase LC-ESI-MS/MS quantitativ analysiert. Die Probenvorbereitung von 20µL homogenisiertem Gewebe bzw. Plasma beinhaltet: Protein Präzipitation mit 200µL Acetonitril; Hydrolyse durch Hinzugeben von 100µL 0.35M Kaliumhydroxid in 95% Ethanol für 2h; Auswaschen (3x200 µL H<sub>2</sub>O) um das Hydrolysereagenz zu entfernen und schließlich Extraktion durch

100µl Methanol(aq.). Die Analyse erfolgte anschließend von je 20µL der Proben-Extrakte durch die LC-ESI-MS/MS Methode. Die hochselektive Detektion wurde mittels des 4000 Q Trap® Tandem-Massenspektrometers (AB Sciex/MDS Analytical Technologies, Darmstadt, Deutschland) im *positive MRM detection mode* durchgeführt. Durch externe Kalibrierung wurden Ratios für den externen und internen Standard zum Zwecke der Quantifizierung herangezogen.

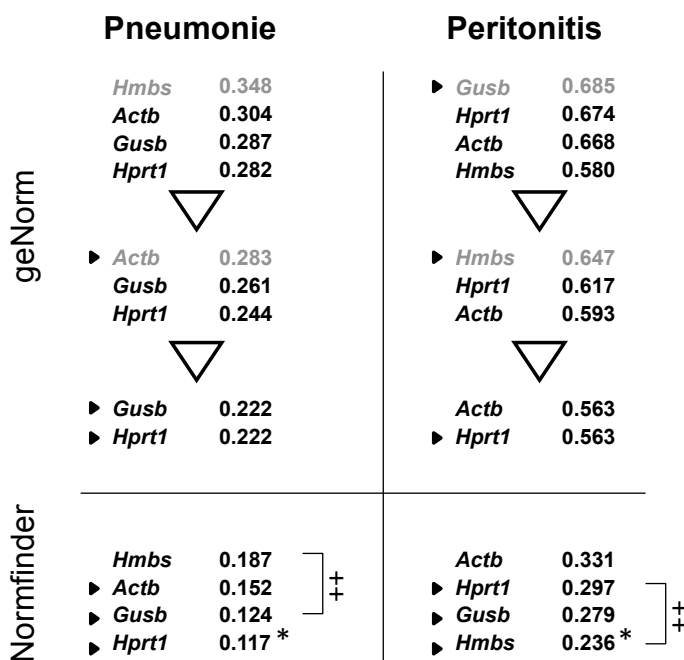
Die Cholesterolmessungen fanden in heparinisierten Plasma Proben durch den Analyseautomaten für klinische Chemie ARCHITECT® ci16200 (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany), den Herstellerangaben folgend, statt. Dabei werden Cholesterinester durch das Enzym Cholesterinesterase zu Cholesterin und freien Fettsäuren hydrolysiert. Das freie Cholesterin, einschließlich des ursprünglich vorhandenen, wird dann durch Cholesterinoxidase zu Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid oxidiert. Daraufhin reagiert Wasserstoffperoxid mit Hydroxybenzoesäure und 4-Aminoantipyrin zu einem Chromophor (Chinonimin-Farbstoff), der bei 500nm quantitativ bestimmt wird.

Die gewonnenen Konzentrationsdaten wurden analog des Vorgehens für die log<sub>2</sub>-Fold Changes der Genexpressionswerte statistisch ausgewertet (Kapitel 3.5.3).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Referenzgenanalyse

Die zur Normalisierung der Genexpressionsdaten notwendigen „housekeeping“-Gene wurden, wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, mit Hilfe der Excel-VBAs *geNorm* und *NormFinder* identifiziert (Abb. 9).



**Abb. 9: Darstellung der Expressionsstabilitätswerte der Housekeeperanalyse mittels geNorm und Normfinder für Pneumonie und Peritonitis**

Potentiellen Referenzgene sind je mit errechnetem Expressionsstabilitätswert absteigend geordnet, je höher der Wert, desto weniger stabil ist das Gen exprimiert.

Die zur Normalisierung ausgewählten Gene sind mit ▶ für beide Algorithmen markiert.

**geNorm:** Schrittweiser Ausschluss der am instabilsten exprimierten Gene (grau markiert), führt zur Ausgabe des stabilsten Genpaares.

**Normfinder:** Intra- und inter-Gruppen Variation wurde berücksichtigt. Außerdem wurde das stabilste Gen (\*) sowie die stabilste Kombination von zwei Genen (++) bestimmt.

Aus den vier potentiellen Referenzgenen: *Actb*, *Hmbs*, *Gusb* und *Hprt1* (Tatsumi et al. 2008, Sieber et al. 2010), sollten die drei stabilsten Kandidaten herausgesucht werden, um dann durch Bildung des geometrischen Mittels aus den Expressionsquantitäten der Normalisierung der Genexpressionsdaten zu dienen (Vandesompele et al. 2002).

Es zeigen sich deutliche sowohl modellabhängige, als auch Algorithmusabhängige Unterschiede in den ausgegebenen Expressionsstabilitäten.

Für das Modell der induzierten Pneumonie (Abb. 9) errechnet *geNorm* *Hprt1* und *Gusb* als am stabilsten exprimiertes Genpaar. Die Normfinder-Analyse bestätigt dieses Ergebnis mit *Hprt1* als stabilstem Gen, als beste Kombination von zwei Genen werden *Gusb* und *Hmbs* angegeben. *Hmbs* ist allerdings in beiden Analysen mit Abstand das am unstabilsten exprimierte Gen. Daher wird die Rangfolge der Normfinderausgabe für die Auswahl der geeigneten „Housekeeper“ herangezogen und folglich *Hprt1*, *Gusb* und *Actb* zur Normalisierung im Pneumoniemodell genutzt.

Das PCI-Modell (Abb. 9) zeigt im Vergleich deutlich höhere Zahlenwerte und damit eine insgesamt weniger stabile Expression der potentiellen Referenzgene als im Pneumoniemodell. *Hprt1* und *Actb* sind laut *geNorm* das stabilste Genpaar. In der Normfinderanalyse zeigt sich differentes Bild: *Hmbs* ist stabilstes Gen und in Kombination mit *Hprt1* am stabilsten bei Berücksichtigung der intra- und inter-Gruppen Variation, *Actb* ist in diesem Algorithmus als am unstabilsten angegeben. Als Referenzgene werden für das PCI-Modell *Hmbs*, *Gusb* und *Hprt1* genutzt. *Gusb* wurde mit *geNorm* zwar als erstes verworfen, allerdings waren die numerischen Unterschiede, die im ersten Schritt zum Ausschluss führten, nur sehr gering.

Die Normalisierung wurde für jedes Modell spezifisch aus den drei am besten geeigneten Genen durchgeführt. So sind exakte Vergleiche zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen im Modell möglich, aber nicht zwischen den Modellen (z.B. PCI 6h vs. S2 D39 6h).

## 4.2 Genexpressionsanalyse

Die Auswertung der Genexpressionsdaten der Cholesterolsynthese in murinem Lebergewebe wird auf drei Ebenen vorgenommen:

1. Enzyme (*Hmgcr*, *Mvd*, *Fdps*)
2. Membran- und Transportproteine (*Scap*, *Insig1*, *Insig2*) zur Modifizierung der Transkriptionsfaktorenaktivität
3. Transkriptionsfaktoren (*Srebf1*, *Srebf2*)

Diese Expressionsdaten sind in den Abschnitten (4.2.1, 4.2.2, 4.2.3) normalisiert,  $\log_2$ -transformiert und statistisch ausgewertet als Box-Whisker-Plots dargestellt.

In dieser Form der grafischen Darstellung wird der Interquartilabstand (IQR...interquartile range), welcher dem mittleren 50%-Bereich der Stichprobenelemente entspricht, als senkrechte Box wiedergegeben. Die waagerechte schwarze Linie innerhalb der Box entspricht dem Median und teilt die Fläche in die oberen und unteren 25% der mittleren Stichprobenwerte. Je nach Lage des Medians lassen sich Aussagen zur Schiefe der den Daten zugrunde liegenden Verteilung machen. Daten, welche sich außerhalb des Interquartilabstandes befinden, werden als senkrechte Linien ober- und unterhalb der Box dargestellt (sogenannte Whisker). Die Whisker können maximal das 1,5fache des IQR lang sein und enden bei dem Wert, der noch innerhalb dieses Bereichs liegt. Des Weiteren werden Ausreißer ( $1,5 \times \text{IQR} - 3 \times \text{IQR}$ ) und Extremwerte (ab  $3 \times \text{IQR}$ ) als  $^{\circ}$  bzw. als  $*$  in der Grafik abgebildet. Die Genexpressionsveränderungen sind auf die unbehandelten Tiere („naiv“) pro Modell normalisiert. Die Nulllinie, die den Median der unbehandelten Gruppe darstellt, ist damit Bezugspunkt für die Expressionsveränderungen der behandelten Gruppen.



In dieser Arbeit werden die behandelten Gruppen zum Beobachtungszeitpunkt von 6h bzw. 24h mit den entsprechenden sham-Gruppen zum gleichen Zeitpunkt verglichen, in dem die Differenz der Mediane ( $\bar{x}$ ) gebildet und anschließend nach folgender Formel in Expressionsfaktoren umgewandelt wird.

$$\text{Expressionsfaktor} = 2^{\Delta\bar{x}(\text{sample} - \text{control})}$$

Ein Median mit einem  $\log_2$ -Fold Change (FC) von 1 entspricht nach diesem Zusammenhang einer Verdoppelung der Transkriptmenge und damit der Genexpressionsrate im Vergleich zur naiven Gruppe. Ein Wert von -1 steht für eine Halbierung und ein Wert von 0 bedeutet dass keine Expressionsveränderung des entsprechenden Genes in der Behandlungsgruppe messbar war. Die Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ( $\alpha=0,05$ ) auf Signifikanz geprüft. Nicht signifikante Veränderungen werden im Folgenden als tendenzielle Veränderungen bezeichnet.

Im Pneumoniemodell wird der Pneumokokkenserotyp S2-D39 in zwei Abbildungen je im Vergleich mit den anderen verwendeten Serotypen gezeigt (Abb. A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>), da in vorangegangenen Microarraystudien bereits signifikante Unterschiede in der Genexpression der Cholesterolsynthese zwischen S2-D39 und S19-3030 Wildtyp auffällig waren. Ab einer selbst gewählten Fold Change Differenz von  $\Delta\text{FC} \geq 1,0$  wurde eine Veränderung zwischen zwei untersuchten Gruppen als biologisch relevant bewertet und neben den M-W-U-Test zur Auswertung der Expressionsdaten herangezogen. Dabei muss das Ergebnis des M-W-U-Tests nicht zwangsläufig dem Ergebnis für die mögliche biologische Relevanz entsprechen. Signifikante Veränderungen sind mit eckiger Klammer zwischen den getesteten Gruppen und der Bereich mit fehlender biologischer Relevanz ist mit grauen Flächen dargestellt.

Zur besseren Übersicht in den folgenden Abbildungen wurden die Behandlungsgruppen im Pneumoniemodell mit einem Farbcode entsprechend ihrer Virulenz im klinischen Alltag versehen. Die Einteilung beginnt mit roter Farbe (hohe Virulenz und Letalität) und endet mit grüner Farbe (geringvirulente Erreger). Außerdem wurden die systematischen Namen der Serotypen auf folgende Weise abgekürzt:

S2-D39 = S2 // S19-EF3030 = S19-W // S19-EF3030 $\Delta$ PLY = S19-dP // S3-A66.1 = S3-A // S3-6303 = S3-6

Die Gruppen mit Behandlung durch humane Faeces - Suspension werden im Weiteren als PCI (*Peritoneal Infection & Contamination*) bezeichnet.

## 4.2.1 Expressionsmuster: Enzyme

### 4.2.1.1 Hmgcr

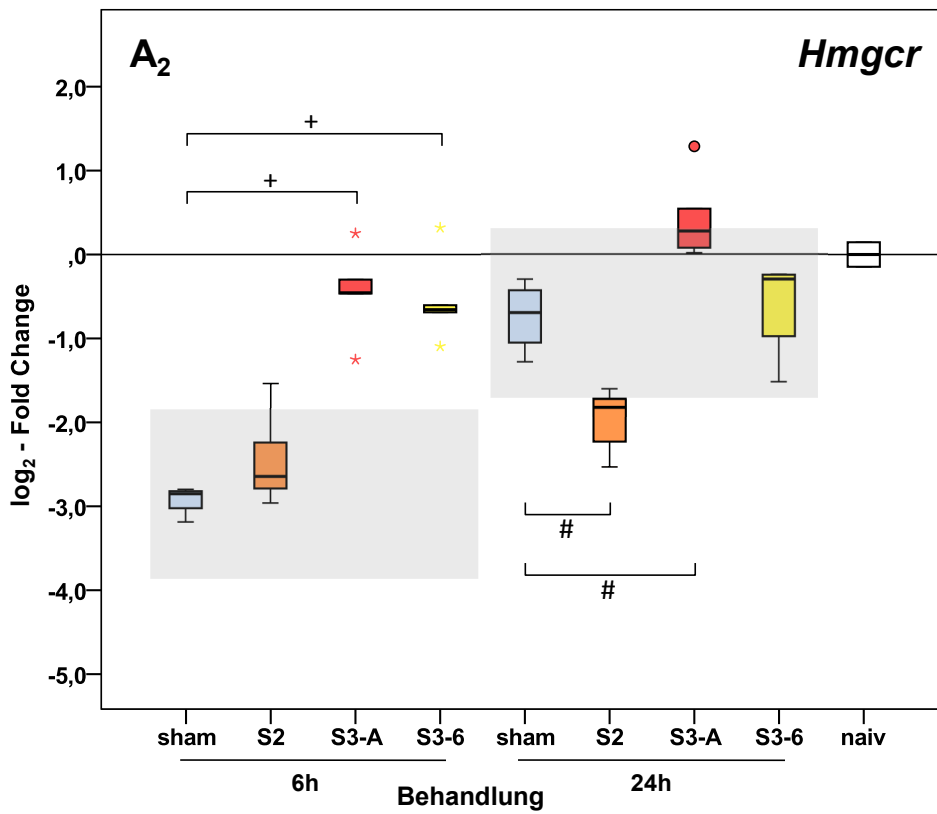
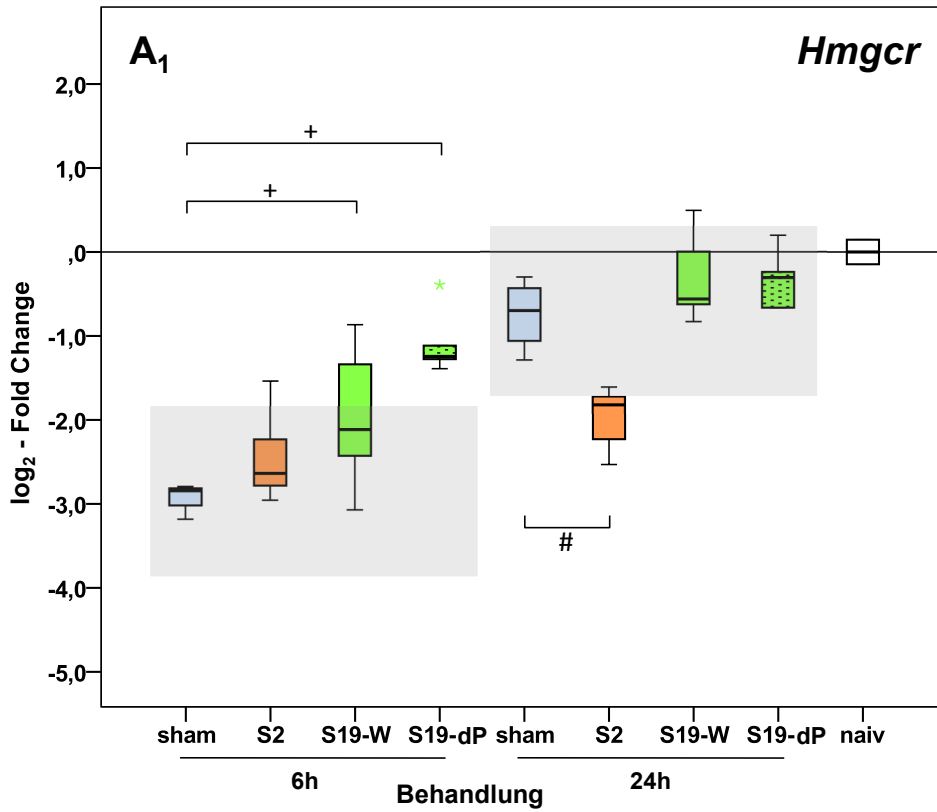
Im Pneumoniemodell (Abb. 10-A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) ist für *Hmgcr* ein deutlicher Effekt der sham-Behandlung im Vergleich zu naiv erkennbar: nach 6h reduziert sich die Expressionsrate auf etwa 1/8 des Ausgangswertes, nach 24h liegt die Verringerung innerhalb des nicht biologisch relevanten Bereiches.

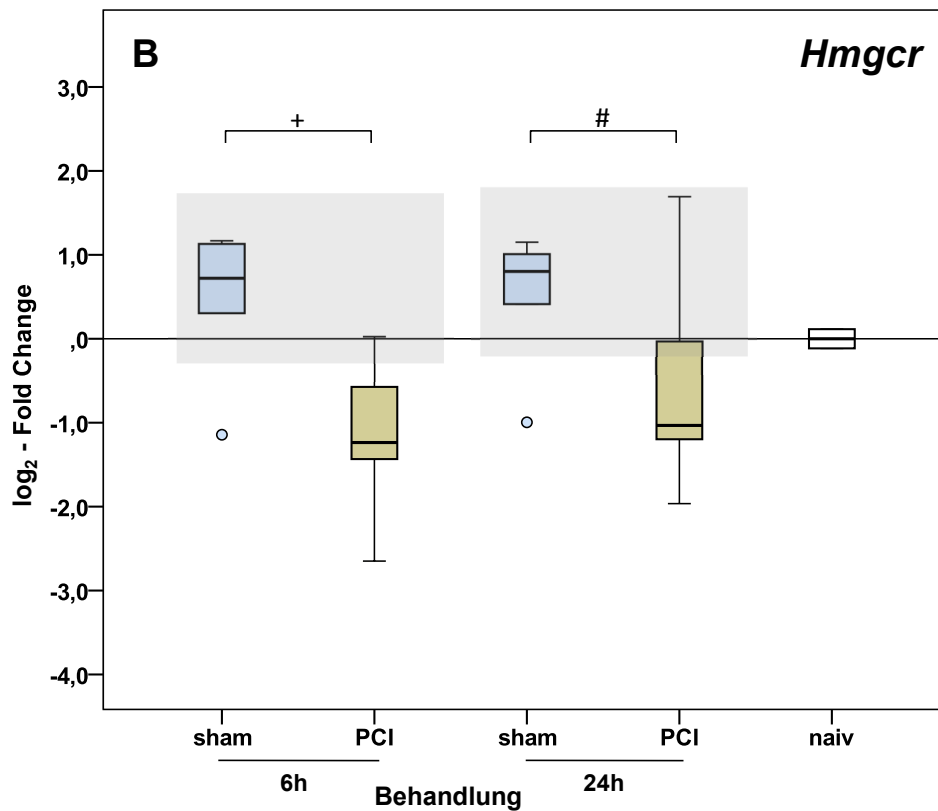
Alle untersuchten Serotypen zeigen 6h nach Infektion im Vergleich zu sham zumindest tendenziell eine Steigerung der Expressionsrate an, wobei die Serotypen S19-W und S19-dP (Abb. 10-A<sub>1</sub>) eine Steigerung um den Faktor 1,7 (S19-W) sowie um den Faktor 3 (S19-dP) bewirken. Die Serotypen S3-A und S3-6 (Abb. 10-A<sub>2</sub>) zeigen einen deutlicheren Einfluss mit einer Expressionssteigerung um den Faktor 5,2 (S3-A) bzw. 4,6 (S3-6).

Zum Beobachtungszeitpunkt 24h ist eine Halbierung der Expressionsrate bei S2 auffällig. Der hochvirulente Serotyp S3-A zeigt die gegensätzliche Regulation mit Verdoppelung der Expression. Alle weiteren Serotypen zeigen annähernd gleiche Expressionsniveaus wie die sham-Gruppe.

Im Modell der polymikrobiellen Peritonitis ist zu beiden Beobachtungszeitpunkten eine Senkung der Genexpression auf 1/4 des Niveaus bei sham-Tieren zu verzeichnen. Die Injektion von isotonischer Kochsalzlösung (sham) bewirkt zudem eine tendenziell leichte Erhöhung über den Wert von unbehandelten Tieren.

*Das Transkript der Schlüsselenzyms Hmgcr zeigt modell- und serotypenspezifische Unterschiede. Auffällig ist die gegensätzliche Reaktion von S2 nach 24h mit einer Senkung im Vergleich zu den anderen Serotypen mit einer Steigerung der Rate. Dem gegenüber steht die Senkung der Genexpressionsrate bei Peritonitis.*





**Abb. 10: hepatische Expression von *Hmgcr* im Pneumoniemodell (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) und Peritonitismodell (B)**

Die Expressionsdaten sind zu den Beobachtungszeitpunkten 6h und 24h für die verschiedenen Behandlungsgruppen dargestellt. Die Gruppen wurden farblich codiert und mit folgenden Abkürzungen dargestellt:

orange: S2-D39, Abk.: S2 // grün: S19-EF3030, Abk.: Wildtyp: S19-W, pneumolysindefizienter Stamm: S19-dP // rot: S3-A66.1, Abk.: S3-A // gelb: S3-6303, Abk.: S3-6

beige: polymikrobielle Peritonitis, Abk.: PCI (*Peritoneal Infection & Contamination*)

Scheinoperierte Tiere werden als sham (hellblau) bezeichnet, unbehandelte als naive (weiße Füllung). °... Ausreißer (1,5–3xIQR); \*... Extremwerte (ab 3xIQR)

Angegeben durch eckige Klammern sind die signifikanten Veränderungen der Genexpression laut M-W-U-Test im Vergleich zur entsprechenden sham-Gruppe (+...6h bzw. #...24h).

Die grauen Rechtecke signalisieren, ausgehend vom Median der zugehörigen sham-Gruppe, den jeweils angenommenen Bereich in dem keine biologische Relevanz vorliegt. Befindet sich der Median einer Behandlungsgruppe außerhalb der Fläche, wird zumindest von einer Verdoppelung der Expressionsrate ausgegangen, welche als biologisch relevant gewertet wird.

#### 4.2.1.2 Mvd

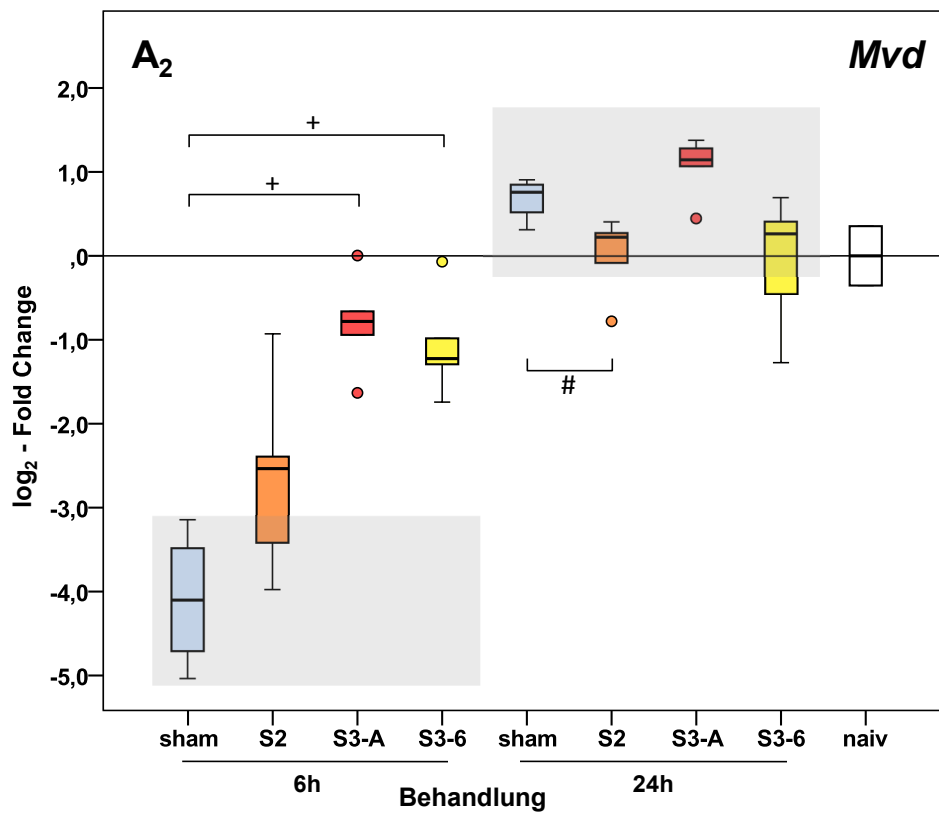
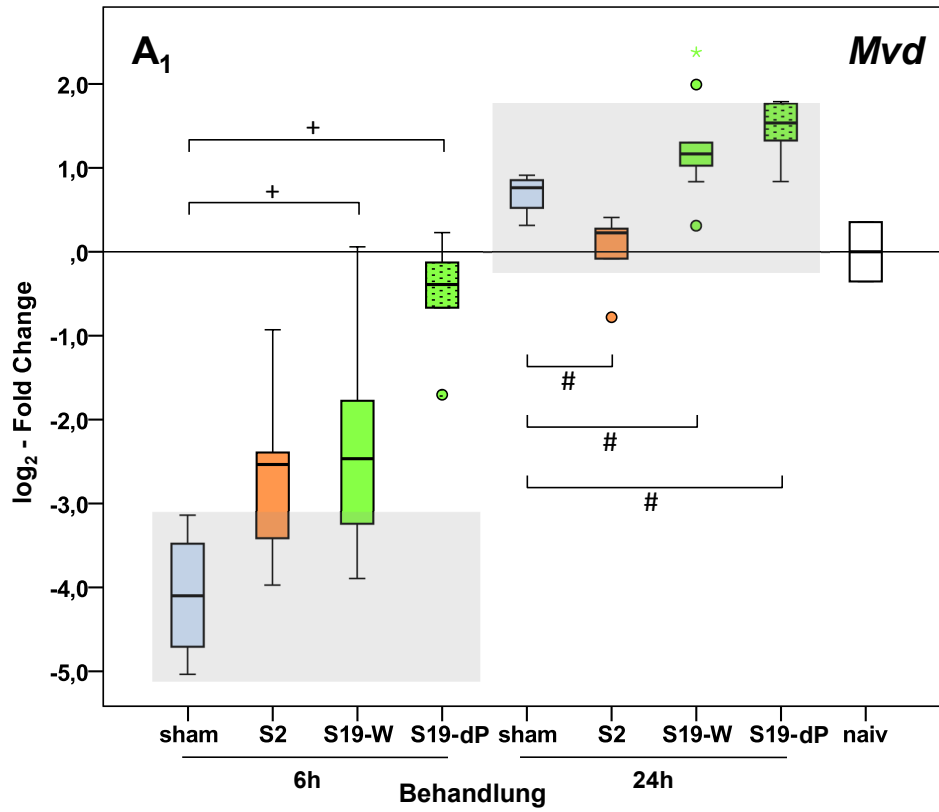
Im Pneumoniemodell (Abb. 11-A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) zeigt sich für *Mvd* 6h nach Infektion eine wesentlich stärkere Regulation der Genexpression mit größerer Streuung der Werte der Individuen, als nach 24h. Außerdem liegt ein deutlicher sham-Effekt vor, welcher hier einer Verringerung der Transkriptmenge auf 1/16 des Wertes bei naiven Tieren entspricht.

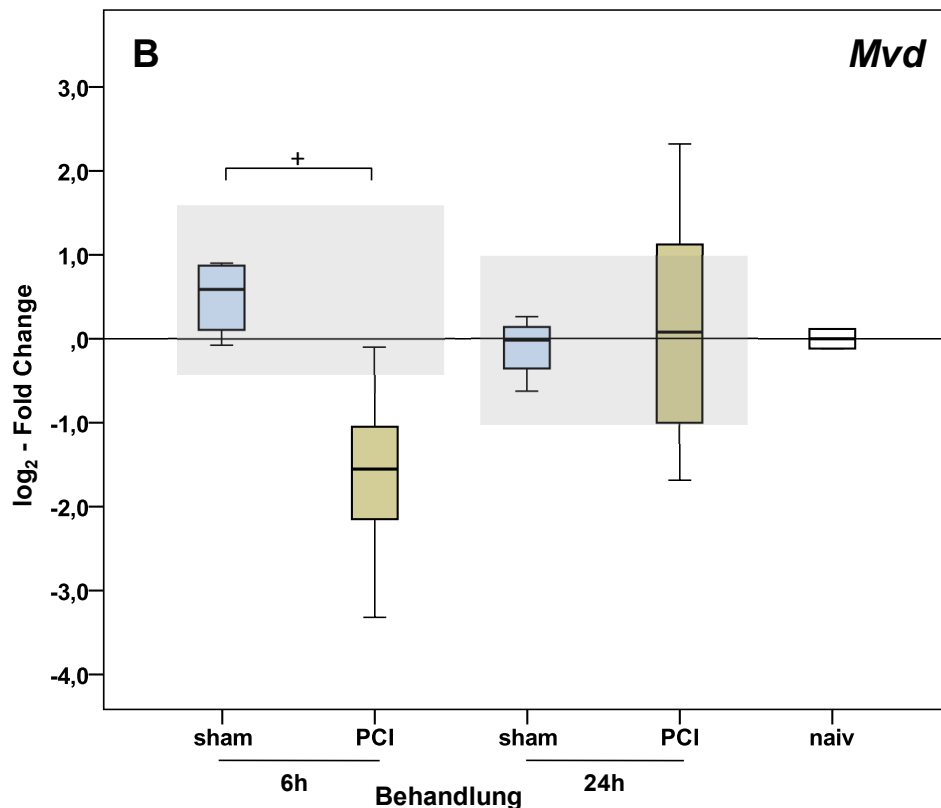
Im Vergleich zur sham-Gruppe liegt bei 6h eine Steigerung der Genexpression bei allen untersuchten Serotypen vor: der hochvirulente Stamm S2 und der niedrigvirulente S19-W zeigen eine Verdreifachung der Expression des *Mvd*-Transkriptes. Die Pneumolysin-defiziente Form von S19 verzeichnet eine massive Erhöhung um den Faktor 13, bei geringer Streuung der Werte (Abb. 11-A<sub>1</sub>). S3-A und S3-6 zeigen trotz unterschiedlicher Virulenz ein ähnliches Muster einer Hochregulation der Genexpression um das 10 bzw. 7,3 fache (Abb. 11-A<sub>2</sub>).

Zum Zeitpunkt 24h ist der sham-Effekt mit Hochregulation nur schwach ausgeprägt. S2 zeigt eine Herabregulation auf 70% und die Serotypen S19-W und S19-dP verzeichnen einen leichten Anstieg um die Faktoren 1,3 und 1,7. Diese Veränderungen, wie auch die Expressionsniveaus von S3-A und S3-6 liegen innerhalb des biologisch nicht relevanten Bereichs.

Im PCI-Modell (Abb. 11-B) ist die Transkriptmenge von *Mvd* in der 6h Gruppe auf etwa 1/4 im Vergleich zur sham-Gruppe zurückgegangen, außerdem ist eine geringe Expressionssteigerung der sham-Gruppe zu verzeichnen. Nach 24h sind keine Veränderungen messbar.

*Die untersuchten Modelle reagieren gegensätzlich: Anders als die starke Hochregulation in der Pneumonie zeigt die Peritonitis eine Herabregulation der Genexpression. Die Effekte sind nach 6h deutlicher zu erkennen.*





**Abb. 11: hepatische Expression von *Mvd* im Pneumoniemodell (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) und Peritonitismodell (B)**

Die Expressionsdaten sind zu den Beobachtungszeitpunkten 6h und 24h für die verschiedenen Behandlungsgruppen dargestellt. Die Gruppen wurden farblich codiert und mit folgenden Abkürzungen dargestellt:

orange: S2-D39, Abk.: S2 // grün: S19-EF3030, Abk.: Wildtyp: S19-W, pneumolysindefizienter Stamm: S19-dP // rot: S3-A66.1, Abk.: S3-A // gelb: S3-6303, Abk.: S3-6  
beige: polymikrobielle Peritonitis, Abk.: PCI (*Peritoneal Infection & Contamination*)

Scheinoperierte Tiere werden als sham (hellblau) bezeichnet, unbehandelte als naiv (weiße Füllung). °... Ausreißer (1,5–3xIQR); \*... Extremwerte (ab 3xIQR)

Angegeben durch eckige Klammern sind die signifikanten Veränderungen der Genexpression laut M-W-U-Test im Vergleich zur entsprechenden sham-Gruppe (+...6h bzw. #...24h).

Die grauen Rechtecke signalisieren, ausgehend vom Median der zugehörigen sham-Gruppe, den jeweils angenommenen Bereich in dem keine biologische Relevanz vorliegt. Befindet sich der Median einer Behandlungsgruppe außerhalb der Fläche, wird zumindest von einer Verdoppelung der Expressionsrate ausgegangen, welche als biologisch relevant gewertet wird.



### 4.2.1.3 Fdps

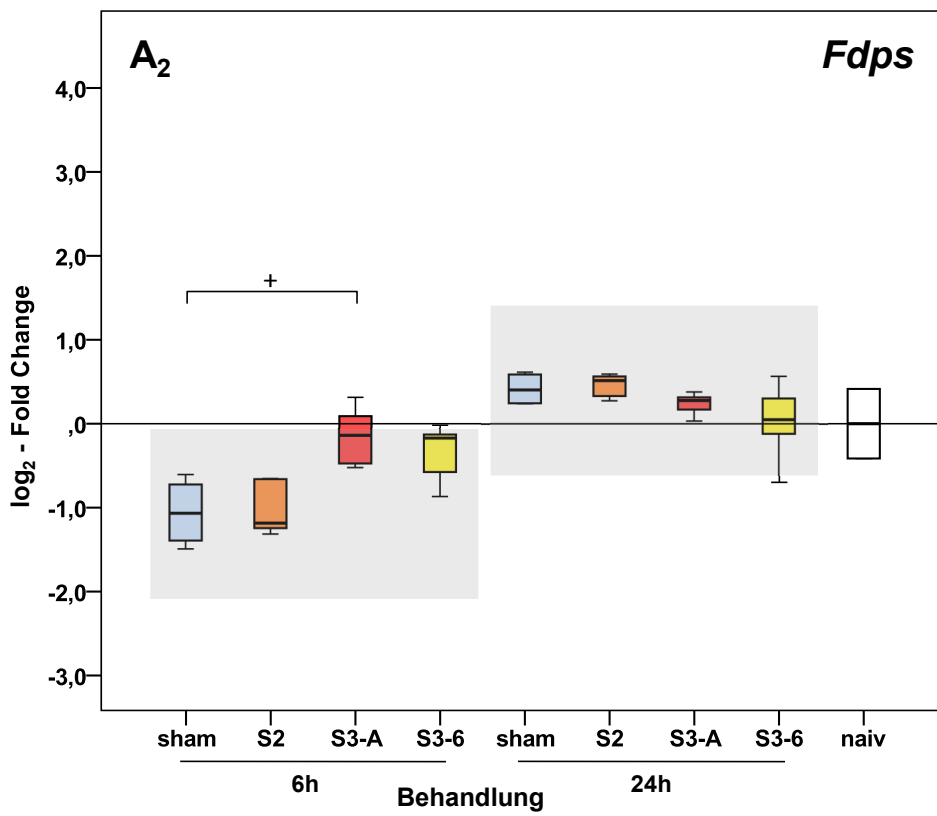
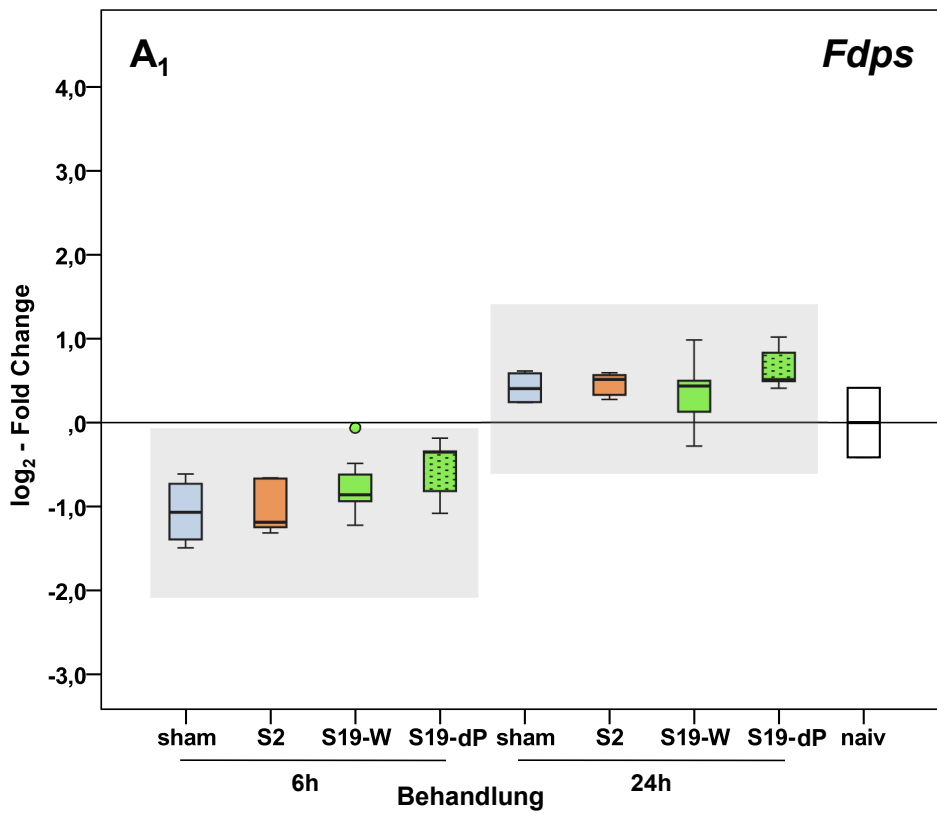
Im Modell der Pneumokokken-induzierten Pneumonie (Abb. 12-A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) sind sham-Effekte zu erkennen. Die Genexpression von *Fdps* ist nach 6h auf die Hälfte reduziert und nach 24h tendenziell gesteigert.

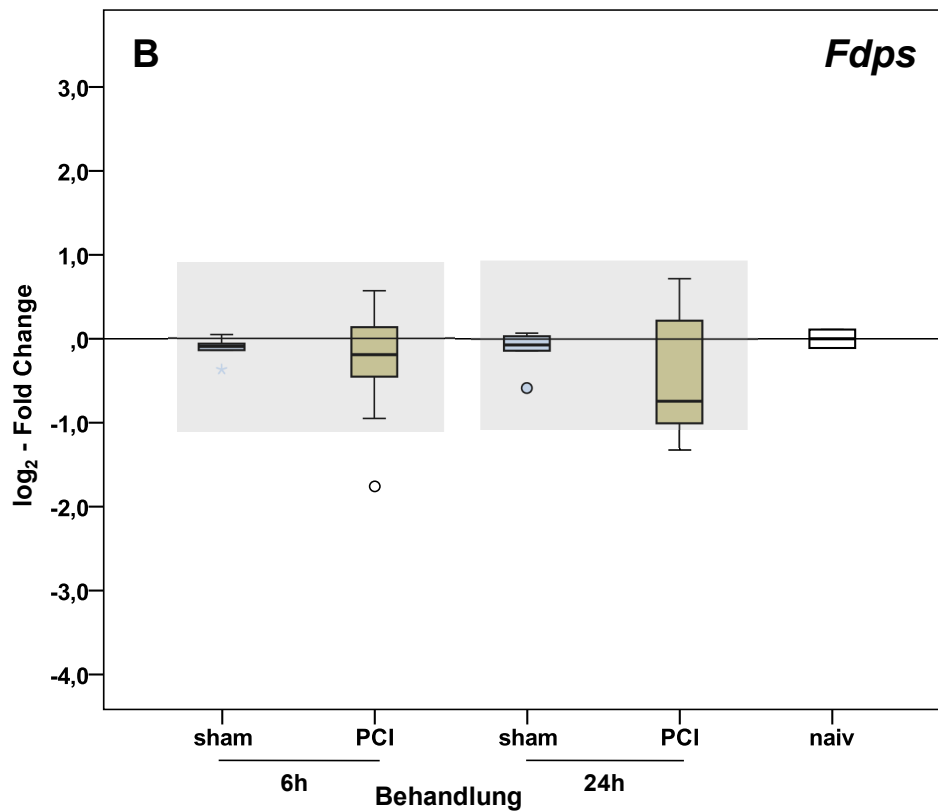
Die Infektionsgruppen in Abbildung Abb. 12-A<sub>1</sub> zeigen keine Abweichungen vom Expressionsniveau der zugehörigen sham-Gruppe (6h/24h). Allein der hochvirulente Stamm S3-A (Abb. 12-A<sub>2</sub>) zeigt 6h nach Infektion eine signifikante Hochregulation um den Faktor 1,9. Der niedrigvirulente Serotyp S3-6 zeigt eine ähnliche Tendenz, welche durch die Streuung der Messwerte nicht signifikant getestet wurde. Zum Beobachtungszeitpunkt 24h ist keine Regulation im Vergleich zu sham zu erkennen. Keine der Expressionsveränderungen liegen im biologisch relevanten Bereich.

In dieser Untersuchung fällt ein relativ großer Unterschied in den Expressionswerten der zwei naiven Tiere, welche zur Normalisierung verwendet wurden, auf.

Das PCI-Modell (Abb. 12-B) zeigt ein unreguliertes Bild: Die Mediane der Scheinbehandlungsgruppe und Peritonitisgruppe liegen auf dem Niveau der unbehandelten Tiere. Die Streuung der Ergebnisse ist in diesem Modell, wie schon bei anderen Transkripten ersichtlich, größer als im Pneumoniemodell.

*In beiden Modellen haben die Behandlungen mit den verschiedenen Erregern nur einen marginalen Effekt auf die Transkription von Fdps und liegen nicht im biologisch relevanten Bereich.*





**Abb. 12: hepatische Expression von *Fdps* im Pneumoniemodell (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) und Peritonitismodell (B)**

Die Expressionsdaten sind zu den Beobachtungszeitpunkten 6h und 24h für die verschiedenen Behandlungsgruppen dargestellt. Die Gruppen wurden farblich codiert und mit folgenden Abkürzungen dargestellt:

orange: S2-D39, Abk.: S2 // grün: S19-EF3030, Abk.: Wildtyp: S19-W, pneumolysindefizienter Stamm: S19-dP // rot: S3-A66.1, Abk.: S3-A // gelb: S3-6303, Abk.: S3-6  
beige: polymikrobielle Peritonitis, Abk.: PCI (*Peritoneal Infection & Contamination*)

Scheinoperierte Tiere werden als sham (hellblau) bezeichnet, unbehandelte als naiv (weiße Füllung). °... Ausreißer (1,5–3xIQR); \*... Extremwerte (ab 3xIQR)

Angegeben durch eckige Klammern sind die signifikanten Veränderungen der Genexpression laut M-W-U-Test im Vergleich zur entsprechenden sham-Gruppe (+...6h bzw. #...24h).

Die grauen Rechtecke signalisieren, ausgehend vom Median der zugehörigen sham-Gruppe, den jeweils angenommenen Bereich in dem keine biologische Relevanz vorliegt. Befindet sich der Median einer Behandlungsgruppe außerhalb der Fläche, wird zumindest von einer Verdoppelung der Expressionsrate ausgegangen, welche als biologisch relevant gewertet wird.

## 4.2.2 Expressionsmuster: Transkriptionsfaktorenaktivität modifizierende Membran- und Transportproteine

### 4.2.2.1 Scap

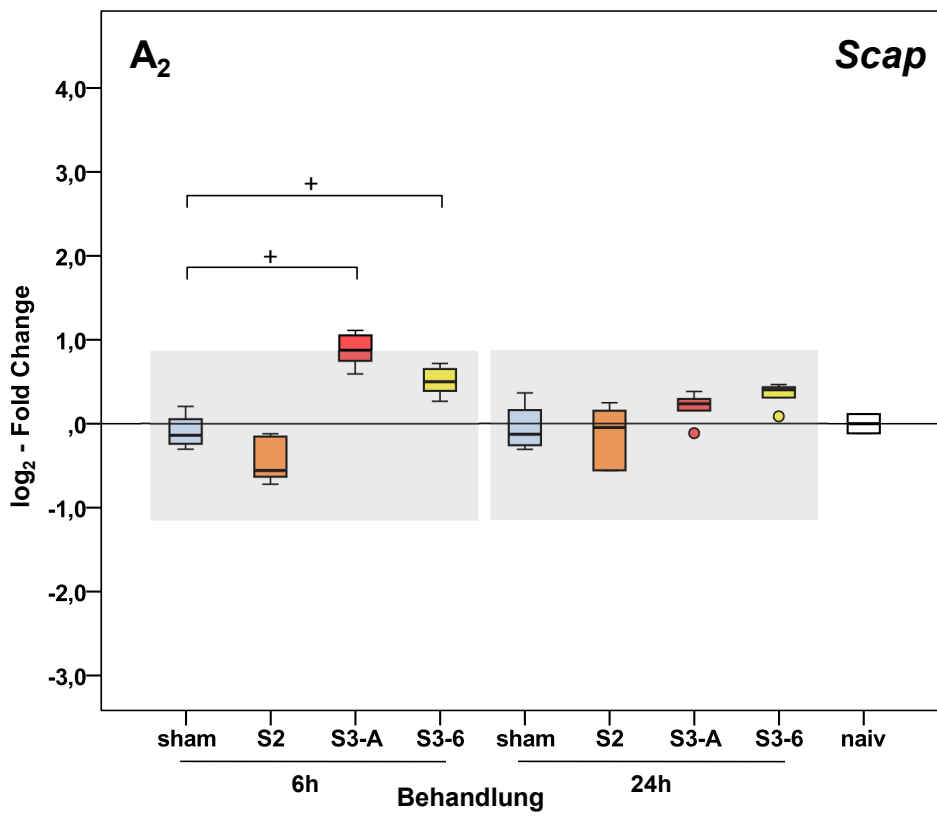
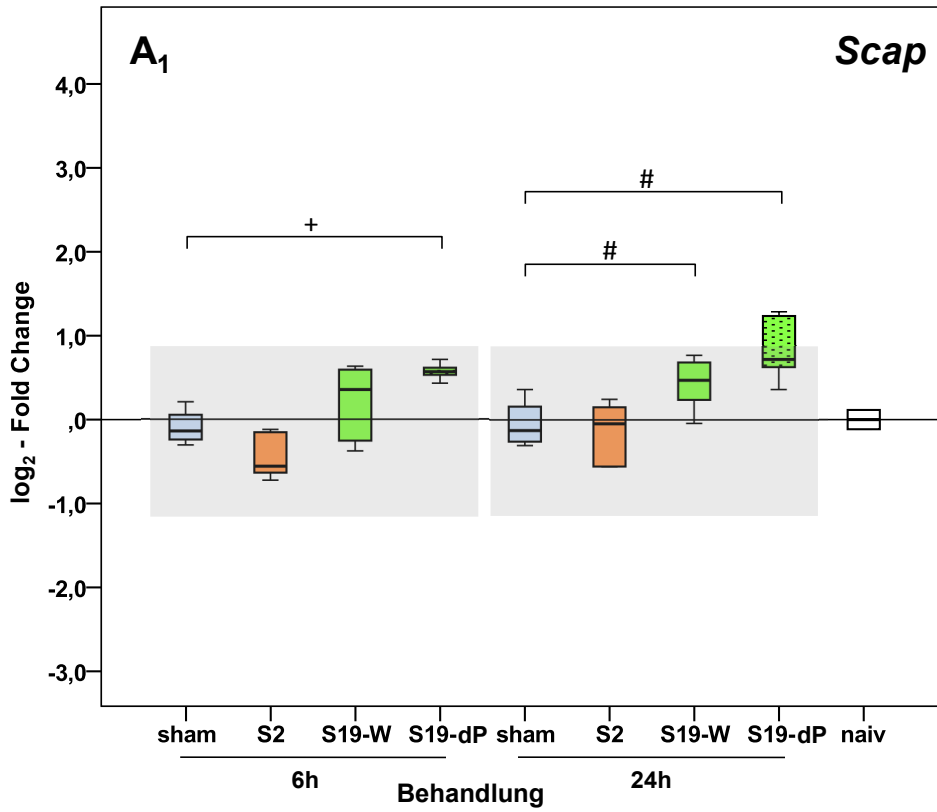
Im Pneumoniemodell (Abb. 13-A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) zeigen die Expressionswerte für *Scap* für S2 bei 6h eine tendenzielle Verringerung der Transkriptmenge im Vergleich zur sham-Gruppe. Diese Veränderung ist 24h nach Infektion nicht mehr zu erkennen.

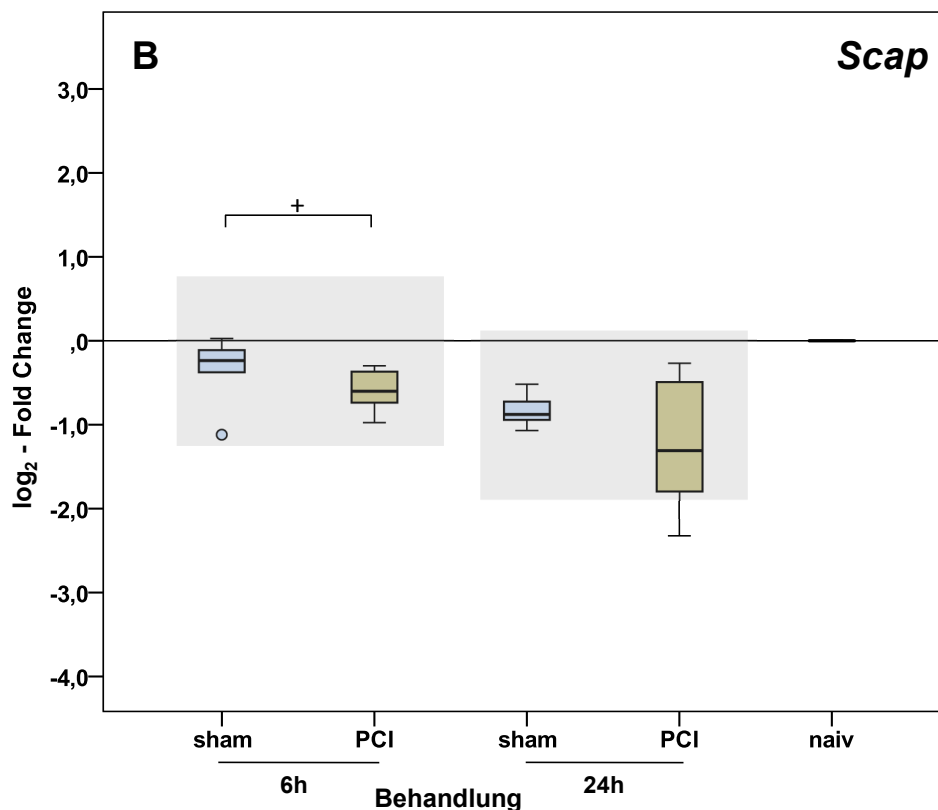
S19-W und S19-dP (Abb. 13-A<sub>1</sub>) zeigen nach 6h zumindest tendenziell eine Steigerung der Genexpressionsrate um den Faktor 1,5 (bei S19-W keine Signifikanz durch stärkere Streuung der Einzelwerte) und nach 24h bleibt dieses Expressionsmuster erhalten.

Zum Beobachtungszeitpunkt 6h ist eine Erhöhung der hepatischen Expression des *Scap* Transkriptes um das doppelte bei dem hochvirulenten S3-A und um das 1,6fache bei dem niedrigvirulenten S3-6 zu verzeichnen. Nach 24h geht diese Hochregulation zurück und ist nicht mehr signifikant zur sham-Gruppe (24h) messbar.

Das Modell der polymikrobiellen Peritonitis (Abb. 13-B) zeigt sham-Effekte, die tendenziell zur Senkung der Expression von *Scap* im Vergleich zur unbehandelten Gruppe führen: nach 24h entspricht diese etwa einer Halbierung. Der Beobachtungszeitpunkt 6h zeigt eine signifikante Herabregulation der Expression auf 3/4 der Expression der 6h sham-Tiere. Dieses Muster bleibt auch nach 24h bestehen, allerdings nimmt die Streuung der Einzelwerte zu, sodass nun nicht mehr von Signifikanz ausgegangen werden kann.

*Beide Modelle zeigen nur geringe Expressionsveränderungen. Im Pneumoniemodell reagieren alle Serotypen mit Ausnahme von S2 mit einer Steigerung der Expression. Im Gegensatz dazu zeigt die polymikrobielle Peritonitis eine leichte aber konsistente Senkung der Genexpression. Ähnlich verhält sich der hochvirulente S2 nach 6h. Die beobachteten Veränderungen liegen außerhalb des biologisch relevanten Bereichs.*





**Abb. 13: hepatische Expression von Scap im Pneumoniemodell (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) und Peritonitismodell (B)**

Die Expressionsdaten sind zu den Beobachtungszeitpunkten 6h und 24h für die verschiedenen Behandlungsgruppen dargestellt. Die Gruppen wurden farblich codiert und mit folgenden Abkürzungen dargestellt:

orange: S2-D39, Abk.: S2 // grün: S19-EF3030, Abk.: Wildtyp: S19-W, pneumolysindefizienter Stamm: S19-dP // rot: S3-A66.1, Abk.: S3-A // gelb: S3-6303, Abk.: S3-6  
beige: polymikrobielle Peritonitis, Abk.: PCI (*Peritoneal Infection & Contamination*)

Scheinoperierte Tiere werden als sham (hellblau) bezeichnet, unbehandelte als naiv (weiße Füllung). °... Ausreißer (1,5–3xIQR); \*... Extremwerte (ab 3xIQR)

Angegeben durch eckige Klammern sind die signifikanten Veränderungen der Genexpression laut M-W-U-Test im Vergleich zur entsprechenden sham-Gruppe (+...6h bzw. #...24h).

Die grauen Rechtecke signalisieren, ausgehend vom Median der zugehörigen sham-Gruppe, den jeweils angenommenen Bereich in dem keine biologische Relevanz vorliegt. Befindet sich der Median einer Behandlungsgruppe außerhalb der Fläche, wird zumindest von einer Verdoppelung der Expressionsrate ausgegangen, welche als biologisch relevant gewertet wird.

#### 4.2.2.2 Insig1

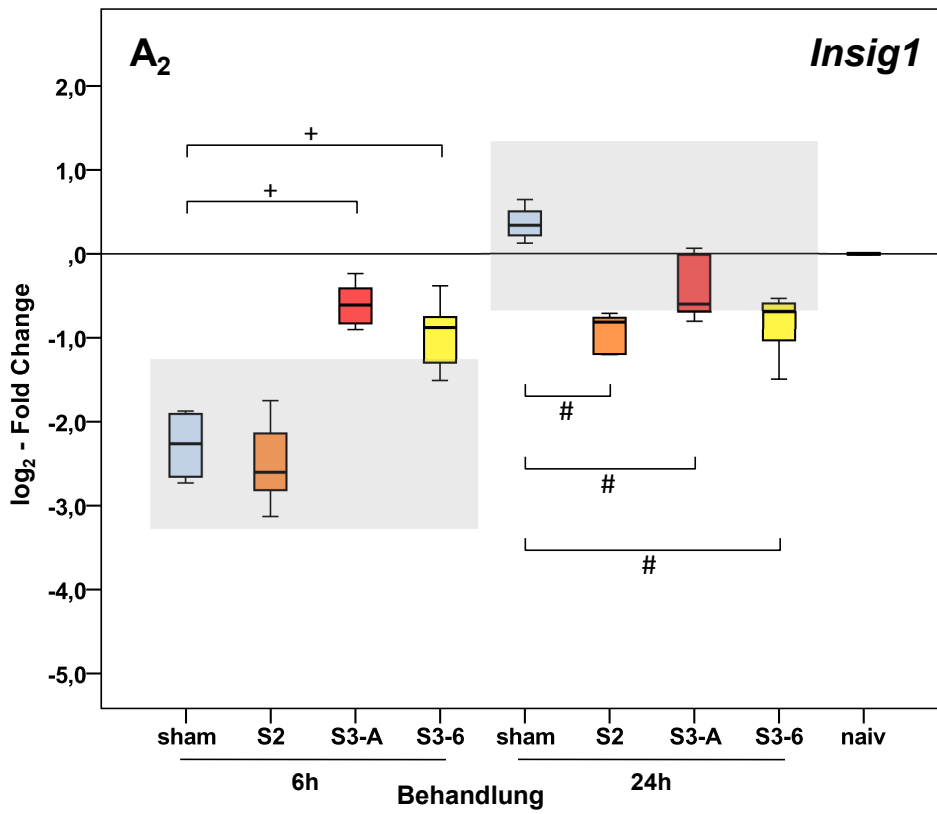
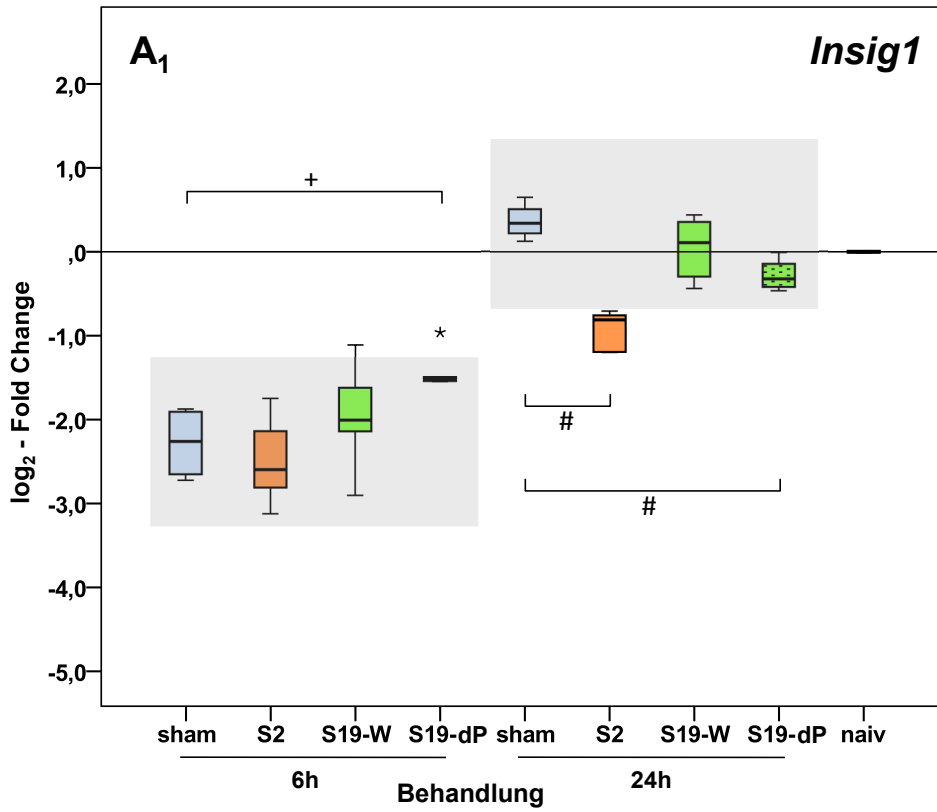
Im Pneumoniemodell (Abb. 14-A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) ist ein deutlicher Effekt der Scheinbehandlung auf die Genexpression von *Insig1* erkennbar. Nach 6h ist diese biologisch relevant auf weniger als 1/4 der Vergleichsexpression von unbehandelten Tieren gefallen und nach 24h zeigt sich hingegen tendenziell ein leichter Anstieg der Expression.

Zum Beobachtungszeitpunkt 6h (Abb. 14-A<sub>1</sub>) zeigen die Serotypen S2, S19-W und S19-dP Expressionsveränderungen im nicht biologisch relevanten Bereich. Dabei zeigt S19-dP eine eindeutige Steigerung um den Faktor 1,7. Eine deutlichere Regulation ist bei dem hochvirulenten Serotyp S3-A (Faktor 3,2) und dem niedrigvirulenten Serotyp S3-6 (Faktor 2,6) zu beobachten (Abb. 14-A<sub>2</sub>).

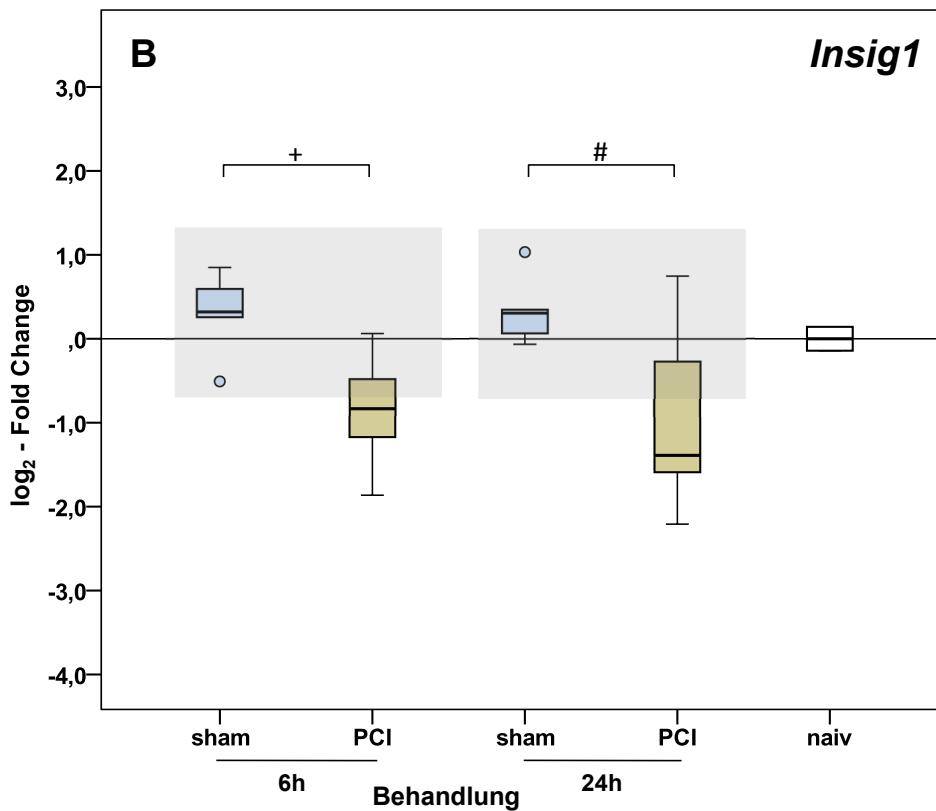
24h nach Infektion ist bei allen Serotypen ein zumindest tendenzielles Abfallen der Genexpression im Vergleich zur sham-Gruppe auffällig. Dabei ist bei S2, S3-A und S3-P ist eine signifikante Halbierung der Expressionsrate zu verzeichnen. Auch mit S19-dP verringert sich die Rate um Faktor 0,7.

Im Peritonitismodell (Abb. 14-B) ist bei scheinoperierten Tieren die Expressionsrate zu beiden Zeitpunkten konstant leicht erhöht. Im Vergleich dazu zeigt sich eine Senkung der Expression durch die PCI Injektion auf die Hälfte zum Beobachtungszeitpunkt 6h und auf 1/3 nach 24h mit stärkerer Streuung der Werte.

*Die Pneumokokken-induzierte Pneumonie zeigt Beobachtungszeitpunktsabhängige Expressionstendenzen: der Erhöhung der Expression nach 6h steht die Senkung nach 24h entgegen. Im Gegensatz dazu ist bei polymikrobieller Peritonitis eine eindeutige Senkung der Expression zu beobachten.*







**Abb. 14: hepatische Expression von *Insig1* im Pneumoniemodell (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) und Peritonitismodell (B)**

Die Expressionsdaten sind zu den Beobachtungszeitpunkten 6h und 24h für die verschiedenen Behandlungsgruppen dargestellt. Die Gruppen wurden farblich codiert und mit folgenden Abkürzungen dargestellt:

orange: S2-D39, Abk.: S2 // grün: S19-EF3030, Abk.: Wildtyp: S19-W, pneumolysindefizienter Stamm: S19-dP // rot: S3-A66.1, Abk.: S3-A // gelb: S3-6303, Abk.: S3-6  
beige: polymikrobielle Peritonitis, Abk.: PCI (*Peritoneal Infection & Contamination*)

Scheinoperierte Tiere werden als sham (hellblau) bezeichnet, unbehandelte als naive (weiße Füllung). °... Ausreißer (1,5–3xIQR); \*... Extremwerte (ab 3xIQR)

Angegeben durch eckige Klammern sind die signifikanten Veränderungen der Genexpression laut M-W-U-Test im Vergleich zur entsprechenden sham-Gruppe (+...6h bzw. #...24h).

Die grauen Rechtecke signalisieren, ausgehend vom Median der zugehörigen sham-Gruppe, den jeweils angenommenen Bereich in dem keine biologische Relevanz vorliegt. Befindet sich der Median einer Behandlungsgruppe außerhalb der Fläche, wird zumindest von einer Verdoppelung der Expressionsrate ausgegangen, welche als biologisch relevant gewertet wird.

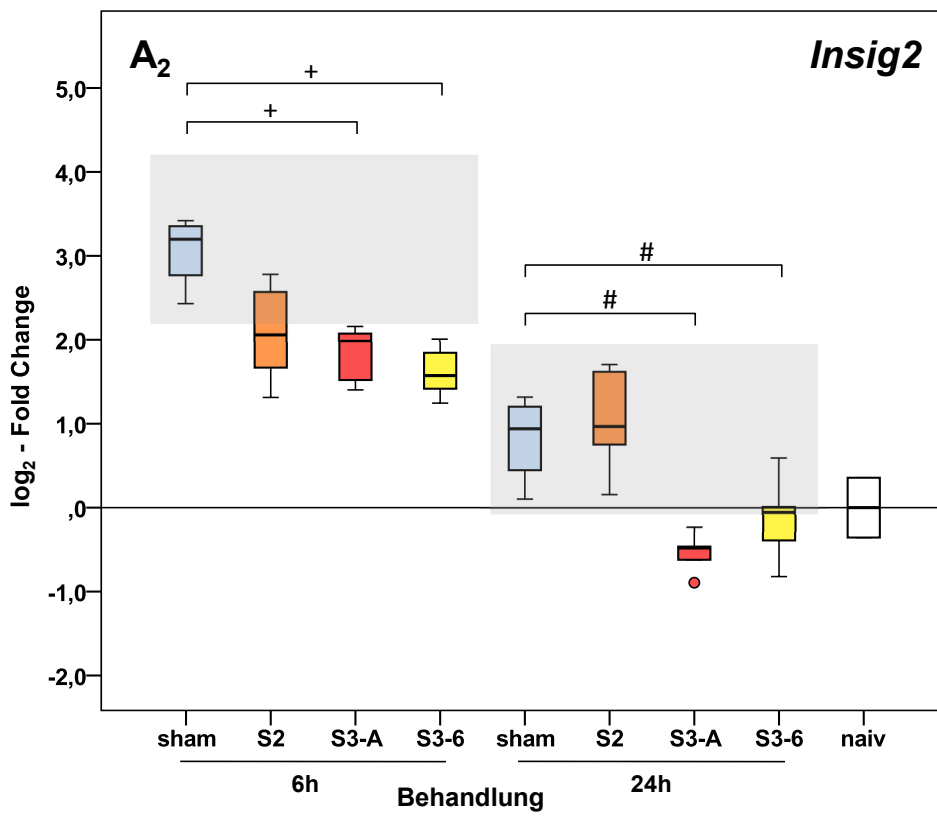
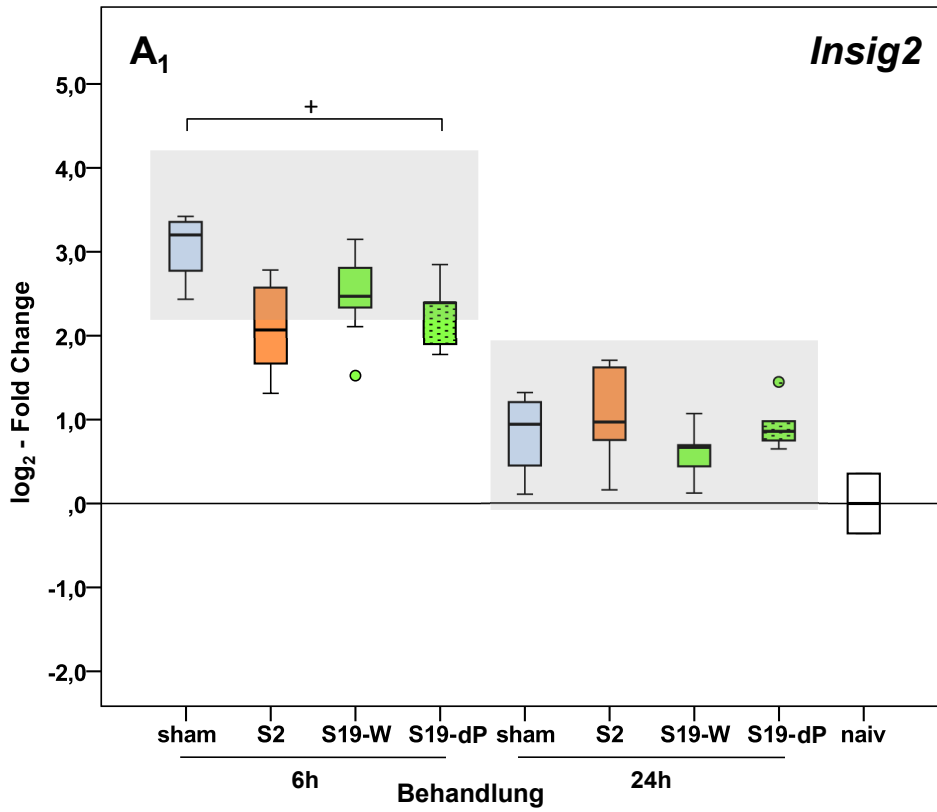
#### 4.2.2.3 Insig2

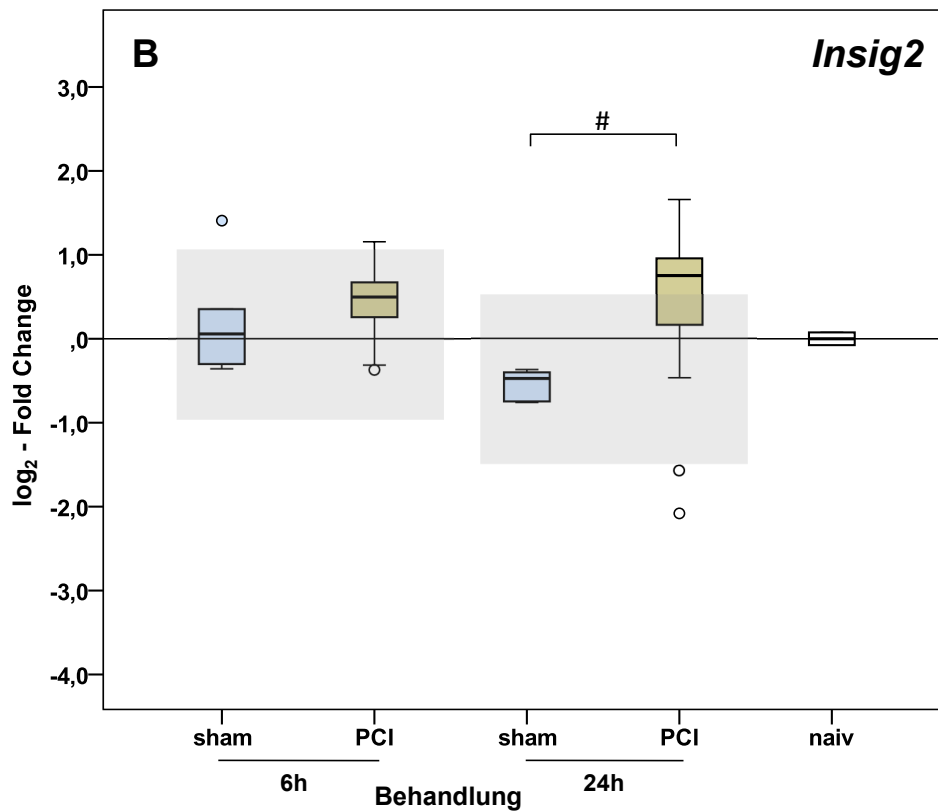
Im Pneumoniemodell (Abb. 15-A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) ist ein starker Effekt der Scheinbehandlung (sham) zu erkennen. Nach 6h ist die Expression im Vergleich zu naiv verachtfacht und nach 24h ist eine Verdoppelung zu verzeichnen. Zum Beobachtungszeitpunkt 6h zeigt sich eine zumindest tendenziell verringerte Expressionsrate bei allen untersuchten Serotypen. Die Veränderung von S2 entspricht einer biologisch relevanten Halbierung der Expression, trotz nicht vorliegender Signifikanz. S3-A und S3-6 (Abb. 15-A<sub>2</sub>) zeigen die stärkste Reaktion mit einer Senkung durch Faktor 0,4 bei S3-A und durch Faktor 0,3 bei S3-6. Die Serotypen S19-W und S19-dP (Abb. 15-A<sub>1</sub>) weisen ein ähnliches Muster auf, allerdings werden hier die Kriterien für biologische Relevanz nicht erfüllt.

Nach 24h liegt die Senkung der Genexpression bei Behandlung mit Serotyp S3-A und S3-6 im gleichen Bereich wie nach 6h (Abb. 15-A<sub>2</sub>). Die übrigen Serotypen zeigen marginale Schwankungen im nicht biologisch relevanten Bereich.

Im Peritonitismodell (Abb. 15-B) ist eine zumindest tendenzielle Expressionssteigerung zu verzeichnen. Nach 24h zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Expression um den Faktor 2,4. Eindeutige sham-Effekte sind in diesem Modell nicht zu beobachten.

*Pneumonie und Peritonitis zeigen eine gegensätzliche Richtung der Genexpressionsveränderung. Die Senkung der Expression bei allen untersuchten Serotypen im Pneumoniemodell steht der Steigerung der Expression bei Peritonitis entgegen.*





**Abb. 15: hepatische Expression von *Insig2* im Pneumoniemodell (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) und Peritonitismodell (B)**

Die Expressionsdaten sind zu den Beobachtungszeitpunkten 6h und 24h für die verschiedenen Behandlungsgruppen dargestellt. Die Gruppen wurden farblich codiert und mit folgenden Abkürzungen dargestellt:

orange: S2-D39, Abk.: S2 // grün: S19-EF3030, Abk.: Wildtyp: S19-W, pneumolysindefizienter Stamm: S19-dP // rot: S3-A66.1, Abk.: S3-A // gelb: S3-6303, Abk.: S3-6  
beige: polymikrobielle Peritonitis, Abk.: PCI (*Peritoneal Infection & Contamination*)

Scheinoperierte Tiere werden als sham (hellblau) bezeichnet, unbehandelte als naive (weiße Füllung). °... Ausreißer (1,5–3xIQR); \*... Extremwerte (ab 3xIQR)

Angegeben durch eckige Klammern sind die signifikanten Veränderungen der Genexpression laut M-W-U-Test im Vergleich zur entsprechenden sham-Gruppe (+...6h bzw. #...24h).

Die grauen Rechtecke signalisieren, ausgehend vom Median der zugehörigen sham-Gruppe, den jeweils angenommenen Bereich in dem keine biologische Relevanz vorliegt. Befindet sich der Median einer Behandlungsgruppe außerhalb der Fläche, wird zumindest von einer Verdoppelung der Expressionsrate ausgegangen, welche als biologisch relevant gewertet wird.

### 4.2.3 Expressionsmuster: Transkriptionsfaktoren

#### 4.2.3.1 Sreb1

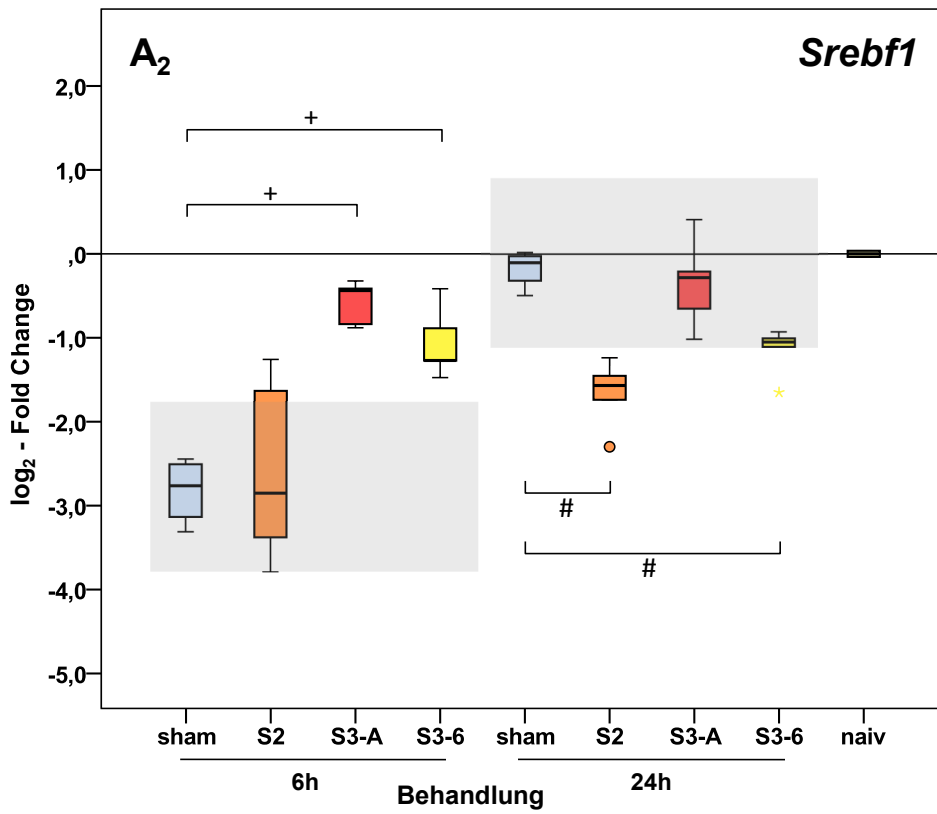
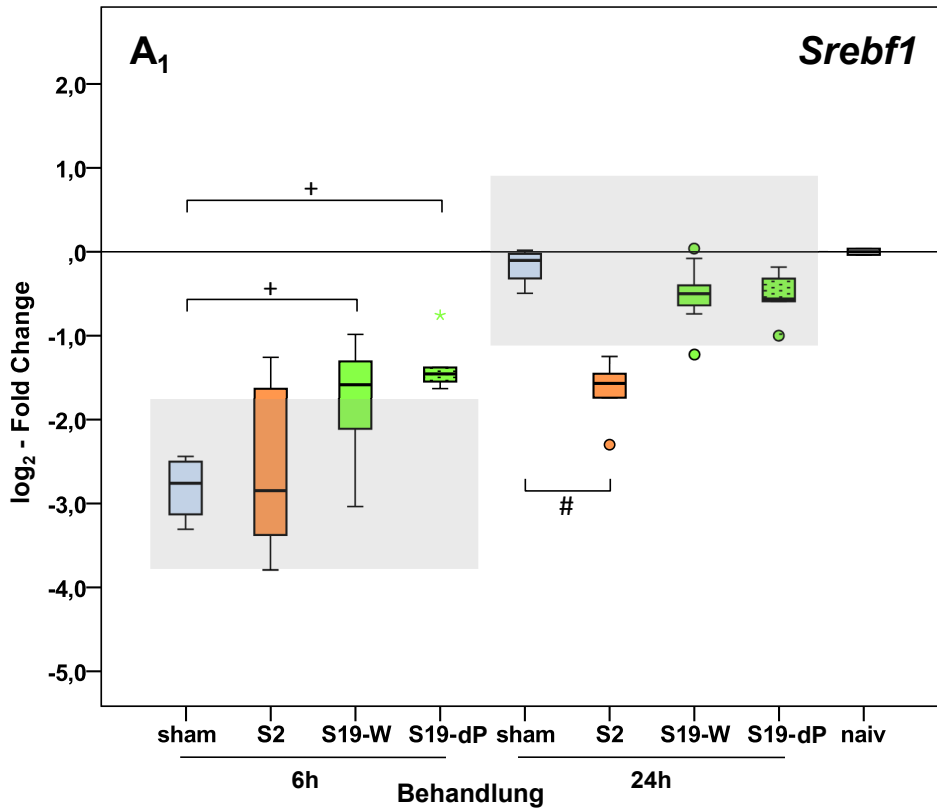
Im Pneumoniemodell (Abb. 16-A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) ist 6h nach Infektion ein deutlicher sham-Effekt zu beobachten. Die Expression ist im Vergleich zu naiv auf fast 1/8 zurückgegangen. Nach 24h jedoch liegt der Median sham-Gruppe auf Niveau der unbehandelten Tiere (naiv).

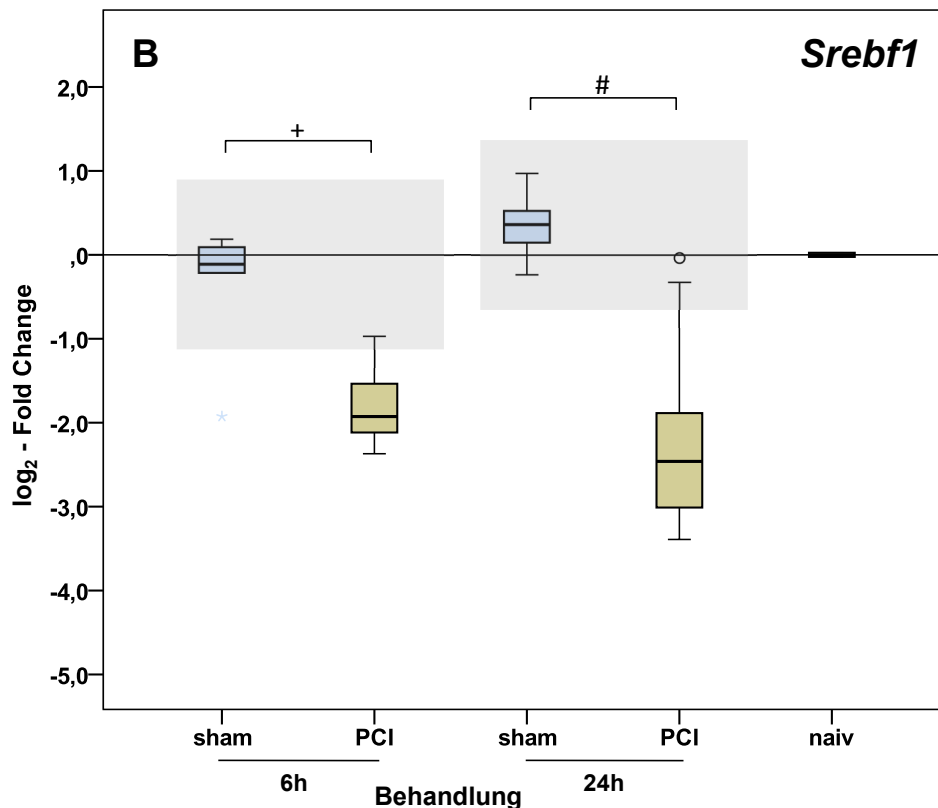
Zum Beobachtungszeitpunkt 6h sind deutliche Genexpressionssteigerungen bei S19-W (2,3fach mit großer Streuung), S19-dP (2,5fach), S3-A (5fach) sowie S3-6 (2,8fach) zu verzeichnen (Abb. 16-A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>). Bei S2 zeigt sich eine starke Streuung der Einzelwerte mit nur geringer Veränderung der Medianlage.

Nach 24h ist bei Behandlung mit S2 (Abb. 16-A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) eine eindeutige Absenkung der Expression auf etwa 1/3 im Vergleich zur sham-Gruppe (24h) zu beobachten. Die anderen untersuchten Serotypen (S19-W, S19-dP, S3-A, S3-6) zeigen eine zumindest tendenzielle Senkung der Expression im nicht biologisch relevanten Bereich. Für S3-6 (Abb. 16- A<sub>2</sub>) kann von einer signifikanten Halbierung der Expression ausgegangen werden.

Im Peritonitismodell (Abb. 16-B) ist bei marginal ausgeprägtem sham-Effekt eine Senkung der Genexpression in der PCI-Gruppe zu beobachten: Nach 6h zeigt sich eine Senkung auf etwa 1/4 der Ausgangsexpression bei naiv und nach 24h sinkt das Niveau weiter auf 1/7 ab. Zum Beobachtungszeitpunkt 24h ist eine deutlich stärkere Streuung der Einzelwerte auffällig.

*Im Pneumoniemodell sind stark vom Beobachtungszeitpunkt abhängige Veränderungen zu beobachten. Die zumindest tendenzielle Steigerung der Expression nach 6h schlägt in eine zumindest tendenzielle Senkung nach 24h um. Im Vergleich dazu zeigen die PCI-Gruppen im Peritonitismodell eine deutliche Absenkung der Expression zu beiden Zeitpunkten. In beiden Modellen ist keine Streuung der Werte der naiven Tiere zu finden.*





**Abb. 16: hepatische Expression von *Srebf1* im Pneumoniemodell (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) und Peritonitismodell (B)**

Die Expressionsdaten sind zu den Beobachtungszeitpunkten 6h und 24h für die verschiedenen Behandlungsgruppen dargestellt. Die Gruppen wurden farblich codiert und mit folgenden Abkürzungen dargestellt:

orange: S2-D39, Abk.: S2 // grün: S19-EF3030, Abk.: Wildtyp: S19-W, pneumolysindefizienter Stamm: S19-dP // rot: S3-A66.1, Abk.: S3-A // gelb: S3-6303, Abk.: S3-6  
beige: polymikrobielle Peritonitis, Abk.: PCI (*Peritoneal Infection & Contamination*)

Scheinoperierte Tiere werden als sham (hellblau) bezeichnet, unbehandelte als naive (weiße Füllung). °... Ausreißer (1,5–3xIQR); \*... Extremwerte (ab 3xIQR)

Angegeben durch eckige Klammern sind die signifikanten Veränderungen der Genexpression laut M-W-U-Test im Vergleich zur entsprechenden sham-Gruppe (+...6h bzw. #...24h).

Die grauen Rechtecke signalisieren, ausgehend vom Median der zugehörigen sham-Gruppe, den jeweils angenommenen Bereich in dem keine biologische Relevanz vorliegt. Befindet sich der Median einer Behandlungsgruppe außerhalb der Fläche, wird zumindest von einer Verdoppelung der Expressionsrate ausgegangen, welche als biologisch relevant gewertet wird.

#### 4.2.3.2 *Srebf2*

Im Pneumoniemodell ist für *Srebf2* nur ein geringer Einfluss der sham-Behandlung auf die Genexpression zu verzeichnen.

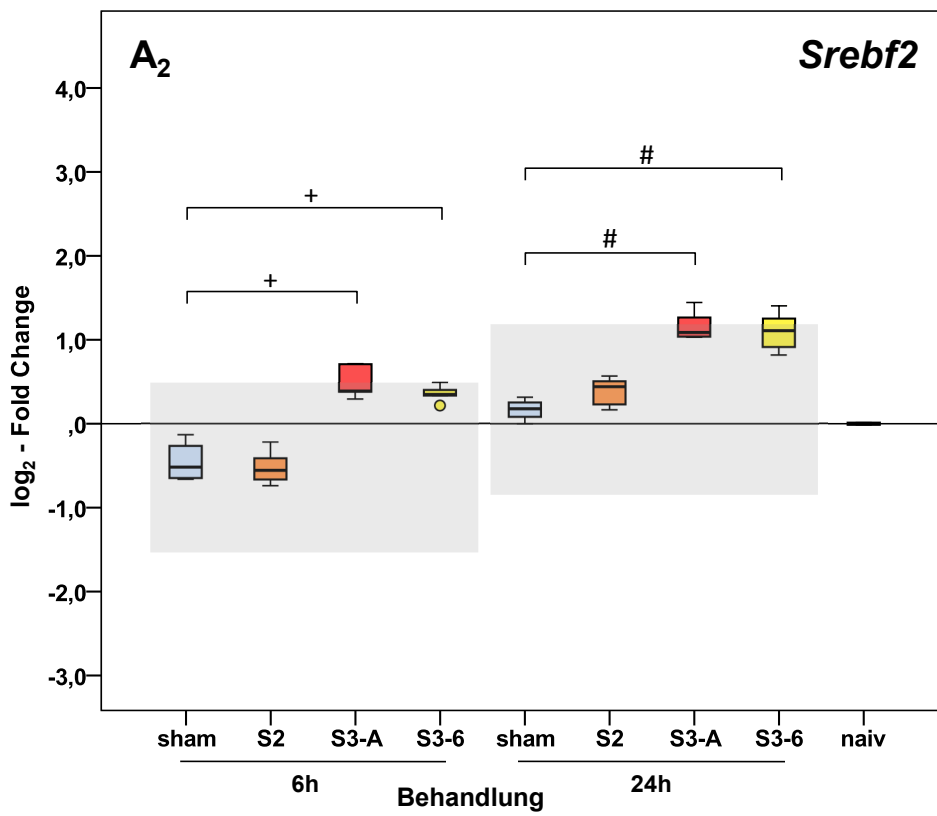
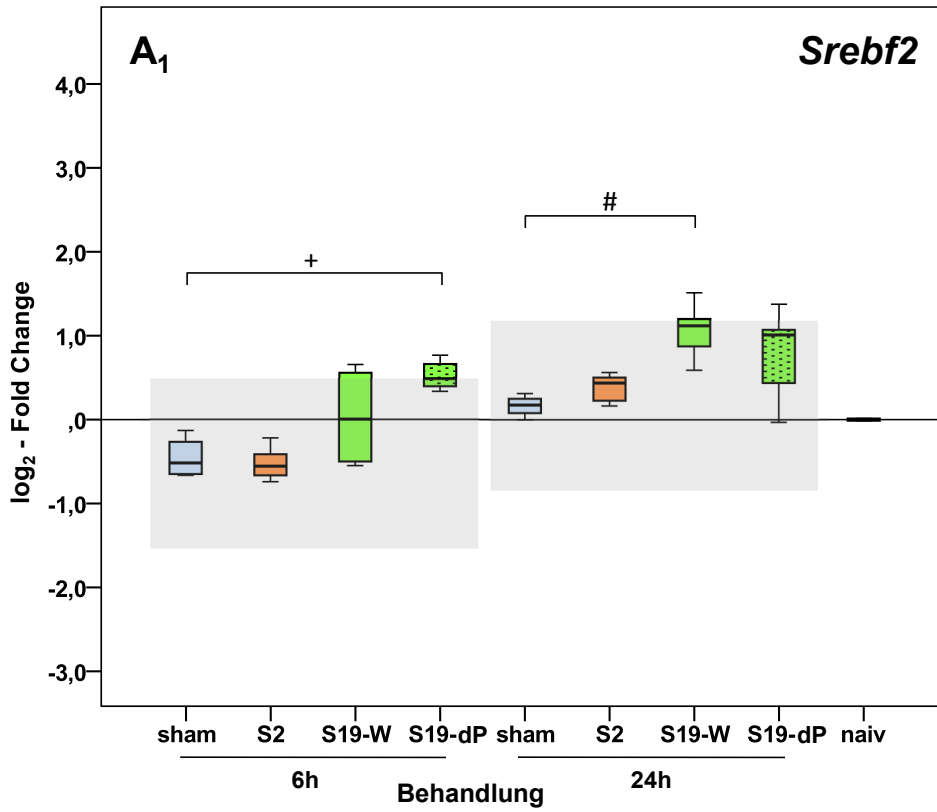
Zum Beobachtungszeitpunkt 6h ist eine zumindest tendenzielle Genexpressionssteigerung zu erkennen, welche aber im biologisch nicht relevanten Bereich liegt. S2 zeigt keine Regulation der Genexpression im Vergleich zur sham-Behandlung. Signifikante Veränderungen mit fast einer Verdoppelung der Genexpression sind bei den hochvirulenten S2 und S3-A sowie dem niedrigvirulenten S3-6 auffällig.

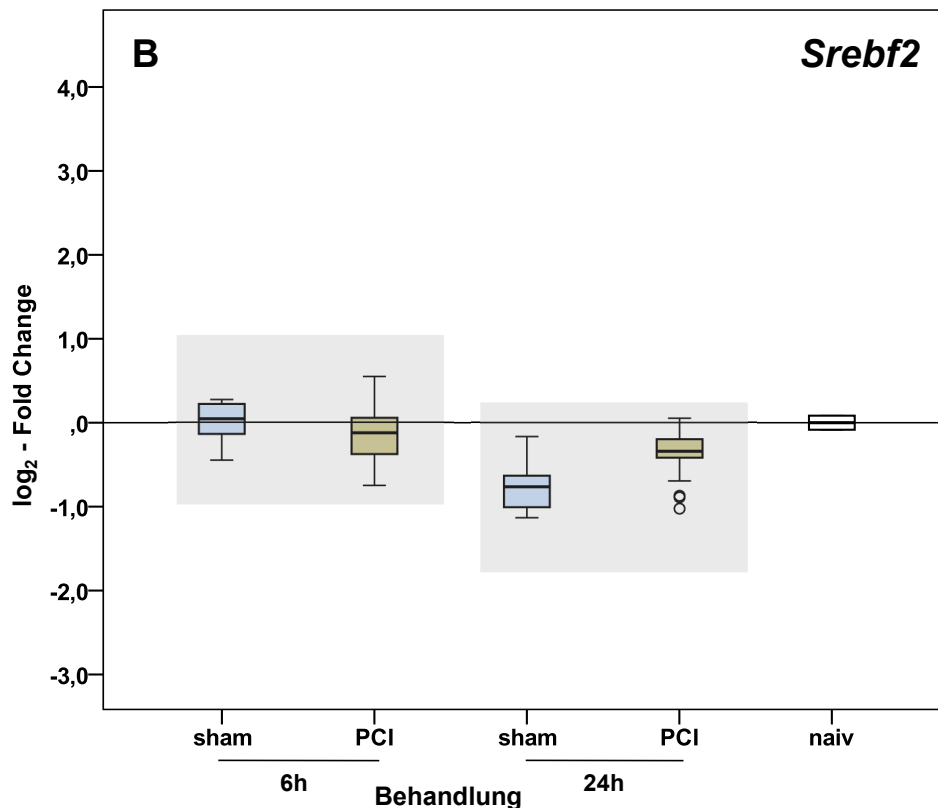
Nach 24h zeigt sich ein ähnliches Bild: nun erhöht sich die Genexpression bei S19-W auf das Doppelte und die Veränderung von S19-dP geht bei stärkerer Streuung zurück. S3-A und S3-6 weisen auch nach 24h eine Verdoppelung der Expression auf.

Im Peritonitismodell sind nur geringe Schwankungen der Genexpression ohne deutliche Regulation der PCI-Gruppen im Vergleich zur korrespondierenden sham-Gruppe zu verzeichnen.

*In beiden Modellen liegen die Genexpressionsveränderungen außerhalb des biologisch relevanten Bereichs.*







**Abb. 17: hepatische Expression von *Srebf2* im Pneumoniemodell (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) und Peritonitismodell (B)**

Die Expressionsdaten sind zu den Beobachtungszeitpunkten 6h und 24h für die verschiedenen Behandlungsgruppen dargestellt. Die Gruppen wurden farblich codiert und mit folgenden Abkürzungen dargestellt:

orange: S2-D39, Abk.: S2 // grün: S19-EF3030, Abk.: Wildtyp: S19-W, pneumolysindefizienter Stamm: S19-dP // rot: S3-A66.1, Abk.: S3-A // gelb: S3-6303, Abk.: S3-6  
beige: polymikrobielle Peritonitis, Abk.: PCI (*Peritoneal Infection & Contamination*)

Scheinoperierte Tiere werden als sham (hellblau) bezeichnet, unbehandelte als naive (weiße Füllung). °... Ausreißer (1,5–3xIQR); \*... Extremwerte (ab 3xIQR)

Angegeben durch eckige Klammern sind die signifikanten Veränderungen der Genexpression laut M-W-U-Test im Vergleich zur entsprechenden sham-Gruppe (+...6h bzw. #...24h).

Die grauen Rechtecke signalisieren, ausgehend vom Median der zugehörigen sham-Gruppe, den jeweils angenommenen Bereich in dem keine biologische Relevanz vorliegt. Befindet sich der Median einer Behandlungsgruppe außerhalb der Fläche, wird zumindest von einer Verdoppelung der Expressionsrate ausgegangen, welche als biologisch relevant gewertet wird.

### 4.3 Metabolomanalyse

Die Auswertung der Konzentrationsdaten der Cholesterolsynthesewischenprodukte Lanosterol und Desmosterol (in  $\mu\text{mol/l}$ ) erfolgt für Lebergewebeproben und für Blutplasmaproben. Es werden analog des Vorgehens im Kapitel 4.2 die Modelle: Pneumonie ( $A_1, A_2$ ) und PCI-Peritonitis (B) vergleichend gegenübergestellt. Cholesteroldaten (in  $\text{mmol/l}$ ) konnten methodenbedingt nur im Blutplasma erhoben werden und wurden ausschließlich für das Pneumoniemodell bestimmt. In den folgenden Abschnitten 4.3.1, 4.3.2 und 4.3.3 sind diese Daten statistisch ausgewertet als Box-Whisker-Plots dargestellt.

Die Auswertung erfolgte nach den gleichen Prinzipien, wie in der Genexpressionsanalyse (Kapitel 4.2):

Die behandelten Gruppen zum Beobachtungszeitpunkt von 6h/24h wurden mit entsprechenden sham-Gruppen über die Differenz ihrer Mediane ( $\bar{X}$ ) verglichen. Der Mann-Whitney-U-Test ( $\alpha=0,05$ ) diente der Überprüfung der Signifikanz zwischen zwei Gruppen (+...Signifikanz nach 6h / #...Signifikanz nach 24h).

In den Grafiken des Pneumoniemodells wird der erneut der Pneumokokkenserotyp S2-D39 in zwei Abbildungen je im Vergleich mit den anderen verwendeten Serotypen gezeigt.

Der für die Genexpression eingeführte Farbcode für die Virulenz der Erreger wird beibehalten (rot - hohe Virulenz / grün - geringe Virulenz), genauso wie die Abkürzungen der systematischen Namen: S2-D39 = S2 // S19-EF3030 = S19-W // S19-EF3030 $\Delta$ PLY = S19-dP // S3-A66.1 = S3-A // S3-6303 = S3-6

Da es sich um reine Konzentrationsdaten handelt, sind keine relativen Aussagen über die Veränderungen zwischen den Behandlungsgruppen nötig. Unbehandelte Tiere wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in die Abbildungen einbezogen.

### 4.3.1 Lanosterol

Im Lebergewebe des Pneumoniemodells zeigt sich nach 6h ein signifikanter Anstieg der Lanosterolkonzentration bei den Serotypen S19-W, S19-dP sowie bei S3-A und S3-6. Diese Veränderungen liegen im Bereich von maximal  $0,5\mu\text{mol/l}$  über der Konzentration der sham-Gruppe ( $0,5\mu\text{mol/l}$ ).

Nach 24h bleibt die Konzentration bei allen Behandlungsgruppen auf dem Niveau der sham-Tiere. S2 zeigt für beide Beobachtungszeitpunkte keine Veränderung (Abb. 18 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> linkes Panel).

Im Plasma der Versuchstiere sind noch ausgeprägtere Effekte zu beobachten: Bei starker Streuung ist nach 6h, ausgehend vom sham-Gruppen Median von  $1,0\mu\text{mol/l}$ , ein Konzentrationsanstieg auf  $1,7\mu\text{mol/l}$  bei S19-W und auf  $2,2\mu\text{mol/l}$  bei der pneumolysindefizienten Form von S19 zu verzeichnen. Die Lanosterolkonzentrationen der Serotypen S3-A und S3-6 steigen sogar auf  $2,5\mu\text{mol/l}$ .

Nach 24h sind die Konzentrationsveränderungen im Vergleich zu sham geringer ausgeprägt, aber trotzdem noch deutlich zu verzeichnen. Dabei ist der Konzentrationsanstieg von S19-dP, S3-A und S3-6 nach wie vor signifikant. S2 zeigt auch im Plasma keine Konzentrationsveränderung zu beiden Beobachtungszeitpunkten (Abb. 18 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> rechtes Panel).

Im Lebergewebe des Peritonitismodells fällt nach 6h die Lanosterolkonzentration signifikant auf  $2,3\mu\text{mol/l}$  im Vergleich zur sham-Gruppe ( $3,8\mu\text{mol/l}$ ).

Nach 24h liegt eine deutliche Streuung der Messwerte vor, welche im Median allerdings keine Veränderungen zeigt.

Im Blutplasma ist erst nach 24h ein Effekt zu beobachten: die Konzentration von Lanosterol steigt signifikant auf  $4,2\mu\text{mol/l}$  in der PCI-Gruppe im Vergleich zur sham-Gruppe mit  $0,6\mu\text{mol/l}$  (Abb. 18 B).

### Lanosterol

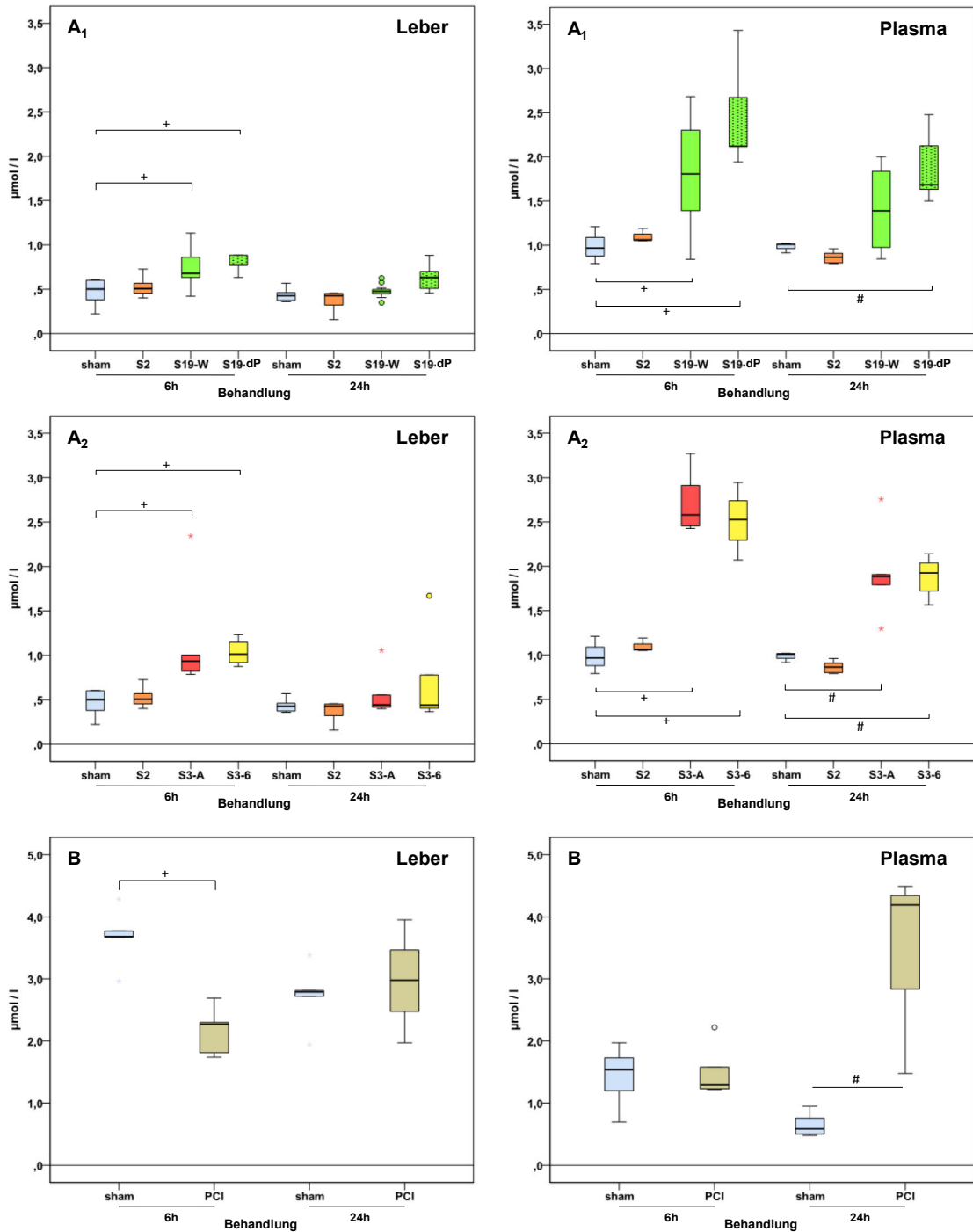


Abb. 18: Lanosterolspiegel in Pneumonie (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) - und Peritonitismodell (B)

Beobachtungszeitpunkte 6h/24h; Beschriftung und Farbcode siehe Abschnitt 4.3

### 4.3.2 Desmosterol

In den Lebergewebeproben des Pneumoniemodells nach 6h ist, ausgehend vom Wert der sham-Gruppe bei  $1,1\mu\text{mol/l}$ , für S19-W ein signifikanter Anstieg der Desmosterolkonzentration auf  $1,5\mu\text{mol/l}$  zu verzeichnen. Die Konzentration der pneumolysindefizienten Form steigt mit einem größeren IQR nicht signifikant auf  $1,9\mu\text{mol/l}$ . Außerdem zeigt Serotyp 3 Konzentrationsanstiege: S3-A steigt auf  $2,0$  und S3-6 steigt signifikant auf  $2,7\mu\text{mol/l}$ . Nach 24h sind bei allen Serotypen geringere Konzentrationsanstiege zu vermerken, S19-dP bleibt allerdings im Vergleich zu 6h auf gleich hohem Niveau (Abb. 19 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> linkes Panel).

Im Plasma sind, ausgehend von einer Konzentration von  $0,8\mu\text{mol/l}$  der sham-Gruppe, nach 6h signifikante Anstiege auf  $1,4\mu\text{mol/l}$  für S19-W und  $1,2\mu\text{mol/l}$  für S19-dP zu erkennen. Noch ausgeprägtere Konzentrationsanstiege werden für S3-A auf  $1,6\mu\text{mol/l}$  und S3-6 auf  $2,1\mu\text{mol/l}$  gemessen. Auch im Plasma sind nach 24h die Konzentrationsveränderungen weniger stark ausgeprägt als nach 6h (Abb. 19 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> rechtes Panel). Für Serotyp 2 ist sowohl im Lebergewebe, als auch im Plasma keine Veränderung der Desmosterolkonzentration bei beiden Beobachtungszeitpunkten zu verzeichnen.

Im Lebergewebe des PCI-Modells verändert sich die Konzentration nach 6h im Vergleich zur sham-Gruppe nicht. Zum Beobachtungszeitpunkt 24h ist ein Anstieg der PCI-Gruppen-Messwerte auf  $9,7\mu\text{mol/l}$  im Vergleich zu sham bei  $0,8\mu\text{mol/l}$  zu verzeichnen, allerdings sind in diese Gruppe methodenbedingt nur drei Messwerte mit sehr starker Streuung eingegangen. Im Plasma ist ein Anstieg der Desmosterolkonzentration zu verzeichnen: Nach 6h steigt die Konzentration signifikant von  $3,1\mu\text{mol/l}$  (sham) auf  $4,4\mu\text{mol/l}$  (PCI) und nach 24h noch ausgeprägter von  $2,0\mu\text{mol/l}$  (sham) auf  $7,3\mu\text{mol/l}$ . Dabei ist in der PCI-Gruppe nach 24h eine verstärkte Streuung der Messwerte zu beobachten (Abb. 19 B).

### Desmosterol

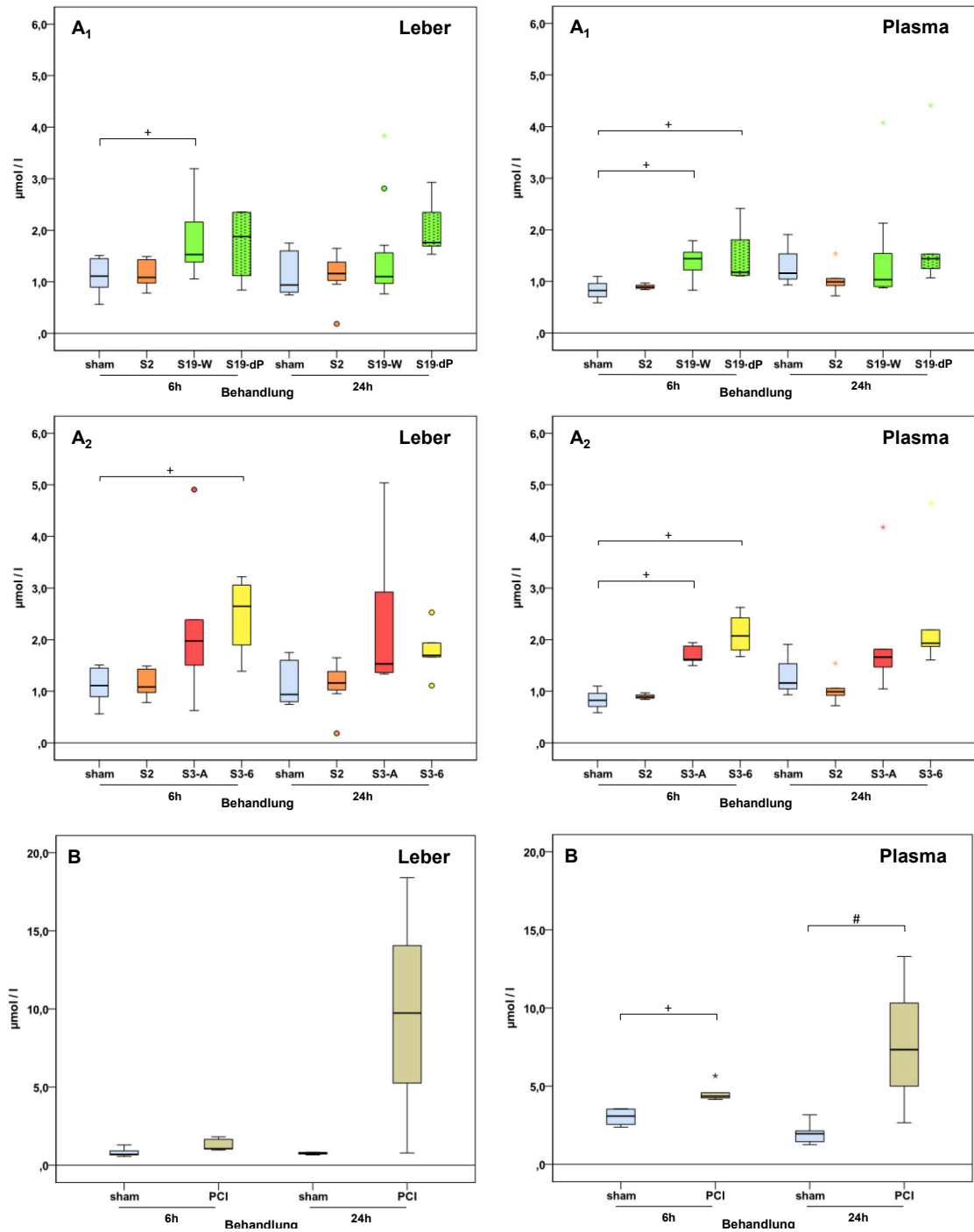


Abb. 19: Desmosterolspiegel in Pneumonie (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) - und Peritonitismodell (B)

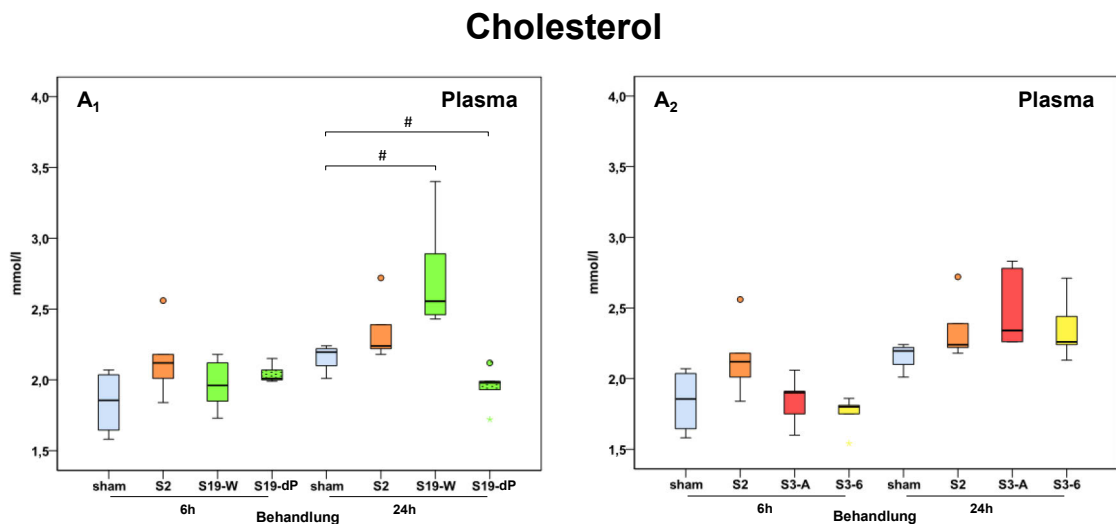
Beobachtungszeitpunkte 6h/24h; Beschriftung und Farbcode siehe Abschnitt 4.3

### 4.3.3 Cholesterol

Im Plasma der Versuchstiere wurden zum Zeitpunkt 6h leichte Anstiege der Cholesterolkonzentrationen bei den Behandlungsgruppen S2, S19-W, S19-dP und S3-A gemessen. Die Konzentration bei S3-6 fällt außerdem leicht unter das Niveau der sham-Gruppe. Die beschriebenen Veränderungen sind im Bereich von max. 0,2 mmol/l, ausgehend von der Konzentration der sham-Gruppe bei 1,9mmol/l, zu verzeichnen (Abb. 20 A<sub>1</sub>)

Zum Beobachtungszeitpunkt 24h zeigt S19-W, im Vergleich zur sham-Gruppe (2,2mmol/l), einen signifikanten Anstieg auf 2,6mmol/l mit stärkerer Streuung der Messwerte. Für die pneumolysindefiziente Form ist jedoch ein signifikanter Abfall auf 2,0mmol/l zu vermerken. Die Konzentrationsveränderungen von S2, S3-A und S3-6 sind nur marginal, wobei S3-6 nach 24h in der Tendenz einen Anstieg der Konzentration zeigt.

Ein sham-Effekt ist zu beobachten: Die Cholesterolkonzentration der sham-Gruppe steigt zum Beobachtungszeitpunkt 24h um 0,3mmol/l im Vergleich zu 6h an (Abb. 20 A<sub>2</sub>).



**Abb. 20: Cholesterolspiegel im Pneumoniemodell (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>)**

Beobachtungszeitpunkte 6h/24h; Beschriftung und Farbcode siehe Abschnitt 4.3



## 5 Diskussion

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten zeigen erregerspezifische- und fokusspezifische Unterschiede im Transkriptom und Metabolom der Cholesterolsynthese (siehe Abb. 22 und Abb. 21).

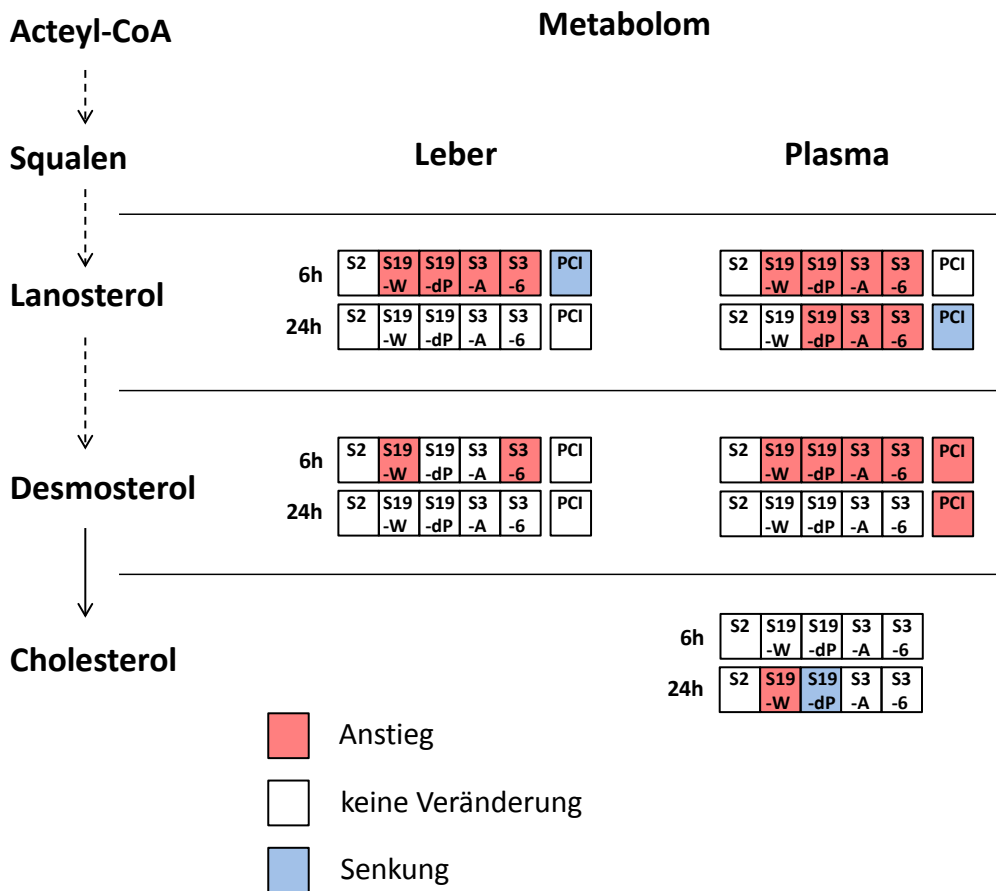
Für das Pneumoniemodell ist eine konzertierte Hochregulation der Cholesterolsynthese für die Serotypen S19-W, S19-dP, S3-A und S3-6 im Transkriptom und Metabolom zu beobachten, welche sich in der Ausprägung der Veränderung Serotyp-spezifisch unterscheidet (Abb. 22). Dabei ist für Serotyp 19 die Pneumolysin-defiziente Form (S19-dP) meist stärker reguliert als der Wildtyp (S19-W) und für Serotyp 3 ist die Regulation des hochvirulenten Stammes (S3-A) stärker ausgeprägt als die des niedrigvirulenteren Stammes (S3-6).

Im Gegensatz dazu zeigt der hochvirulente Serotyp 2 fast keine Veränderungen der Syntheseleistung auf Transkriptom- und Metabolomebene. Auffällig sind außerdem die Veränderungen der Expressionsraten des Transkriptes für Mevalonatdecarboxylase (*Mvd*), die wesentlich stärker ausfallen, als beim Schlüsselenzym (*Hmgcr*). Farnesyldiphosphat-synthetase zeigt keine Regulation der Transkription für die untersuchten Behandlungsgruppen.

Für die Plasmacholesterolemessungen zeigt sich ausschließlich für Serotyp 19 nach 24h eine Regulation (Abb. 21). Dabei verzeichnet eine Behandlung mit dem Wildtyp einen Anstieg und der Pneumolysin-defiziente Stamm dagegen zeigt eine Senkung der Cholesterolkonzentration.

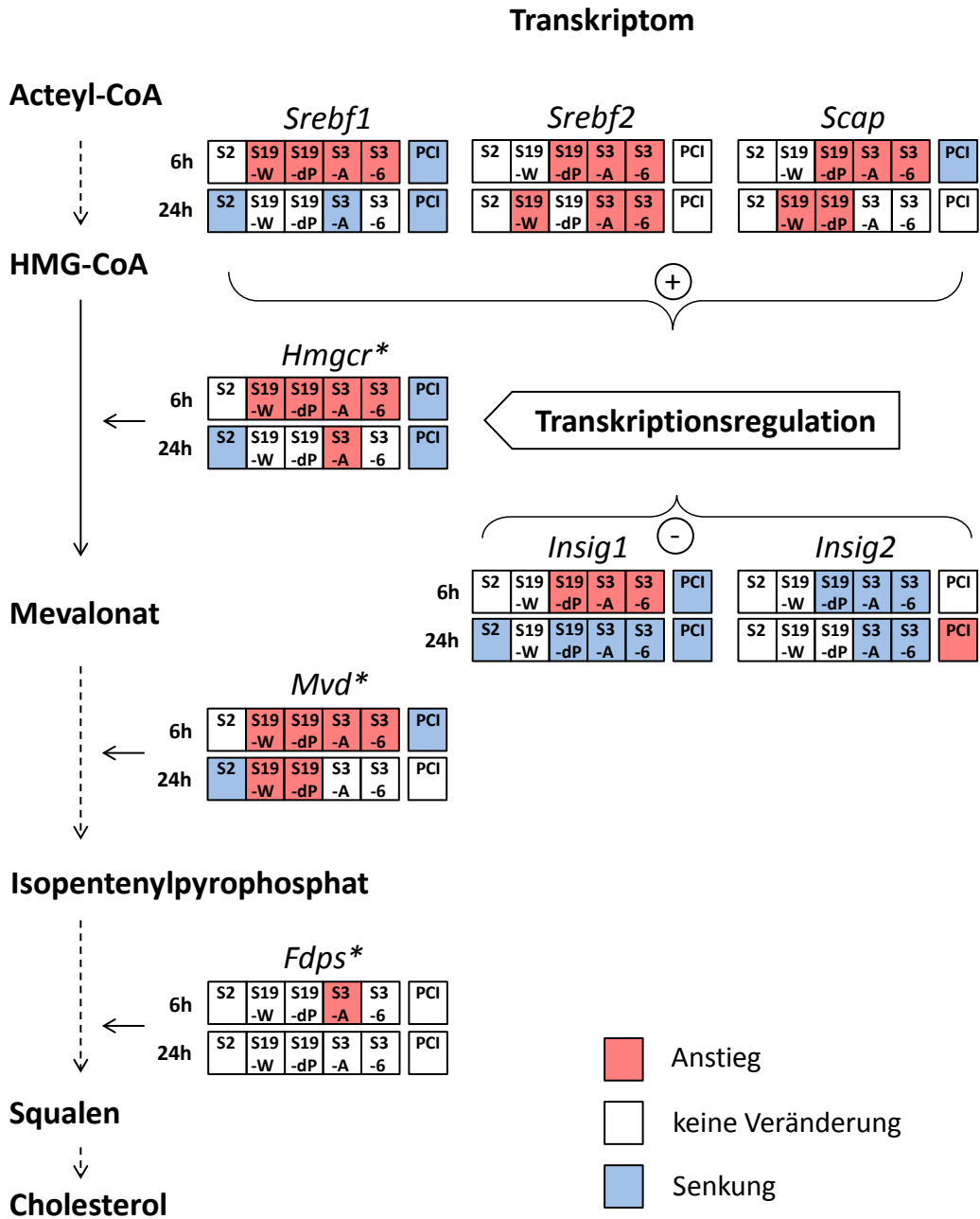
Die Datenlage im Peritonitismodell impliziert im Gegensatz zum Pneumoniemodell eine konzertierte Herunterregulation der Cholesterolsynthese im Transkriptom (Abb. 22). Die Effekte im Metabolom sind allerdings weniger einheitlich: beide Beobachtungszeitpunkte zeigen sowohl Konzentrationssteigerungen als auch -Senkungen für Lanosterol und Desmosterol (Abb. 21).

In beiden Modellen zeigt das Transkriptom der Faktoren der Regulationskaskade für Hmgcr eine synchronisierte Reaktion in Richtung der Hoch- bzw. Herunterregulation des Transkripts *Hmgcr*. Die Transkription von *Insig1* ist dabei einer komplexeren Kinetik mit gegensätzlichen Regulationen zum frühen und zum späten Beobachtungszeitpunkt unterworfen (Abb. 22). Zudem sind die gemessenen Effekte im Transkriptom und Metabolom generell zum früheren Beobachtungszeitpunkt (6h) deutlicher ausgeprägt als zum späteren Beobachtungszeitpunkt (24h).



**Abb. 21: Übersicht der Ergebnisse der Metabolomanalyse für Pneumonie- und Peritonitismodell**

In dieser vereinfachten Darstellung sind die Qualitäten der signifikanten Veränderungen für die verwendeten Infektionsgruppen mit Hilfe eines Farbcodes dargestellt.



**Abb. 22: Übersicht der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für Pneumonie- und Peritonitismodell**

In dieser vereinfachten Darstellung sind die Qualitäten der signifikanten Veränderungen für die verwendeten Infektionsgruppen mit Hilfe eines Farbcodes dargestellt.

\*...diese Transkripte kodieren Enzyme des Syntheseweges

Modelle sind beschränkte Abbilder der Wirklichkeit (Stachowiak 1973). Gleiches gilt auch für die verwendeten murinen Sepsismodelle um die Abläufe der Erkrankung im humanen Organismus zu simulieren. In Abhängigkeit von der zu untersuchenden Fragestellung wurden daher die am besten geeigneten Tiermodelle ausgewählt, welche sich beide durch genaue Dosierungs- und Standardisierungsmöglichkeiten in der Applikation auszeichneten (Deitch 2005).

Das verwendete Pneumoniemodell der intratrachealen Pneumokokkenapplikation ist ein etabliertes murines Infektionsmodell, welches in der Lage ist eine konsistente und reproduzierbare Multiorgandysfunktion hervorzurufen (Bergeron et al. 1998, Andonegui et al. 2009). Die Gabe von Pneumokokkenreinkulturen birgt dabei den Vorteil, dass die beobachteten Effekte besser auf den verwendeten Erregerserotyp zurückgeführt werden können und somit Aussagen über die serotypenspezifische Wirtsantwort möglich sind. Allerdings kann die Rolle von opportunistischen Erregern, wie sie im klinischen Alltag bei Pneumonien vorkommen können, in diesem Modell nicht beurteilt werden.

Für die polymikrobielle Peritonitis wurde das PCI-Modell gewählt (Bauhofer et al. 2002). Dieses Modell weist durch die Verwendung einer gemischt Gram-positiven und Gram-negativen Faecessuspension eine größere Nähe zu klinischen Fragestellungen auf als andere Modelle, weil die Verwendung standardisierter humaner Stuhlproben dabei sicher stellt, dass die Erregervielfalt dieser polymikrobiellen Infektion der sekundären Peritonitis von Patienten weitestgehend entspricht (Stamme et al. 1999). Diese Ähnlichkeit zum klinischen Geschehen verhindert allerdings die Differenzierung der Wirtsantwort auf spezifische Peritonitiserreger. Für dieses Modell sollte die Differenzierung aber nicht Gegenstand der vorgelegten Untersuchung sein, sondern vielmehr der fokusspezifische Aspekt im Vergleich zur Pneumonie.

Die immer wieder beobachteten Differenzen zwischen Tiermodell und

klinischer Realität haben dabei verschiedene Ursachen (Esmon 2004). Das Maß an hoher Standardisierung, welches wichtig ist um weitere Einflussgrößen in Behandlungsgruppen gering zu halten, spiegelt kaum die Verhältnisse von septisch kranken Patienten wider. Während in dieser Studie junge, weibliche, primär gesunde Organismen zum Einsatz kamen, gehört ein Großteil der Patienten zum älteren Bevölkerungsanteil und weist oft eine multimorbide Vorerkrankungsgeschichte auf (Poli-de-Figueiredo et al. 2008). Außerdem wurde den behandelten Tieren keine supportive antibiotische Therapie verabreicht, um eine besondere Schwere der Sepsis zu generieren. Septische ITS Patienten hingegen erfahren in der Regel eine evidenz-basierte intensive antibiotische Therapie. Trotz der aufgezeigten Differenzen stellen Tiermodelle in der Sepsisforschung den Grundstein für die Übertragung von Erkenntnissen der Grundlagenforschung in klinische Zusammenhänge dar (Dyson und Singer 2009).

### **Cholesterolsynthese-spezifische Muster der Wirtsantwort**

Die anfangs dargestellten Ergebnisse entsprachen mit einigen Auffälligkeiten dem in der Einleitung vorgestellten Konzept des Zusammenspiels der Transkripte der Cholesterolsynthese.

So wies im Pneumoniemodell das unspezifischere Transkript *Sreb1*, welches neben der Cholesterolsynthese auch die Fettsäuresynthese anregt, eine stärkere Transkriptionssteigerung auf, als das Cholesterolspezifische *Sreb2* (Horton et al. 2002). Dieses Ergebnis weist auf eine gleichzeitig induzierte Fettsäuresynthese im Pneumoniemodell hin. Laut Studienlage ist eine Anpassung des Lipidmetabolismus bei Sepsis zu verzeichnen, dessen Relevanz für das Outcome von Patienten allerdings noch kontrovers diskutiert wird (Larsson-Backstrom et al. 1990). Beobachtungen einer häufigen Assoziation von Hypcholesterolämie mit niedrigen Triglyceridspiegeln (Chiarla et al. 2010) stehen Korrelationen von Hypcholesterolämie mit Hypertriglyceridämie bei Sepsis mit infauster

Prognose entgegen (Giovannini et al. 2005). Eine gesteigerte Fettsäuresynthese könnte hier bedingt sein durch einen erhöhten Verbrauch an Lipiden bei hochregulierten Zellmembranreparaturprozessen im septischen Geschehen.

Außerdem waren Besonderheiten im Transkriptom von *Insig1* und *Insig2* auffällig. Entgegen der allgemeinen Tendenz ist für *Insig1* eine Steigerung der Expressionsrate nach den ersten 6h zu beobachten. Dieser Effekt ist wahrscheinlich bedingt durch die Abhängigkeit der *Insig1* mRNA Bildung von der Anwesenheit des aktiven Transkriptionsfaktors SREBP im Zellkern (Mohn et al. 1991). Um die Transkription von *Hmgcr* zu beeinflussen ist die Bindung von *Insig1* an Scap essentiell. In diesem Falle wird das neugebildete *Insig1* innerhalb von 30 min degradieren, da die Cholesterolspiegel für die benötigte Konformationsänderung von Scap nicht ausreichen und *Insig1* somit nicht an Scap binden kann (Mohn et al. 1991). Nach 24h wird davon ausgegangen, dass die benötigte SREBP Konzentration im Zellkern nicht mehr genügt um die *Insig1* Transkription zu induzieren. Die Folge ist eine Hemmung der Transkriptionsaktivität. Das Zusammenspiel der beschriebenen Faktoren resultiert schließlich in einer deutlichen Transkriptionssteigerung von *Hmgcr*, welches das Schlüsselenzym dieses Syntheseweges HMG-CoA-Reduktase kodiert.

Das Transkript des nachgeschalteten Enzyms Mevalonatdecarboxylase (*Mvd*) zeigt für die Pneumokokkeninfektionen eine wesentlich stärker ausgeprägte Hochregulation der Transkriptionsaktivität als das HMG-CoA-Reduktase Transkript *Hmgcr*. Da bisher genauere Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation von *Mvd* fehlen und allein eine Studie von Tanaka auf eine längerfristige Regulation des Enzyms auf mRNA-Ebene in Rattenlebern hinweist (Tanaka et al. 1990), erbringt diese Arbeit den ersten Nachweis, dass *Mvd* bei Pneumokokkenpneumonie im murinen Modell einer wesentlichen transkriptionellen Regulation unterworfen ist.

Neuere Untersuchungen stellen außerdem einen wichtigen

Zusammenhang zwischen dem Stoffwechsel des Pathogens und des Wirtes her. Die Mevalonatdecarboxylase des Pathogens *S. pneumoniae* wird vom Cholesterolsyntheseintermediat 5-Diphosphomevalonat (DPM) allosterisch gehemmt (Andreassi et al. 2004). Dieses Intermediat entsteht auch in eukaryotischen Zellen im Rahmen der Cholesterolbildung, ist dort allerdings nicht in der Lage die körpereigene Mevalonatdecarboxylase zu hemmen (Andreassi et al. 2004). Über diese Verknüpfung ließe sich eine Induktion der Transkription von *Mvd* und nachfolgender Enzyme als Bestandteil der adaptiven Wirtsreaktion bei Pneumokokkensepsis erklären. Durch die Hochregulation des Syntheseweges würde die gebildete Menge der Intermediate Mevalonat und DPM gesteigert. Da für Mevalonat und seine Analoga ein Aufnahmemechanismus in das Pathogen nachgewiesen wurde (Wilding et al. 2000), könnte es durch weitere Verstoffwechslung zu DPM zu einer Hemmung des pathogeneigenen Mevalonatstoffwechsels führen. Für das im Wirt gebildete DPM ist ein Übertreten in das Pathogen allerdings unwahrscheinlich durch die hohe negative Ladung (4-), die eine Permeation der Zellmembran verhindert (Kudoh et al. 2010). Ohne einen funktionierenden Mevalonatstoffwechsel wäre damit die Virulenz von *S.pneumoniae* stark vermindert und das Pathogen wäre nicht im Stande in der murinen Lunge zu überleben (Andreassi et al. 2004). Dieser Erklärungsansatz hängt allerdings stark davon ab, ob die Konzentration an Mevalonat im Wirtsplasma ausreicht, um in ausreichender Menge in den Erreger zu gelangen und dort zu einer Hemmung zu führen. Unabhängig von seiner möglicherweise bedeutenden Rolle in der physiologischen adaptiven Wirtsantwort, wird der Ansatz der Mevalonatstoffwechselhemmung durch DPM in der Forschung zur Entwicklung neuer antibiotischer Therapien für *S.pneumoniae* Infektionen weiter verfolgt (Andreassi et al. 2007, Kudoh et al. 2010, Reuther et al. 2011).

Da für das Transkript des Enzyms Farnesyldiphosphat-Synthase (*Fdps*) für alle Untersuchungsgruppen keine nennenswerte Regulation

nachgewiesen wurde, sind Einflüsse unterschiedlicher Infektionsfoki und Erregerspektren auf die transkriptionelle Regulation dieses Enzyms in den verwendeten Modellen auszuschließen. Auffällig ist dabei, dass die laut Studienlage von SREBP abhängige *Fdps* Genexpression, trotz signifikanter Expressionsänderungen der *Srebf1* und *Srebf2* Transkripte, in dieser Untersuchung unreguliert bleibt (Ishimoto et al. 2010). Möglicherweise spielt dabei eine geringere Bindungsaffinität von SREBP an die Promotorregion des *Fdps*-Genes im Vergleich zum *Hmgcr*-Gen eine Rolle und löst bei geringeren Konzentrationen vor allem eine Transkriptionssteigerung von *Hmgcr* aus. Diese Hypothese ließe sich durch die Analyse von SREBP Konzentrationen mittels immunhistochemischer Methoden überprüfen.

Die Hochregulation der Cholesterolsynthese stellt möglicherweise eine generelle adaptive Reaktion des Wirtes auf extrazellulären Stress dar. Auslöser dieser Reaktion können dabei Stressoren unterschiedlicher Natur sein, wie Hypoxie durch Minderperfusion und erhöhten Sauerstoffbedarf oder oxidativer Stress durch eine hochregulierte Immunabwehr. Robichon et al. untersuchten die Transkription von SREBP Zielgenen unter Sauerstoffmangelbedingungen in Hefen und unter hohen Temperaturen in Säugtierzellen. In beiden Fällen war eine Hochregulation des Sterolbiosyntheseweges zu verzeichnen. Die Autoren schlussfolgern daraus sogar, dass SREBP Sauerstoffsensoren besitzt und mit Hitzeschockproteinen interagiert um die Cholesterolsynthese zu induzieren (Robichon und Dugail 2007). Dieser Mechanismus könnte daher eine Begründung für die gesteigerte Biosynthese im Pneumoniemodell sein. Möglicherweise führt die schwere Lungenentzündung bei dieser Sepsisform über einen gestörten Gasaustausch zur Hypoxie und schließlich zu Zellschäden (Dyke und Brown 1994). SREBP könnte über den oben beschriebenen Mechanismus die Cholesterolsynthese induzieren und damit zur Reparatur der beschädigten Zellmembranen beitragen.



Da in dieser Arbeit differenzierte Regulationen der Cholesterolsynthese zwischen den beiden untersuchten Modellen gezeigt wurden, werden erregerspezifische Mechanismen für die Anpassung der Syntheseleistung vermutet.

Pneumolysin als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *S.pneumoniae* ist ein Cholesterol-abhängiges Cytolysin (Gilbert 2010). Dessen Wirkung im Wirtsorganismus wird damit direkt durch das Vorhandensein bzw. die Neubildung von Cholesterol im Wirt beeinflusst. Untersuchungen von Weber et al. weisen darauf hin, dass erhöhte Plasmacholesterolspiegel im Mausmodell die zytolytische Aktivität von Pneumolysin stören kann. Dabei führte eine Präinkubation von Pneumolysin mit Plasma hypercholesterolemischer Mäuse zu einer Verminderung von PLY-induzierten Lungenbarrierendysfunktionen und von Alveolarmakrophagennekrosen (Weber et al. 2012).

In dieser Arbeit wurde der Effekt eines Pneumolysin-defizienten Stammes auf die Transkriptomik und Metabolomik der hepatischen Cholesterolsynthese der Maus systematisch untersucht (Weber et al. 2012). Diese mittels IDM (insertion duplication mutagenesis) generierten Stämme haben eine wesentlich verringerte Virulenz im Vergleich zu ihrem Wildtyp und weisen damit eine verminderte Wahrscheinlichkeit der Sepsisentstehung im Wirt auf (Harvey et al. 2011). Der Effekt der hier untersuchten Pneumolysin-defizienten Form von Serotyp 19 zeigte sich im hepatischen Transkriptom als eine Hochregulation der Cholesterolsynthese, welche den Effekt des Pneumolysin-produzierenden Wildtypes deutlich übersteigt. Da de facto alle untersuchten Serotypen außer der defizienten Form Pneumolysin bilden (Kalin 1998) und für alle Serotypen eine Hochregulation bzw. keine angepasste Regulation für Serotyp 2 nachgewiesen wurde, scheint die Regulation der Cholesterolsynthese auf Transkriptomebene unabhängig vom Pneumolysingehalt des Erregers zu stattzufinden. Bei Vorhandensein einer spezifischen Immunantwort auf PLY wäre im Falle des

Pneumolysin-defizienten Stammes eine unregulierte Transkription zu erwarten gewesen. Die Hypothese, dass die Hypercholesterolämie eine transkriptionelle adaptive Wirtsreaktion auf die Pneumolysine von *S. pneumoniae* darstellt, ist durch die Ergebnisse der vorgelegten Untersuchung widerlegt. Es lässt sich aber vermuten, dass Pneumolysin in der Lage ist über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Cholesterolsynthese des Wirtsorganismus zu stören, um eine Cholesterol-bedingte Inaktivierung zu verhindern und die Abwehrbereitschaft des Wirtsimmunsystems zu senken.

Das Spektrum an Regulationen auf der Seite der Metabolite ist hingegen weniger einheitlich: während sich die deutliche Hochregulation der Cholesterolsynthese im Transkriptom für Lanosterol und Desmosterol bestätigt, ist dagegen zum späten Beobachtungszeitpunkt für Cholesterol ein Konzentrationsanstieg für den Wildtyp und ein Konzentrationsabfall für die Pneumolysin-defiziente Form von Serotyp 19 zu beobachten. Für den PLY-defizienten Stamm liegt also eine starke Differenz zwischen Transkriptionsaktivität und Konzentration des Endproduktes Cholesterol vor. Diese Unterschiede könnten am plausibelsten durch einen verstärkten Verbrauch an Cholesterol im Rahmen der Immunabwehr gegen den Pneumolysin-defizienten Stamm bedingt sein. Da diesem Serotyp ein wesentlicher Virulenzfaktor fehlt und die Pneumolysin-bedingte Störung der Wirtsabwehr nicht wirken kann, wäre die effektivere Immunantwort mit einem hohen Bedarf an Cholesterol für Zellteilung und Reparaturprozesse eine mögliche Ursache für den beobachteten Konzentrationsabfall (Vyroubal et al. 2008). Unabhängig davon wurde PLY als PAMP für das angeborene Immunsystem identifiziert und löst im Wirtsorganismus über die Interaktion mit TLR-4 die Bildung der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 aus, welche eine große Rolle in der Vermittlung der Pneumokokken-spezifischen Immunantwort spielen (Dinarello 2009).

Die Einflüsse von Cholesterol auf die Funktion von PLY sind dabei

Gegenstand mehrerer Studien: So beobachteten Nollmann et al. in vitro und in vivo (Mausmodell) die Störung der Bildung der zytolytischen Poren durch Gabe von freiem Cholesterol (Nollmann et al. 2004) und Marquart et al. wiesen bei Pneumokokkenkeratitis im Kaninchenmodell eine signifikant bessere Heilung der Cornea-Läsionen nach lokaler Applikation von Cholesterol in das Auge nach (Marquart et al. 2007). Außerdem reichen schon geringe Mengen an freiem Cholesterol aus, um die hämolytische Aktivität von PLY zu neutralisieren (Weber et al. 2012). Dabei ist nur Cholesterol im Gegensatz zu anderen cholesterolähnlichen Sterolen in der Lage die PLY Funktion zu inhibieren (Nollmann et al. 2004). Diese Studien implizieren, dass hohe Plasmacholesterollevel im Wirtsorganismus eine endogene Neutralisationsstrategie dieses PAMPs darstellen könnten, die über die Interaktion mit TLR-4 vermittelt wird. Zur Klärung dieses Zusammenhangs sind weitere Untersuchungen über die Bindungsaffinitäten von PLY und TLR-4 mit hohen und niedrigen Plasmacholesterolspiegeln z.B. mit Hilfe eines Rezeptorbindungsassays nötig. Außerdem könnten Untersuchungen der TLR-4-Antwort speziell im Pneumokokkeninfektionsmodell abgeschlossen werden.

Die porenbildende Aktivität Pneumolysins hat für *S.pneumoniae* somit möglicherweise eine bivalente Rolle inne: zum einen ermöglicht es dem Bakterium Wirtszellen und Gewebe zu beschädigen und Immunabwehrmechanismen zu umgehen und zum anderen stimuliert es selbst die angeborene Immunabwehr (Witzenrath et al. 2011).

Weitere Studien zeigten außerdem, dass Pneumolysin in seiner porenformenden Aktivität einer deutlichen Variation unterworfen ist, so dass bei einigen Serotypen ein nicht-hämolytisches PLY nachgewiesen werden konnte, außerdem ist die porenformende Aktivität deutlich von der produzierten Pneumolysinmenge abhängig (Jefferies et al. 2007). Trotz dieser Funktionseinschränkung waren Serotypen mit nicht-hämolytischen PLY zu einer Krankheitsprogression in der Lunge fähig (Kirkham et al. 2006).

Serotyp 2 und Serotyp 19 zeigten in vorherigen Untersuchungen vergleichbare Pneumolysinkonzentrationen mit gleicher hämolytischer Aktivität (Weber et al. 2012). Trotz dieser Gleichschaltung bezüglich des Virulenzfaktors PLY sind die Regulationen dieser beiden Serotypen im Transkriptom signifikant verschieden. Dieses Ergebnis unterstreicht damit die Bedeutung weiterer Virulenzfaktoren in der Krankheitsprogression einer Pneumokokkenpneumonie.

Zudem sind bereits Serotypen-spezifische Unterschiede in der Ätiologie von Pneumokokkeninfektionen nachgewiesen worden: So verursachte eine Infektion mit niedrigvirulentem Serotyp 19, im Gegensatz zum hochvirulenten Serotyp 2 im murinen Modell eine deutliche Permeabilitätssteigerung im Lungengewebe (Henken et al. 2010). Durch diesen Mechanismus könnte, im Rahmen der Cholesterolsyntheseinduktion gebildetes, Plasmacholesterol besser in das Alveolarkompartiment eindringen und dort die zytolytische Funktion von PLY stören (Maus et al. 2004, Weber et al. 2012). Dieser Zusammenhang liefert damit ein Beispiel einer adaptiven Wirtsreaktion auf Pneumokokken, die die Disseminierung des Pathogenes von der Lobärpneumonie zur Sepsis effektiv verhindert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit in Zusammenschau mit den beschriebenen Studien weisen darauf hin, dass es sich bei der Hochregulation der Cholesterolsynthese um eine erregerspezifische adaptive Wirtsantwort auf eine Infektion mit *S.pneumoniae* handelt. Das Ausbleiben der Synthesesteigerung für den hochvirulenten Serotyp 2 scheint dabei die erste serotypenspezifische Beschreibung einer maladaptiven Wirtsantwort im Pneumoniemodell zu sein. Zur genaueren Untersuchung dieser vermuteten Maladaptation wäre für folgende Studien die Einbeziehung einer Pneumolysin-defizienten Form dieses Serotypes in Cholesteroltranskriptomuntersuchungen sinnvoll. Es lässt sich des Weiteren schließen, dass viele der protektiven Effekte einer Hypercholesterolemie im Mausmodell über die cholesterolvermittelte Inhibition des Virulenzfaktors Pneumolysin

ermöglicht werden. Die Induktion der Genexpression der Cholesterolsynthese liegt im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die diese für Pneumokokkenpneumonien auf Enzymebene nachweisen konnten (Guckian 1973, Canonico et al. 1977). Die hier vorgelegte Studie schließt allerdings PLY als einen Auslöser der Steigerung der Cholesterolsynthese auf Transkriptomebene aus. Damit ist dieses Ergebnis von den Aussagen der aktuellen Veröffentlichung von Weber et al. abzugrenzen, da sich ein Ausbleiben der Cholesterolsyntheseinduktion auf Transkriptomebene für den PLY defizienten Stamm von S19 nicht nachweisen ließ (Weber et al. 2012). In diesem Zusammenhang könnte eine starke posttranskriptionelle Modifikation eine Rolle spielen, welche in Folge zu den zum Teil differierenden Ergebnissen der Metabolomuntersuchungen dieses Stammes führen könnten.

Es wird vermutet, dass weniger ein einziger Virulenzfaktor, sondern vielmehr das Zusammenwirken mehrerer pathogener Eigenschaften von *S. pneumoniae* in der Summe zu einer adaptiven Steigerung der Cholesterolsynthese des Wirtes führt. Aktuelle Studien weisen zudem darauf hin, dass neben weiteren Virulenzfaktoren dabei auch die Kapselpolysaccharide von Pneumokokken eine kritische Rolle spielen (Hyams et al. 2010, Lysenko et al. 2010). Diese Arbeit liefert damit Ergebnisse die im Trend von Hinweisen einer Serotypen-spezifischen Immunantwort bei Pneumokokkeninfektionen liegen (Seyoum et al. 2011).

Für die Beurteilung fokus- und erregerspezifischer Unterschiede in der Regulation der Cholesterolsynthese wurden gleiche Untersuchungen im Modell einer polymikrobiellen Peritonitis durchgeführt. Im Transkriptom ist dabei eine konzertierte Herunterregulation der Cholesterolsynthese zu beobachten. Im Metabolom hingegen stehen Senkungen der Konzentration von Lanosterol, Konzentrationsanstiegen von Desmosterol gegenüber. Im Gegensatz zum Pneumoniemodell wurden hier

gemischt Gram-positive, Gram-negative Erregersuspensionen verwendet, die somit kein definiertes Spektrum an Virulenzfaktoren aufweisen, um die Umstände einer sekundären polymikrobiellen Peritonitis besser wiederzugeben.

In diesem Zusammenhang ist die Studienlage uneinheitlich. Einerseits wies eine Studie von Memon et al. nach dass sich die Serumcholesterolspiegel und die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase nach LPS Gabe im Tiermodell erhöhen (Memon et al. 1993). LPS ist ein Endotoxin Gram-negativer Bakterien, die den größten Anteil der in dieser Arbeit verwendeten Erreger der Faecessuspension ausmachen. Dabei ist das Lipoprotein HDL in der Lage LPS an seiner Oberfläche zu binden und erleichtert so den Transport des Endotoxins zur Leber, wo die Detoxifikation stattfinden kann (Levine et al. 1993, Read et al. 1993). Andererseits aber verhält sich der Plasmacholesterolspiegel als negatives Akute-Phase Reagenz (Chiarla et al. 2010) und fällt bei Sepsis, nach Operationen und Verletzungen, bei Leberdysfunktion und nach akuten Hämorrhagien ab. Hauptmechanismen dieser Senkung sind neben der Störung der Cholesterolsynthese cholesterolsenkende Effekte inflammatorischer Mediatoren, wie IL-6 und IL-10, und Hämodilution durch Blutverlust (Wilson et al. 2003, Bonville et al. 2004). Bei polymikrobieller Peritonitis liegt der Infektionsfokus näher am Syntheseorgan Leber und somit wäre eine Störung der Cholesterolsynthese durch direkte Parenchymschädigung möglich. Zudem könnte diese durch Infektion ausgelöste Leberdysfunktion zu einer Cholestase führen, welche über einen negativen Feedbackmechanismus der Gallensäuren zu einer Hemmung der Cholesterolsynthese führt (Feingold et al. 1995). Diese Mechanismen könnten in einer nachfolgenden Studie durch Einbeziehung von Lebersynthese- und Cholestaseparametern, wie Cholinesterase,  $\gamma$ -GT und Glutamatdehydrogenase genauer untersucht werden.

Es sollte weiterhin berücksichtigt werden, dass die Cholesterolsynthese

einer vom endokrinen System abhängigen Regulation unterworfen ist. Das Schlüsselenzym HMG-CoA-Reduktase wird für eine schnelle Anpassung an den Cholesterolbedarf durch Interkonvertierung reguliert. So wird es bei ATP-Mangel durch die AMP abhängige Kinase phosphoryliert und damit inaktiviert. Dieser Prozess läuft im Hungerzustand unter Glukagoneinfluss zur Einsparung von Energieäquivalenten (ATP) ab. Insulin und Schilddrüsenhormone hingegen induzieren die Desphosphorylierung d.h. die Aktivierung der HMG-CoA-Reduktase (Wiss 1977). Außerdem wurde eine negative Feedbackregulation nicht nur für das Schlüsselenzym nachgewiesen, sondern unter anderem auch für die Mevalonatdecarboxylase (Dorsey und Porter 1968, Hinson et al. 1997). Da die Tiere in der vorgelegten Untersuchung freien Zugang zu Standardtiernahrung hatten, ist von einem geringeren Einfluss einer Glukagon-induzierten Deaktivierung des Schlüsselenzyms auszugehen. Allerdings könnte über die Nahrung zugeführtes exogenes Cholesterol eine Hemmung der endogenen Synthese der Versuchstiere zur Folge gehabt haben. Zum Ausschluss dieser Einflussgröße ist für folgende Studien die Erstellung eines Fastenregimes empfehlenswert. Als weitere Einflussgrößen für die beobachteten Differenzen zwischen Transkriptom und Metabolom könnten die zirkadiane Rhythmik der Cholesterolbildung mit einem Gipfel der Syntheseleistung zwischen 02:00 und 04:00 und der geringe Anteil der Cholesterolbiosynthese, der im distalen Teil des Dünndarms stattfindet, gezählt werden.

Das Spektrum an unterschiedlichen Erregerklassen in dieser Untersuchung verursacht möglicherweise eine Überschneidung erregerspezifischer Wirtsreaktionen und führt durch einen Summationseffekt letztlich zur Hemmung der Cholesterolbiosynthese. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Relevanz des Infektionsfokus und des Erregerspektrums für die adaptive Wirtsantwort auf Cholesterolbiosynthesesebene, da diese sich zwischen Pneumonie- und Peritonitismodell wesentlich unterscheidet. Die vorgelegten Ergebnisse legen außerdem nahe, dass die für das

Pneumoniemodell vermutete protektive Rolle einer Hypercholesterolämie in der adaptiven Wirtsreaktion im Peritonitismodell keine größere Rolle spielt. Da in einigen Fällen in dieser Arbeit deutliche Unterschiede zwischen Transkriptomik und Metabolomik auffällig waren. Würde sich in weiteren Studien eine Untersuchung der verwendeten Transkripte auf Proteomebene anbieten. Dabei könnten die Einflüsse posttranskriptioneller und posttranslationaler Modifikation durch Immunhistochemie und Enzymaktivitätsuntersuchungen genauer analysiert werden und somit eine vollständige Kette vom Transkriptom über das Proteom zum Metabolom liefern.

### **Bedeutung der Charakteristik der Wirtsreaktion für den Einschluss von Patienten in klinische Studien**

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit sollten in klinischen Studien auf Relevanz der Ergebnisse im humanen Organismus überprüft werden. Dabei müssten insbesondere die Cholesterolspiegel engmaschig untersucht werden, um eine Veränderung der Krankheitsprogression rechtzeitig zu erkennen. Belegt durch experimentelle Daten sollten Grenzwerte insbesondere für die septischen Foki Pneumonie und Peritonitis festgelegt werden. Bei einem Abfall der Cholesterolspiegel unter diese Grenzwerte könnte dann die Wirkung der Cholesterolmangelsituation durch Gabe parenteraler cholesterolreicher Substrate abgemildert werden und somit möglicherweise das Outcome der Patienten verbessert werden. Dabei sind negative Effekte einer über den septischen Krankheitsverlauf bestehenden Hypercholesterolämie durch ihre vor allem langfristige arteriosklerotische Wirkung als eher gering einzuschätzen (Kaunitz 1988).

In diesem Zusammenhang ist die Verwendung von Statinen bei septischen Patienten zur Verbesserung des Outcomes umstritten. Diese wirken primär als HMG-CoA-Reduktase Hemmer. Durch intrazellulären Cholesterolmangel kommt es zu vermehrter Cholesterolaufnahme in die Zellen und dadurch zu einer Verringerung des zirkulierenden



Plasmacholesterols in Form von LDL. Einige Studien beobachteten retrospektiv und in Metanalysen eine protektive Rolle von Statinen vor Mortalität bei schweren Infektionen und Sepsis (Almog et al. 2004, Mortensen et al. 2005, Janda et al. 2010, Rothberg et al. 2012). Andere Studien hingegen kamen zu dem Schluss, dass die Statintherapie keine positiven Effekte auf das primäre und sekundäre Outcome für Patienten mit Sepsis habe (Liappis et al. 2001, Yende et al. 2011, Somma und Weinstock 2011, Goodin et al. 2011). Dabei wird ein Großteil der Wirkungen in allen aufgezeigten Studien nicht der Senkung der Cholesterolspiegel zugeschrieben, sondern der großen Bandbreite an antiinflammatorischen Effekten dieser Medikamentenklasse (Liao 2002). Diese Wirkungen betreffen die Funktion von Leukozyten, Monozyten und T-Zellen sowie die Freisetzung inflammatorischer Zytokine und Akute Phase Proteine (Rosenson et al. 1999, Diomedede et al. 2001, Yoshida et al. 2001, Kleemann et al. 2004). Außerdem wurden antioxidative Wirkungen beschrieben sowie direkte antikoagulatorische Effekte und eine positive Auswirkung auf die Endothelfunktion (Laufs et al. 1997, Huhle et al. 1999, Rikitake et al. 2001, Wassmann et al. 2002). In weiteren klinischen Studien wird sich zeigen müssen, ob bereits mit Statinen behandelte Patienten bei schweren Infektionen weiterhin mit Statinen behandelt werden sollten und ob Hochrisikopatienten für die Entwicklung einer schweren Sepsis während der Phase der stärksten Gefährdung eine supportive Statintherapie erhalten sollen (Terblanche et al. 2006). Dabei sollte für das intensivpflichtige Patientengut eine Abwägung des Nutzens gegen das Nebenwirkungsprofil dieser Medikamente, mit seltener Leber- und Nierenschädigung sowie Rhabdomyolyse erfolgen. Damit stehen sich zwei Therapieoptionen im septischen Kontext gegenüber: Die Erreger-spezifische Unterstützung der Wirtsantwort durch Cholesterolgabe einerseits und die Statintherapie mit protektiven pleiotropen Effekten aber einer Cholesterolspiegelsenkung andererseits. Diese Konzepte müssen sich dabei nicht zwangsläufig widersprechen:

Weitere Studien werden zeigen müssen, ob eine geringe Statindosis die immunmodulatorischen Effekte vielleicht sogar nutzen kann, ohne die Cholesterolspiegel zu stark zu senken.

### **Cholesterolspiegel als theragnostisches Mittel**

Das Phänomen der Hypocholesterolämie in Assoziation mit schwerer Infektion und Sepsis ist in vielen klinischen Studien beschrieben (Iribarren et al. 1998, Wilson et al. 2003, Dunham und Chirichella 2011). Allerdings wurden diese Schlüsse meist durch große retrospektive Ansätze ohne Differenzierung in der Ätiologie des septischen Krankheitsbildes erhoben. In diesen rein deskriptiven Studien wurde Hypocholesterolämie oft als negativer Prädiktor für die weitere Krankheitsprogression identifiziert. Dabei gibt es leider bisher keine klinischen Daten, die die Auswirkungen eines erhöhten Cholesterolspiegels bei Sepsis auf das Outcome von Patienten beschreiben.

Für die weitere Untersuchung dieser Zusammenhänge müsste die Erstellung von prospektiven Studien weiter forciert werden. So konnten Dunham et al. in einer prospektiven Untersuchung bei einer sehr kleinen Patientengruppe von 28 ITS Patienten die negativen Auswirkungen von geringen Cholesterolspiegeln auf die Prognose bereits bestätigen (Dunham et al. 2003). Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit implizieren, dass in zukünftigen Studien eine systematische Differenzierung der Sepsis nach Infektionsfokus und beteiligten Erregern vorgenommen werden sollte. Für jede dieser Patientengruppen sollten Syntheseparameter der Cholesterolsynthese sowie der Cholesterolspiegel erhoben werden, um dann valide Aussagen über die Zusammenhänge zwischen septischen Fokus, Cholesterolspiegel und damit assoziiertem Outcome treffen zu können. Abhängig von diesen Ergebnissen wäre daraufhin eine Erprobung der Gabe von cholesterolreicher parenteraler Ernährung für septische ITS-Patienten sinnvoll.

## 6 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit weisen eine adaptive Wirtsreaktion der Leber auf Ebene der Cholesterolsynthese in Abhängigkeit vom Infektionsfokus und dessen Erregerspektrum bei Sepsis nach. Transkriptom und Metabolom der Cholesterolsynthese zeigen dabei für das Pneumonie- und das Peritonitismodell unterschiedliche erregerspezifische Muster.

Die konzertierte Hochregulation der Cholesterolsynthese für die *S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie scheint eine erregerspezifische adaptive Wirtsantwort auf eine Infektion mit spezifischen Pneumokokkenserotypen zu sein. Die Erhöhung des Cholesterolspiegels wirkt sich dabei möglicherweise positiv auf die Effektivität der Abwehrreaktion des Wirtes aus, indem die zytolytische Funktion des Virulenzfaktors Pneumolysin gestört wird.

Diese Arbeit belegt, dass Pneumolysin, trotz in Frage kommender Mechanismen, nicht der Auslöser einer gesteigerten Cholesterolsynthese bei Pneumokokkensepsis sein kann, da der Pneumolysin-defiziente Stamm eine stärkere Hochregulation zeigte, als Pneumolysin enthaltende Wildtypen. Es wird daher vermutet, dass die Synthesesteigerung durch das Zusammenwirken anderer pathogener Eigenschaften von *S. pneumoniae*, wie den Kapselpolysacchariden, getriggert wird. Die ausbleibende Steigerung der Cholesterolsynthese für den hochvirulenten Serotyp 2 wird zudem als eine maladaptive Wirtsantwort gewertet, die zu besonders schwerer Krankheitsprogression führt.

Die Herunterregulation der Cholesterolsynthese für den zweiten untersuchten Infektionsfokus Peritonitis, weist auf andere ablaufende Prozesse im Rahmen der adaptiven Wirtsreaktion hin, welche auch im klinischen Kontext berücksichtigt werden sollten.

Die vorgelegte weiterführende Untersuchung von tierexperimentellem Material zeigt wichtige Zusammenhänge der Pathogen-Host Interaktion bei Sepsis unterschiedlicher Genese. Dabei sollte die Differenz der Ergebnisse allein zwischen den beiden häufigsten septischen Foki Anlass geben für zukünftige klinische Studien nicht nur die Schwere des septischen Krankheitsbildes, sondern auch beteiligte Erreger und deren Eintrittsort in den Organismus stärker berücksichtigen, um die wirkenden Prozesse der adaptiven Wirtsreaktion in der Entwicklung der Sepsistherapie besser zu verstehen. So implizieren die Ergebnisse dieser Untersuchung, dass septische Patienten mit Pneumokokkenpneumonie möglicherweise von einer Cholesterolgabe profitieren könnten.

Im komplexen Feld der pathogenetischen Zusammenhänge von Sepsis liefert diese Arbeit zudem einen Nachweis, dass Cholesterolspiegel nicht nur in retrospektiven Studien, sondern auch in präklinischen experimentellen Untersuchungen in Mausmodellen deutlichen Regulationen unterworfen sind, die Auswirkungen auf das Überleben des Wirtsorganismus haben könnten.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Almog Y, Shefer A, Novack V, Maimon N, Barski L, Eizinger M, Friger M, Zeller L, Danon A. 2004. Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis. *Circulation*, 110 (7):880-885.
- Andonegui G, Goring K, Liu D, McCafferty DM, Winston BW. 2009. Characterization of *S. pneumoniae* pneumonia-induced multiple organ dysfunction syndrome: an experimental mouse model of gram-positive sepsis. *Shock*, 31 (4):423-428.
- Andreassi JL, 2nd, Dabovic K, Leyh TS. 2004. Streptococcus pneumoniae isoprenoid biosynthesis is downregulated by diphosphomevalonate: an antimicrobial target. *Biochemistry*, 43 (51):16461-16466.
- Andreassi JL, 2nd, Bilder PW, Vetting MW, Roderick SL, Leyh TS. 2007. Crystal structure of the Streptococcus pneumoniae mevalonate kinase in complex with diphosphomevalonate. *Protein Sci*, 16 (5):983-989.
- Andrew PW, Mitchell TJ, Morgan PJ. 1997. Relationship of structure to function in pneumolysin. *Microb Drug Resist*, 3 (1):11-17.
- Antonny B, Madden D, Hamamoto S, Orci L, Schekman R. 2001. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol*, 3 (6):531-537.
- Arias I, Jacoby W, Popper H. 1988. *The Liver: Biology and Pathobiology*. New York: Raven Press, Second Edition
- Aridor M, Weissman J, Bannykh S, Nuoffer C, Balch WE. 1998. Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J Cell Biol*, 141 (1):61-70.
- Avigan J, Steinberg D. 1961. Studies of cholesterol biosynthesis. III. The desmosterol reductase system in liver. *J Biol Chem*, 236:2898-2900.
- Balachandran P, Hollingshead SK, Paton JC, Briles DE. 2001. The autolytic enzyme LytA of Streptococcus pneumoniae is not responsible for releasing pneumolysin. *J Bacteriol*, 183 (10):3108-3116.
- Bankey PE. 1992. Hepatic dysfunction in shock and organ failure. *Pathophysiology of Shock, Sepsis and Organ Failure* Berlin: Springer-Verlag:948-960.
- Baratta JL, Ngo A, Lopez B, Kasabwalla N, Longmuir KJ, Robertson RT. 2009. Cellular organization of normal mouse liver: a histological,

- quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochem Cell Biol*, 131 (6):713-726.
- Barlowe C. 2002. COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, 14 (4):417-422.
- Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol*, 59 (6):566-573.
- Bauhofer A, Stinner B, Kohler F, Reckzeh B, Lorenz W, Celik I. 2002. Granulocyte colony-stimulating factor but not peritoneal lavage increases survival rate after experimental abdominal contamination and infection. *Br J Surg*, 89 (11):1457-1464.
- Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers AM, Simard M, Olivier M, Bergeron MG. 1998. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun*, 66 (3):912-922.
- Blanco J, Muriel-Bombin A, Sagredo V, Taboada F, Gandia F, Tamayo L, Collado J, Garcia-Labattut A, Carriedo D, Valledor M, De Frutos M, Lopez MJ, Caballero A, Guerra J, Alvarez B, Mayo A, Villar J. 2008. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care*, 12 (6):R158.
- Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. 1989. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med*, 17 (5):389-393.
- Bonville DA, Parker TS, Levine DM, Gordon BR, Hydo LJ, Eachempati SR, Barie PS. 2004. The relationships of hypocholesterolemia to cytokine concentrations and mortality in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Surg Infect (Larchmt)*, 5 (1):39-49.
- Brook I. 2008. Microbiology and management of abdominal infections. *Dig Dis Sci*, 53 (10):2585-2591.
- Brown MS, Goldstein JL. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232 (4746):34-47.
- Brown MS, Goldstein JL. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89 (3):331-340.
- Brown MS, Goldstein JL. 1999. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (20):11041-11048.

- Calandra T, Cohen J. 2005. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med*, 33 (7):1538-1548.
- Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermiller B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR, Lee KY, Ma Y, Maqsoodi B, Papallo A, Peters EH, Poulter K, Ruppel PL, Samaha RR, Shi L, Yang W, Zhang L, Goodsaid FM. 2006. Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol*, 24 (9):1115-1122.
- Canonico PG, Ayala E, Rill WL, Little JS. 1977. Effects of pneumococcal infection on rat liver microsomal enzymes and lipogenesis by isolated hepatocytes. *Am J Clin Nutr*, 30 (8):1359-1363.
- Cerra FB. 1987. Hypermetabolism, organ failure, and metabolic support. *Surgery*, 101 (1):1-14.
- Cerra FB, Siegel JH, Border JR, Wiles J, McMenemy RR. 1979. The hepatic failure of sepsis: cellular versus substrate. *Surgery*, 86 (3):409-422.
- Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH. 2004. The relationship between plasma cholesterol, amino acids and acute phase proteins in sepsis. *Amino Acids*, 27 (1):97-100.
- Chiarla C, Giovannini I, Giuliante F, Zadak Z, Vellone M, Ardito F, Clemente G, Murazio M, Nuzzo G. 2010. Severe hypocholesterolemia in surgical patients, sepsis, and critical illness. *J Crit Care*, 25 (2):361 e367-361 e312.
- Deitch EA. 1992. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg*, 216 (2):117-134.
- Deitch EA. 2005. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock*, 24 Suppl 1:19-23.
- Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. 2001. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med*, 29 (7 Suppl):S42-47.
- Dinarello CA. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, 27:519-550.
- Diomedede L, Albani D, Sottocorno M, Donati MB, Bianchi M, Fruscella P, Salmona M. 2001. In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21 (8):1327-1332.
- Dorsey JK, Porter JW. 1968. The inhibition of mevalonic kinase by geranyl and farnesyl pyrophosphates. *J Biol Chem*, 243 (18):4667-4670.

- Dremsizov T, Clermont G, Kellum JA, Kalassian KG, Fine MJ, Angus DC. 2006. Severe sepsis in community-acquired pneumonia: when does it happen, and do systemic inflammatory response syndrome criteria help predict course? *Chest*, 129 (4):968-978.
- Dunham CM, Chirichella TJ. 2011. Attenuated hypocholesterolemia following severe trauma signals risk for late ventilator-associated pneumonia, ventilator dependency, and death: a retrospective study of consecutive patients. *Lipids Health Dis*, 10:42.
- Dunham CM, Fealk MH, Sever WE, 3rd. 2003. Following severe injury, hypocholesterolemia improves with convalescence but persists with organ failure or onset of infection. *Crit Care*, 7 (6):R145-153.
- Dyke T, Brown N. 1994. Hypoxia in childhood pneumonia: better detection and more oxygen needed in developing countries. *BMJ*, 308 (6921):119-120.
- Dyson A, Singer M. 2009. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med*, 37 (1 Suppl):S30-37.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33 (4):606-618.
- Esmon CT. 2004. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med*, 32 (5 Suppl):S219-222.
- Espenshade PJ, Cheng D, Goldstein JL, Brown MS. 1999. Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*, 274 (32):22795-22804.
- Evans HL, Raymond DP, Pelletier SJ, Crabtree TD, Pruett TL, Sawyer RG. 2001. Diagnosis of intra-abdominal infection in the critically ill patient. *Curr Opin Crit Care*, 7 (2):117-121.
- Ewig S, Torres A. 2002. Severe community-acquired pneumonia. *Curr Opin Crit Care*, 8 (5):453-460.
- Feingold KR, Pollock AS, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C. 1995. Discordant regulation of proteins of cholesterol metabolism during the acute phase response. *J Lipid Res*, 36 (7):1474-1482.
- Feldman C, Munro NC, Jeffery PK, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ, Guerreiro D, Rohde JA, Todd HC, Cole PJ, et al. 1991. Pneumolysin induces the salient histologic features of



- pneumococcal infection in the rat lung in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 5 (5):416-423.
- Fleige S, Pfaffl MW. 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*, 27 (2-3):126-139.
- Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP. 1998. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol*, 9 (1):67-78.
- Fraunberger P, Schaefer S, Werdan K, Walli AK, Seidel D. 1999. Reduction of circulating cholesterol and apolipoprotein levels during sepsis. *Clin Chem Lab Med*, 37 (3):357-362.
- Gil G, Faust JR, Chin DJ, Goldstein JL, Brown MS. 1985. Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell*, 41 (1):249-258.
- Gilbert RJ. 2010. Cholesterol-dependent cytolysins. *Adv Exp Med Biol*, 677:56-66.
- Gilsbach R, Kouta M, Bonisch H, Bruss M. 2006. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques*, 40 (2):173-177.
- Giovannini I, Chiarla C, Giuliante F, al. e. 2005. Hypocholesterolemia in surgical trauma, sepsis, other acute conditions and critical illness. MA Kramer (Ed), *Trends in cholesterol research*, Nova Science Publishers Inc, Hauppauge (NY):137-161.
- Goldstein JL, Brown MS. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343 (6257):425-430.
- Goldstein JL, Rawson RB, Brown MS. 2002. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch Biochem Biophys*, 397 (2):139-148.
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. 2006. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*, 124 (1):35-46.
- Gong Y, Lee JN, Lee PC, Goldstein JL, Brown MS, Ye J. 2006. Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metab*, 3 (1):15-24.
- Gonnert FA, Kunisch E, Gajda M, Lambeck S, Weber M, Claus RA, Bauer M, Kinne RW. 2012. Hepatic Fibrosis in A Long-Term Murine Model of Sepsis. *Shock*,
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Losche W, Claus RA, Bauer M. 2011. Characteristics of

- clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res*, 170 (1):e123-134.
- Goodin J, Manrique C, Dulohery M, Sampson J, Saettele M, Dabbagh O. 2011. Effect of statins on the clinical outcomes of patients with sepsis. *Anaesth Intensive Care*, 39 (6):1051-1055.
- Guckian JC. 1973. Role of metabolism in pathogenesis of bacteremia due to *Diplococcus pneumoniae* in rabbits. *J Infect Dis*, 127 (1):1-8.
- Gustot T. 2011. Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response. *Curr Opin Crit Care*, 17 (2):153-159.
- Harvey RM, Ogunniyi AD, Chen AY, Paton JC. 2011. Pneumolysin with low hemolytic activity confers an early growth advantage to *Streptococcus pneumoniae* in the blood. *Infect Immun*, 79 (10):4122-4130.
- Henken S, Bohling J, Martens-Lobenhoffer J, Paton JC, Ogunniyi AD, Briles DE, Salisbury VC, Wedekind D, Bode-Boger SM, Welsh T, Bange FC, Welte T, Maus UA. 2010. Efficacy profiles of daptomycin for treatment of invasive and noninvasive pulmonary infections with *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (2):707-717.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10 (4):413-417.
- Hinson DD, Chambliss KL, Toth MJ, Tanaka RD, Gibson KM. 1997. Post-translational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways. *J Lipid Res*, 38 (11):2216-2223.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109 (9):1125-1131.
- Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H. 1998. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest*, 101 (11):2331-2339.
- Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348 (2):138-150.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*, 6 (4):279-284.

- Huhle G, Abletshauser C, Mayer N, Weidinger G, Harenberg J, Heene DL. 1999. Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor. *Thromb Res*, 95 (5):229-234.
- Hyams C, Yuste J, Bax K, Camberlein E, Weiser JN, Brown JS. 2010. *Streptococcus pneumoniae* resistance to complement-mediated immunity is dependent on the capsular serotype. *Infect Immun*, 78 (2):716-725.
- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. 2005. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res*, 33 (6):e56.
- Iribarren C, Jacobs DR, Jr., Sidney S, Claxton AJ, Feingold KR. 1998. Cohort study of serum total cholesterol and in-hospital incidence of infectious diseases. *Epidemiol Infect*, 121 (2):335-347.
- Ishimoto K, Tachibana K, Hanano I, Yamasaki D, Nakamura H, Kawai M, Urano Y, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T. 2010. Sterol-regulatory-element-binding protein 2 and nuclear factor Y control human farnesyl diphosphate synthase expression and affect cell proliferation in hepatoblastoma cells. *Biochem J*, 429 (2):347-357.
- Janda S, Young A, Fitzgerald JM, Etminan M, Swiston J. 2010. The effect of statins on mortality from severe infections and sepsis: a systematic review and meta-analysis. *J Crit Care*, 25 (4):656 e657-622.
- Janeway CA, Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 1:1-13.
- Jedrzejewski MJ. 2001. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65 (2):187-207 ; first page, table of contents.
- Jefferies JM, Johnston CH, Kirkham LA, Cowan GJ, Ross KS, Smith A, Clarke SC, Brueggemann AB, George RC, Pichon B, Pluschke G, Pfluger V, Mitchell TJ. 2007. Presence of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks. *J Infect Dis*, 196 (6):936-944.
- Kalin M. 1998. Pneumococcal serotypes and their clinical relevance. *Thorax*, 53 (3):159-162.
- Kalin M, Kanclerski K, Granstrom M, Mollby R. 1987. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by enzyme-linked immunosorbent assay

- of antibodies to pneumococcal hemolysin (pneumolysin). *J Clin Microbiol*, 25 (2):226-229.
- Kaplan V, Angus DC, Griffin MF, Clermont G, Scott Watson R, Linde-Zwirble WT. 2002. Hospitalized community-acquired pneumonia in the elderly: age- and sex-related patterns of care and outcome in the United States. *Am J Respir Crit Care Med*, 165 (6):766-772.
- Katz S, Jimenez MA, Lehmkuhler WE, Grosfeld JL. 1991. Liver bacterial clearance following hepatic artery ligation and portacaval shunt. *J Surg Res*, 51 (3):267-270.
- Kaunitz H. 1988. Adaptive changes in aging and arteriosclerosis--role of cholesterol. *Mech Ageing Dev*, 44 (1):35-43.
- Kelly SJ, Jedrzejewski MJ. 2000. Structure and molecular mechanism of a functional form of pneumolysin: a cholesterol-dependent cytolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *J Struct Biol*, 132 (1):72-81.
- Kirkham LA, Jefferies JM, Kerr AR, Jing Y, Clarke SC, Smith A, Mitchell TJ. 2006. Identification of invasive serotype 1 pneumococcal isolates that express nonhemolytic pneumolysin. *J Clin Microbiol*, 44 (1):151-159.
- Kleemann R, Verschuren L, de Rooij BJ, Lindeman J, de Maat MM, Szalai AJ, Princen HM, Kooistra T. 2004. Evidence for anti-inflammatory activity of statins and PPARalpha activators in human C-reactive protein transgenic mice in vivo and in cultured human hepatocytes in vitro. *Blood*, 103 (11):4188-4194.
- Kmiec Z. 2001. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 161:III-XIII, 1-151.
- Koperna T, Schulz F. 1996. Prognosis and treatment of peritonitis. Do we need new scoring systems? *Arch Surg*, 131 (2):180-186.
- Kudoh T, Park CS, Lefurgy ST, Sun M, Michels T, Leyh TS, Silverman RB. 2010. Mevalonate analogues as substrates of enzymes in the isoprenoid biosynthetic pathway of *Streptococcus pneumoniae*. *Bioorg Med Chem*, 18 (3):1124-1134.
- Larsson-Backstrom C, Arrhenius E, Sagge K, Lindmark L, Paprocki J, Svensson L. 1990. Sequential changes in lipid metabolism and the fatty acid profile in liver lipids during fasting and sepsis. *Circ Shock*, 30 (4):331-347.
- Laufs U, Fata VL, Liao JK. 1997. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 272 (50):31725-31729.

- Lee JN, Ye J. 2004. Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1. *J Biol Chem*, 279 (43):45257-45265.
- Leroy O, Santre C, Beuscart C, Georges H, Guery B, Jacquier JM, Beaucaire G. 1995. A five-year study of severe community-acquired pneumonia with emphasis on prognosis in patients admitted to an intensive care unit. *Intensive Care Med*, 21 (1):24-31.
- Levine DM, Parker TS, Donnelly TM, Walsh A, Rubin AL. 1993. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (24):12040-12044.
- Liao JK. 2002. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol*, 86 (1):5-18.
- Liappis AP, Kan VL, Rochester CG, Simon GL. 2001. The effect of statins on mortality in patients with bacteremia. *Clin Infect Dis*, 33 (8):1352-1357.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4):402-408.
- Lock RA, Paton JC, Hansman D. 1988. Purification and immunological characterization of neuraminidase produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog*, 4 (1):33-43.
- Lorenz W, Reimund KP, Weitzel F, Celik I, Kurnatowski M, Schneider C, Mannheim W, Heiske A, Neumann K, Sitter H, et al. 1994. Granulocyte colony-stimulating factor prophylaxis before operation protects against lethal consequences of postoperative peritonitis. *Surgery*, 116 (5):925-934.
- Lysenko ES, Lijek RS, Brown SP, Weiser JN. 2010. Within-host competition drives selection for the capsule virulence determinant of *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Biol*, 20 (13):1222-1226.
- Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT. 2003. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (4):1966-1971.
- Marquart ME, Monds KS, McCormick CC, Dixon SN, Sanders ME, Reed JM, McDaniel LS, Caballero AR, O'Callaghan RJ. 2007. Cholesterol as treatment for pneumococcal keratitis: cholesterol-specific inhibition of pneumolysin in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48 (6):2661-2666.

- Marriott HM, Mitchell TJ, Dockrell DH. 2008. Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr Mol Med*, 8 (6):497-509.
- Marshall JC. 2004. Intra-abdominal infections. *Microbes Infect*, 6 (11):1015-1025.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348 (16):1546-1554.
- Matzinger P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 296 (5566):301-305.
- Maus UA, Srivastava M, Paton JC, Mack M, Everhart MB, Blackwell TS, Christman JW, Schlondorff D, Seeger W, Lohmeyer J. 2004. Pneumolysin-induced lung injury is independent of leukocyte trafficking into the alveolar space. *J Immunol*, 173 (2):1307-1312.
- McDaniel LS, Sheffield JS, Delucchi P, Briles DE. 1991. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect Immun*, 59 (1):222-228.
- McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, Hakenbeck R, Hryniewicz W, Lefevre JC, Tomasz A, Klugman KP. 2001. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol*, 39 (7):2565-2571.
- Memis D, Gursoy O, Tasdogan M, Sut N, Kurt I, Ture M, Karamanlioglu B. 2007. High C-reactive protein and low cholesterol levels are prognostic markers of survival in severe sepsis. *J Clin Anesth*, 19 (3):186-191.
- Memon RA, Grunfeld C, Moser AH, Feingold KR. 1993. Tumor necrosis factor mediates the effects of endotoxin on cholesterol and triglyceride metabolism in mice. *Endocrinology*, 132 (5):2246-2253.
- Mitchell AM. 2010. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect*, 16 (5):411-418.
- Miziorko HM. 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 505 (2):131-143.
- Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, Schneider H, Burchardi H. 2002. Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med*, 28 (10):1440-1446.

- Mohn KL, Melby AE, Tewari DS, Laz TM, Taub R. 1991. The gene encoding rat insulinlike growth factor-binding protein 1 is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Mol Cell Biol*, 11 (3):1393-1401.
- Moine P, Mazoit JX. 1999. Streptococcus pneumoniae pneumonia in mice: optimal amoxicillin dosing predicted from a pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *J Pharmacol Exp Ther*, 291 (3):1086-1092.
- Mortensen EM, Restrepo MI, Anzueto A, Pugh J. 2005. The effect of prior statin use on 30-day mortality for patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Respir Res*, 6:82.
- Nollmann M, Gilbert R, Mitchell T, Sferrazza M, Byron O. 2004. The role of cholesterol in the activity of pneumolysin, a bacterial protein toxin. *Biophys J*, 86 (5):3141-3151.
- Nuermberger E, Helke K, Bishai WR. 2005. Low-dose aerosol model of pneumococcal pneumonia in the mouse: utility for evaluation of antimicrobial efficacy. *Int J Antimicrob Agents*, 26 (6):497-503.
- Ortqvist A, Hedlund J, Kalin M. 2005. Streptococcus pneumoniae: epidemiology, risk factors, and clinical features. *Semin Respir Crit Care Med*, 26 (6):563-574.
- Paterson GK, Orihuela CJ. 2010. Pneumococci: immunology of the innate host response. *Respirology*, 15 (7):1057-1063.
- Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, Mitchell TJ. 1993. Molecular analysis of the pathogenicity of Streptococcus pneumoniae: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol*, 47:89-115.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. 2008. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*, 30 Suppl 1:53-59.
- Rayner CF, Jackson AD, Rutman A, Dewar A, Mitchell TJ, Andrew PW, Cole PJ, Wilson R. 1995. Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of Streptococcus pneumoniae with human respiratory mucosa. *Infect Immun*, 63 (2):442-447.
- Read TE, Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Calhoun MC, Kane JP, Rapp JH. 1993. Chylomicrons enhance endotoxin excretion in bile. *Infect Immun*, 61 (8):3496-3502.
- Reuther G, Harris R, Girvin M, Leyh TS. 2011. Backbone 1H, 13C, 15N NMR assignments of the unliganded and substrate ternary complex forms of mevalonate diphosphate decarboxylase from Streptococcus pneumoniae. *Biomol NMR Assign*, 5 (1):11-14.

- Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M. 2001. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 154 (1):87-96.
- Robichon C, Dugail I. 2007. De novo cholesterol synthesis at the crossroads of adaptive response to extracellular stress through SREBP. *Biochimie*, 89 (2):260-264.
- Rodriguez-Acebes S, de la Cueva P, Fernandez-Hernando C, Ferruelo AJ, Lasuncion MA, Rawson RB, Martinez-Botas J, Gomez-Coronado D. 2009. Desmosterol can replace cholesterol in sustaining cell proliferation and regulating the SREBP pathway in a sterol-Delta24-reductase-deficient cell line. *Biochem J*, 420 (2):305-315.
- Rosenson RS, Tangney CC, Casey LC. 1999. Inhibition of proinflammatory cytokine production by pravastatin. *Lancet*, 353 (9157):983-984.
- Rothberg MB, Bigelow C, Pekow PS, Lindenauer PK. 2012. Association between statins given in hospital and mortality in pneumonia patients. *J Gen Intern Med*, 27 (3):280-286.
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132:365-386.
- Rubins JB, Janoff EN. 1998. Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. *J Lab Clin Med*, 131 (1):21-27.
- Sakai J, Nohturfft A, Cheng D, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL. 1997. Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *J Biol Chem*, 272 (32):20213-20221.
- Sampson JS, O'Connor SP, Stinson AR, Tharpe JA, Russell H. 1994. Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus* sp. adhesins. *Infect Immun*, 62 (1):319-324.
- Sever N, Song BL, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, DeBose-Boyd RA. 2003. Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J Biol Chem*, 278 (52):52479-52490.
- Seyoum B, Yano M, Pirofski LA. 2011. The innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the lung depends on serotype and host response. *Vaccine*, 29 (45):8002-8011.
- Shields AM, Panayi GS, Corrigan VM. 2011. Resolution-associated molecular patterns (RAMP): RAMParts defending immunological homeostasis? *Clin Exp Immunol*, 165 (3):292-300.



- Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. 1997. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest*, 99 (5):846-854.
- Shouval DS, Greenberg D, Givon-Lavi N, Porat N, Dagan R. 2006. Site-specific disease potential of individual *Streptococcus pneumoniae* serotypes in pediatric invasive disease, acute otitis media and acute conjunctivitis. *Pediatr Infect Dis J*, 25 (7):602-607.
- Sieber MW, Guenther M, Kohl M, Witte OW, Claus RA, Frahm C. 2010. Inter-age variability of bona fide unvaried transcripts Normalization of quantitative PCR data in ischemic stroke. *Neurobiol Aging*, 31 (4):654-664.
- Skalnik DG, Narita H, Kent C, Simoni RD. 1988. The membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase confers endoplasmic reticulum localization and sterol-regulated degradation onto beta-galactosidase. *J Biol Chem*, 263 (14):6836-6841.
- Somma MM, Weinstock PJ. 2011. Statins and sepsis: a magic bullet or just shooting blanks? *Crit Care Med*, 39 (6):1567-1569.
- Song BL, Javitt NB, DeBose-Boyd RA. 2005. Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab*, 1 (3):179-189.
- Spapen H. 2008. Liver perfusion in sepsis, septic shock, and multiorgan failure. *Anat Rec (Hoboken)*, 291 (6):714-720.
- Srivastava A, Henneke P, Visintin A, Morse SC, Martin V, Watkins C, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT, Malley R. 2005. The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infect Immun*, 73 (10):6479-6487.
- Stachowiak H. 1973. Allgemeine Modelltheorie. 131-133.
- Stamme C, Bundschuh DS, Hartung T, Gebert U, Wollin L, Nusing R, Wendel A, Uhlig S. 1999. Temporal sequence of pulmonary and systemic inflammatory responses to graded polymicrobial peritonitis in mice. *Infect Immun*, 67 (11):5642-5650.
- Stark H. 2003. Medizinisch-chemische Aspekte von Statinen. *Pharmazie in unserer Zeit*, 6:465.
- Steinfurt C, Wilson R, Mitchell T, Feldman C, Rutman A, Todd H, Sykes D, Walker J, Saunders K, Andrew PW, et al. 1989. Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in vitro. *Infect Immun*, 57 (7):2006-2013.

- Sun LP, Li L, Goldstein JL, Brown MS. 2005. Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J Biol Chem*, 280 (28):26483-26490.
- Tanaka RD, Lee LY, Schafer BL, Kratunis VJ, Mohler WA, Robinson GW, Mosley ST. 1990. Molecular cloning of mevalonate kinase and regulation of its mRNA levels in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (8):2872-2876.
- Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Okano T, Yoshioka A, Shima M. 2008. Reference gene selection for real-time RT-PCR in regenerating mouse livers. *Biochem Biophys Res Commun*, 374 (1):106-110.
- Terblanche M, Almog Y, Rosenson RS, Smith TS, Hackam DG. 2006. Statins: panacea for sepsis? *Lancet Infect Dis*, 6 (4):242-248.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*, 75 (2-3):291-295.
- Ulevitch RJ, Johnston AR, Weinstein DB. 1979. New function for high density lipoproteins. Their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J Clin Invest*, 64 (5):1516-1524.
- van der Poll T, Opal SM. 2008. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*, 8 (1):32-43.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7):RESEARCH0034.
- Vermeulen J, De Preter K, Lefever S, Nuytens J, De Vloed F, Derveaux S, Hellemans J, Speleman F, Vandesompele J. 2011. Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*, 39 (9):e63.
- Vyroubal P, Chiarla C, Giovannini I, Hyspler R, Ticha A, Hrciarikova D, Zadak Z. 2008. Hypocholesterolemia in clinically serious conditions -review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 152 (2):181-189.
- Wang H, Ma S. 2008. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Emerg Med*, 26 (6):711-715.
- Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, Linz W, Bohm M, Nickenig G. 2002. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22 (2):300-305.
- Watson KC, Rose TP, Kerr EJ. 1972. Some factors influencing the effect of cholesterol on streptolysin O activity. *J Clin Pathol*, 25 (10):885-891.

- Weber M. 2009. Transkriptomik der Inflammation an der Maus: Die Lunge als Ausgangsorgan und als Zielorgan der Sepsis. univ. Dissertation Friedrich-Schiller-Universität Jena, V-VI.
- Weber M, Lambeck S, Ding N, Henken S, Kohl M, Deigner HP, Enot DP, Igwe EI, Frappart L, Kiehntopf M, Claus RA, Kamradt T, Weih D, Vodovotz Y, Briles DE, Ogunniyi AD, Paton JC, Maus UA, Bauer M. 2012. Hepatic induction of cholesterol biosynthesis reflects a remote adaptive response to pneumococcal pneumonia. *FASEB J*, 26(6): 2424-2436
- Wickel DJ, Cheadle WG, Mercer-Jones MA, Garrison RN. 1997. Poor outcome from peritonitis is caused by disease acuity and organ failure, not recurrent peritoneal infection. *Ann Surg*, 225 (6):744-753; discussion 753-746.
- Wilding EI, Brown JR, Bryant AP, Chalker AF, Holmes DJ, Ingraham KA, Iordanescu S, So CY, Rosenberg M, Gwynn MN. 2000. Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci. *J Bacteriol*, 182 (15):4319-4327.
- Wilson RF, Barletta JF, Tyburski JG. 2003. Hypocholesterolemia in sepsis and critically ill or injured patients. *Crit Care*, 7 (6):413-414.
- Wiss O. 1977. Influence of insulin and glucagon on the cholesterol synthesis in rat liver in vivo. Evidence against a rate limiting function of the HMG-coenzyme A reductase. *Helv Chim Acta*, 60 (6):1967-1968.
- Witzenrath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B. 2011. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol*, 187 (1):434-440.
- Yabe D, Brown MS, Goldstein JL. 2002. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (20):12753-12758.
- Yang T, Goldstein JL, Brown MS. 2000. Overexpression of membrane domain of SCAP prevents sterols from inhibiting SCAP/SREBP exit from endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 275 (38):29881-29886.
- Yeagle PL. 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, 822 (3-4):267-287.

- Yende S, Milbrandt EB, Kellum JA, Kong L, Delude RL, Weissfeld LA, Angus DC. 2011. Understanding the potential role of statins in pneumonia and sepsis. *Crit Care Med*, 39 (8):1871-1878.
- Yoshida M, Sawada T, Ishii H, Gerszten RE, Rosenzweig A, Gimbrone MA, Jr., Yasukochi Y, Numano F. 2001. Hmg-CoA reductase inhibitor modulates monocyte-endothelial cell interaction under physiological flow conditions in vitro: involvement of Rho GTPase-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21 (7):1165-1171.
- Zelenski NG, Rawson RB, Brown MS, Goldstein JL. 1999. Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*, 274 (31):21973-21980.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*, 32 (12):e103.

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Realisierung dieser Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. med. Michael Bauer und Herrn Prof. Dr. med. Konrad Reinhart für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die Möglichkeit parallel zum Studium eine experimentelle Promotion an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universitätsklinik Jena anfertigen zu können.

Dr. med. Martina Weber für die Einweisung in die Thematik, die zielführende Beratung und die Hilfe bei der Präparation des Gewebes.

PD Dr. rer. nat. habil. Ralf Claus für die exzellente Betreuung während des Schreibens der Promotionsarbeit und die vielen hilfreichen Anregungen.

Dipl.-Biol. Jana Lemm, Dipl.-Biol. Peter Recknagel und Markus Bläß für die Beantwortung der vielen Fragen eines laborunerfahrenen Studenten.

Dem Doktoranden Daniel Seibold für die sehr gute Zusammenarbeit und Absprache in der Erarbeitung der Methoden.

Edith Walther und Brigitte Specht für Einweisung in den Laboralltag und Hilfe in den vielen kleinen praktischen Dingen, insbesondere den Umzügen ins Tierhaus.

Dem Team des Infektionstierhauses am Forschungszentrum Beutenberg in Jena unter Leitung von Frau Dr. med. Carola Leipner für die Bereitstellung der Experimentierräume.

Herrn Dr. rer. nat. Mario Walther des IMSID Jena für die Unterstützung in der Erarbeitung der statistischen Auswertung.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

## 9 Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

**Name:** Alisch  
**Vorname:** Franz  
**Geburtsdatum:** 18.04.1988  
**Geburtsort:** Dresden, Deutschland  
**Familienstand:** ledig

**Adresse:** Siegfried-Czapski-Straße 2  
07745 Jena

**E-Mail-Adresse:** franz.alisch@gmx.net

### AUSBILDUNG

**1994-1998** 19. Grundschule in Dresden

**1998-2006** Gymnasium Dresden-Klotzsche  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

**08/2006-04/2007** Zivildienst: DRK Blutspendedienst Dresden

**ab WS/2007** Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena (momentan 10. Fachsemester)  
abgeschlossene Zwischenprüfung: 1. Staatsexamen  
angestrebter Abschluss: 2. Staatsexamen

## 10 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Michael Bauer beim Studiendesign, Dr. med. Martina Weber bei der Präparation des Gewebes und beim Studiendesign, PD Dr. rer. nat. med. habil. Ralf Claus bei der Ergebnispräsentation, Dr. rer. nat. Mario Walther bei der statistischen Datenauswertung,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 10.06.2012

Franz Alisch