

**CERAMIDREICHE MAKRODOMÄNEN UND
LEUKOZYTENTRANSMIGRATION IN DIE
LEBER BEI SEPSIS**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

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

von Philipp Urban

geboren am 10.06.1984 in Eisenach

Gutachter:

- 1. PD Dr. rer. nat. med. habil. Ralf Alexander Claus, Jena**
- 2. Prof. Dr. med. Andreas Stallmach, Jena**
- 3. Prof. Dr. med. Erich Gulbins, Essen**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.10.2011

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 CHEMOTAXIS UND TRANSENDOTHELIALE LEUKOZYTENMIGRATION	1
1.1.1 <i>Tethering und Rolling</i>	2
1.1.2 <i>Leukozytenaktivierung und Arrest</i>	3
1.1.3 <i>Intravascular Crawling und Transmigration</i>	3
1.2 DIE ROLLE DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN BEI SEPSIS	5
1.2.1 <i>Sepsis</i>	5
1.2.2 <i>Leberzellschädigung durch Granulozyten bei Sepsis</i>	7
1.3 SPHINGOLIPIDE	8
1.3.1 <i>Sphingomyelinasen und Makrodomänenbildung</i>	8
1.3.2 <i>Sphingolipide und Inflammation</i>	10
2 ZIELSETZUNG	12
3 METHODIK	13
3.1 KITS UND GERÄTE	13
3.1.1 <i>Kits</i>	13
3.1.2 <i>Geräte</i>	13
3.2 PRIMER FÜR DIE REAL-TIME-PCR	14
3.3 DATENBANKEN	15
3.4 MÄUSEVERSUCHE NACH DEM PCI-MODELL	15
3.5 PRÄPARATION DER HUMANEN FAECESUSPENSION	16
3.6 HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG DER LEBERPROBEN	17
3.6.1 <i>Fixierung</i>	17
3.6.2 <i>Paraffineinbettung</i>	17
3.6.3 <i>Esterasefärbung</i>	18
3.6.4 <i>Dokumentation der Leberschnitte</i>	18
3.7 KOMPARTIMENTSPEZIFISCHE BAKTERIENLAST	19
3.8 RNA-ISOLATION AUS DEN ZELLEN	20
3.8.1 <i>RNA-Isolation aus dem Lebergewebe</i>	20
3.8.2 <i>RNA-Isolation aus dem Blut</i>	20
3.9 SPEKTROPHOTOMETRIE	21
3.10 GELELEKTROPHORESE DER RNA	21
3.11 CDNA-SYNTHESE	23
3.12 PRIMERETABLIERUNG	24
3.13 QUANTITATIVE PCR	24
3.14 AUSWERTUNG DER QUANTITATIVEN PCR	26
3.14.1 <i>Schmelzkurvenanalyse</i>	26
3.14.2 <i>Normierung</i>	26
3.14.3 <i>Auswertung der PCR-Daten</i>	26
3.15 STATISTISCHE AUSWERTUNG UND GRAFISCHE DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE	27

4 ERGEBNISSE	28
4.1 DIE SAURE SPHINGOMYELINASE BEEINFLUSST DIE LEUKOZYTEN- TRANSMIGRATION IN DAS PARENCHYM DER LEBER	28
4.2 DIE KOMPARTIMENTSPEZIFISCHE BAKTERIENLAST NACH POLYMIKROBIELLER FAECESINJEKTION WIRD DURCH DIE SMASE BEEINFLUSST	29
4.3 DER EINFLUSS DER SAUREN SPHINGOMYELINASE AUF DIE EXPRESSION CHEMOTAXIS UND DIAPEDESE RELEVANTER GENE IN LEUKOZYTEN UND HEPATOZYTEN BEI SEPSIS	30
4.3.1 Die Genexpression der GTP-bindenden Proteine <i>Arl3</i> und <i>Arl5a</i> in Leukozyten und Hepatozyten wird durch die SMase beeinflusst	30
4.3.2 Die Genexpression von <i>Esm-1</i> in Leukozyten wird durch die SMase beeinflusst	33
4.3.3 Die Genexpressionen der chemotaktischen Zytokine <i>Cxcl2</i> und <i>Cxcl9</i> in Leukozyten werden durch die SMase beeinflusst	33
4.3.4 Die Genexpression der Protease <i>Lactotransferrin (Ltf)</i> in Leukozyten wird durch die SMase beeinflusst	36
4.3.5 Die Genexpression von <i>Ifrd1</i> in Leukozyten wird durch die SMase beeinflusst	37
4.3.6 Die Genexpression von <i>Rnd1</i> in Leukozyten und Hepatozyten wird durch die SMase beeinflusst	37
5 DISKUSSION	39
5.1 DIE SMASE UND IHR EINFLUSS AUF DIE LEUKOZYTENTRANSMIGRATION IN DAS LEBERPARENCHYM ALS IMMUNANTWORT BEI SEPSIS	41
5.2 DIE SMASE BEEINFLUSST DIE EXPRESSION DIVERSER GENE IN LEUKOZYTEN UND HEPATOZYTEN	44
5.2.1 Die SMase beeinflusst die Expressionen der Gene für die GTPasen <i>Arl3</i> und <i>Arl5a</i>	44
5.2.2 Die SMase als Immunomodulator des LFA-1/ICAM-1-Signalwegs via <i>Esm-1</i> -Genexpression	46
5.2.3 Die Wirkung der SMase auf die Expression der Gene für die Chemokine <i>Cxcl2</i> und <i>Cxcl9</i>	47
5.2.4 Die <i>Lactotransferrin</i> -Genexpression: der Beitrag der SMase zur Immunomodulation und Bakterieneradikation	49
5.2.5 Die SMase als Regulator der Effektorfunktionen von neutrophilen Granulozyten?	51
5.2.6 Signaltransduktionsvorgänge während der Zelltransmigration werden durch die SMase beeinflusst	52
5.3 METHODENKRITIK	54
6 SCHLUSSFOLGERUNGEN	57
7 LITERATURVERZEICHNIS	59
DANKSAGUNG	64
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	65

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTB	beta-Aktin
ADP	Adenosindiphosphat
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
Arl	<i>ADP-ribosylation factor-like</i>
bp	<i>base pair</i>
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary/komplementäre DNA</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
COX2	Cyclooxygenase-2
CNRQ	<i>calibrated normalized relative quantity</i>
Cxcl	CXC Chemokin-Ligand
d.h.	das heißt
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Esm-1	<i>endothelial cell-specific molecule 1</i>
fw	<i>forward</i>
GC	Guanin-Cytosin
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
Grb7	<i>growth factor receptor-bound protein 7</i>
GRO-beta	<i>growth regulated protein-beta</i>
GTP	Guanosintriphosphat
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN	Interferon
Ifrd1	<i>interferon-related developmental regulator 1</i>
IL	Interleukin
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
KG	Körpergewicht
LFA-1	Leukozyten-Funktions-assoziiertes Antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
Ltf	Lactotransferrin/Lactoferrin
Mac-1	<i>macrophage-1 antigen</i>
Mig	<i>monokine-induced by IFN-gamma</i>
µl	Mikroliter
min	Minute
MIP2-alpha	<i>macrophage inflammatory protein 2-alpha</i>
ml	Milliliter
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MOF	<i>multiple organ failure</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	<i>nuclear factor-kappaB</i>
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCI	<i>peritoneal contamination and infection</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PECAM-1	<i>platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1</i>
PMN	polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
qPCR	quantitative PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	reverse Transkriptase
rv	<i>reverse</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
sec	Sekunde
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SMase	Sphingomyelinase
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
u.a.	und anderen/ unter anderem
u.v.a.	und viele andere
V.	<i>Vena</i>
VCAM-1	<i>vascular cell-adhesion molecule 1</i>
VLA-4	<i>very late antigen 4</i>
VVO	Vesikulo-vakuoläre Organelle
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Hintergrund Die Sphingolipide fungieren neben ihrer vermeintlichen Hauptaufgabe als inerte Strukturkomponente in Zellmembranen auch als aktive Metabolite für zahlreiche Stoffwechselprozesse. Sie sind involviert in verschiedenen Zellprozessen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Inflammation. So spielen die Metabolite des Sphingolipidstoffwechsels, insbesondere das Ceramid, einschließlich des Schlüsselenzyms, der Sphingomyelinase (SMase), entscheidende Rollen bei generalisierten Inflammationsgeschehen (SIRS) sowie bei der Sepsis. Ceramidreiche Makrodomänen in Zellmembranen vermitteln und verstärken eine Vielzahl von Signalkaskaden, so auch zwischen immunkompetenten Zellen, welche die inflammatorischen Abläufe bestimmen. Die Einwanderung von Leukozyten in entzündliches Gewebe, allen voran der neutrophilen Granulozyten, ist ein kritischer Schritt der Immunantwort des Organismus (SIRS) gegen einen eingedrungenen Erreger und kann bei Dysregulation im gravierendsten Fall zum Multiorganversagen führen (*MOF*). Die transendotheliale Leukozytenmigration in das Parenchym der Organe umfasst viele Mediatoren und Signalkaskaden zwischen Neutrophilen, Endothel- und Parenchymzellen. Welche Rolle die SMase bei diesem Prozess spielt, ist bisher nicht bekannt.

Fragestellung Vor diesem Hintergrund sollte die Frage bearbeitet werden, in welchem Maße die SMase bzw. ihr Hydrolyseprodukt, das Ceramid, die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten am Beispiel der Leber beeinflusst. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob die SMase Einfluss auf die leukozytäre und hepatozytäre Expression von Genen für Transmigration und Chemotaxis relevante Proteine im Rahmen einer polymikrobiellen Infektion nimmt.

Methodik Zur Simulation einer polymikrobiell-induzierten systemischen Inflammation wurden Wildtyp- sowie SMase-defiziente Mäuse nach dem PCI-Modell einer intraperitonealen Faecesinjektion unterzogen. Sechs Stunden *post iniectionem* wurden die Lebern entnommen und der histologischen Aufarbeitung zugeführt. Nach Esterasefärbung wurden die transmigrierten, intraparenchymalen neutrophilen Granulozyten unter dem Mikroskop quantitativ ausgewertet.

Die Analyse der Genexpression wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR von muriner Leber- sowie leukozytärer cDNA durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion Die histologische Auswertung zeigte sechs Stunden nach PCI eine verstärkte transendotheliale Leukozytenmigration in die Leber der Wildtyp-Tiere verglichen mit den SMase-depletierten Tieren. Folglich ist zu vermuten, dass durch die SMase generiertes Ceramid durch die Bildung von speziellen ceramidreichen Membrandomänen die biophysikalischen Membraneigenschaften so zu modifizieren vermag, dass Signaltransduktionsvorgänge, welche die transendotheliale Migration vermitteln, amplifiziert werden. Außerdem scheint eine Ceramid-vermittelte Schädigung der Endothelzellbarriere sowie Ceramid-induzierte Parenchymzellapoptosen, welche chemotaktisch auf zirkulierende Neutrophile wirken, zu einer vermehrten Transmigration zu führen.

Die Betrachtung der Genexpression ergab insbesondere für den Vergleich der leukozytären Expressionen signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und SMase-defizienten Organismen. Hierbei nimmt die SMase Einfluss auf verschiedene Gene für Proteine der Leukozyten-Endothelzell-Adhäsion, Chemotaxis, Phagozytose und Transkription. Darüber hinaus schien die SMase-Defizienz eine erhöhte Bakterienlast in der Leber sowie eine verstärkte Bakteriämie zu bewirken.

Schlussfolgerung Die Ergebnisse dieser Arbeit gewähren erste Einblicke in die Beteiligung der SMase und des Ceramids an einem so kritischen Schritt der Pathogenese der Organdysfunktion bei Sepsis - der transendothelialen Migration von Entzündungszellen in parenchymatöse Organe. Durch die vorliegenden Ergebnisse könnten Impulse für weitere Untersuchungen gesetzt werden, um die Rolle der Sphingolipide bei Entzündungsprozessen näher zu beleuchten. Bei ausreichendem Verständnis dieser Beteiligung könnte es eines Tages Ziel sein, die SMase gezielt und selektiv pharmakologisch so zu beeinflussen, dass das Fortschreiten einer generalisierten Inflammationsreaktion und die Ausbildung einer Multiorgandysfunktion zumindest verzögert werden können.

1 Einleitung

1.1 Chemotaxis und transendotheliale Leukozytenmigration

Schädigende Reize (Noxen) stellen eine potentielle Gefahr für die morphologische sowie funktionelle Integrität unseres Organismus dar. Diese Noxen können physikalischer (mechanisch, thermisch, chemisch) und ischämischer Natur sein oder durch die zytopathischen Effekte eines Erregers hervorgerufen werden. Um potentielle Gewebedestruktionen zu vermeiden, muss das Abwehrsystem adäquat auf diese Noxen reagieren, was als Entzündung oder Inflammation bezeichnet wird. Physikalische Noxen verursachen eine Entzündung durch Mediatoren, die endogen aus dem geschädigten Gewebe freigesetzt werden (Koch und Funk 2001). Im Falle einer Infektion mit Erregern wird die Entzündungsreaktion über die Erkennung der Fremdantigene durch immunkompetente Zellen (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten u.a.) ausgelöst (Takeda und Akira 2007). Wie aber gelangen die Immunzellen zum Ort der Infektion? Wie treten (transmigrieren) sie aus dem Blutkreislauf in das betroffene Organ über? Welche Mechanismen spielen hierbei eine Rolle?

Die Transmigration von phagozytosefähigen Leukozyten, vorrangig der neutrophilen Granulozyten, aus dem Blutgefäß in das extrazelluläre Gewebe, dem Ort der Infektion bzw. Inflammation, stellt das Fundament einer erfolgreichen Antwort der angeborenen Immunabwehr gegen einen Erreger dar. Am Zielort können die Leukozyten durch ihre antimikrobiellen Effektorfunktionen wirksam gegen die eingedrungenen Pathogene vorgehen. Allerdings müssen die Leukozyten auf ihrem Weg durch den Blutkreislauf beachtliche Distanzen zurücklegen und begegnen hierbei verschiedenen Mikromilieus sowie chemotaktisch wirksamen Substanzen wie Chemokinen oder Bakterienprodukten (Wong et al. 2010). Diese aktive Bewegung der Leukozyten zum Ort der Inflammation wird als Chemotaxis bezeichnet. Sie ist gerichtet, d.h. die Leukozyten werden zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration dirigiert. Die Chemotaxis wird durch diverse Signale kontrolliert, welche eine Vielzahl komplexer Signaltransduktionskaskaden aktivieren. Diese führen zu einem dynamischen Umbau des leukozytären Zytoskeletts, d.h. Aktin-Polymerisierungen bilden Aktinfilamente, welche den Motor für die amoeboiden Bewegungen der Leukozyten mittels Pseudopodien (dynamische zytoplasmatische Membranausstülpungen) darstellen. Die Chemotaxis mündet schließlich in eine dirigierte Migration in das betroffene Gewebe.

Grundvoraussetzung für die Extravasation der Leukozyten ist eine feste Bindung der Leukozyten an die Gefäßwand, ein schrittweise ablaufender Prozess, der als Leukozytenadhäsionskaskade bezeichnet wird (Abb. 1). Sie wird realisiert durch verschiedene Zelladhäsionsmoleküle wie Selektine und Integrine sowie Aktivierungsfaktoren wie Zytokine oder Chemokine. Die klassischen drei Schritte dieser Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beinhalten das Selektin-vermittelte Entlangrollen der Leukozyten an der Gefäßwand (*rolling/primary adhesion*), ihre Aktivierung durch Chemokine oder Zellkontakt sowie ihre Integrin-abhängige feste Adhäsion am Endothel (*arrest*) (Butcher 1991). Jedoch ist dieses Modell bereits veraltet und wird durch zusätzliche Schritte ergänzt. Hinzu kommen das *tethering/capture* ("Einfangen" und Abbremsen der Leukozyten durch das Endothel), das *intravascular crawling* ("Entlangkriechen" an der Gefäßwand) sowie die para- und transzelluläre Migration (Ley et al. 2007).

1.1.1 *Tethering* und *Rolling*

Die Extravasation der Leukozyten findet hauptsächlich in den Kapillaren statt, im Fall der Leber in den Sinusoiden (Jaeschke und Hasegawa 2006). Während des initialen Leukozyten-Endothel-Kontakts, dem *tethering*, wird die erste Bindung ausgebildet. Als Folge des durch den Blutfluss erzeugten Scherstress, d.h. der Scherkraft (Verformungskraft), die pro Flächeneinheit Gefäßwand wirkt, werden die am Endothel haftenden Leukozyten abgeflacht, wodurch sich die Kontaktfläche zum Endothel vergrößert. Diese Verformung der Leukozyten unter Scherstromeinfluss stellt eine Hauptbedingung für das Entlangrollen am Endothel (*rolling*) dar. Sowohl das *tethering* als auch das *rolling* werden vermittelt durch Zelladhäsionsmoleküle, den Selektinen, und ihren entsprechenden Liganden. L-Selektin wird konstitutiv auf Leukozyten exprimiert, während E-Selektin und P-Selektin auf Endothelzellen im entzündeten Gewebe zu finden sind (Butcher 1991). Die Expression von E- und P-Selektin wird im Rahmen eines Entzündungsgeschehens vor allem durch proinflammatorische Zytokine wie TNF-alpha und Interleukin (IL)-1 sowie durch LPS (Lipopolysaccharide) der Bakterienmembranen verursacht (Springer 1994).

1.1.2 Leukozytenaktivierung und *Arrest*

Chemokine, d.h. **chemotaktisch** wirksame **Zytokine**, wie die CCL- oder CXCL-Chemokine, werden während eines inflammatorischen Geschehens von Zytokin-aktivierten Immun- und Gewebszellen produziert (Ley et al. 2007). Sie wirken über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und führen zur Aktivierung von Zelladhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Leukozyten, den Integrinen. Integrine binden Liganden der Immunglobulin-Superfamilie wie dem ICAM (Interzelluläres Adhäsionsmolekül)-1 oder VCAM (*vascular cell-adhesion molecule*)-1 auf Endothelzellen. Als wichtigstes Integrin der neutrophilen Granulozyten sei hier das beta-2-Integrin LFA-1 (Leukozyten-Funktions-assoziiertes Antigen-1) genannt, welches ICAM-1 bindet.

Bindet ein Chemokin an den GPCR der Leukozyten, kommt es zur Konformationsänderung des Integrins, wodurch sich die Bindungsaffinität für den Liganden erhöht (Arnaout et al. 2005). Die intrazelluläre Signalkaskade vom Chemokin-stimulierten GPCR zur Integrinaktivierung ist noch unzureichend erforscht. Allerdings scheinen kleine GTPasen der Ras-Superfamilie eine wichtige Rolle zu spielen. So konnten Laudanna et al. zeigen, dass das GTP-bindende Protein Rho ein entscheidendes Bindeglied zwischen den G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren und der Integrin-vermittelten Leukozytenadhäsion zu sein scheint (Laudanna et al. 1996).

Durch die Chemokin-getriggerte LFA-1/ICAM-1-Bindung kommt es zu einer Verlangsamung des *rolling*, was in einem Stillstand resultiert (*arrest*) und schließlich zu einer festen Adhäsion der Leukozyten am Endothel führt.

1.1.3 *Intravascular Crawling* und Transmigration

Allerdings transmigrieren Leukozyten nicht am Ort der initialen Adhäsion, da diese Endothelstelle nicht zwangsläufig die optimale Transmigrationsstelle darstellt (Schenkel et al. 2004, Phillipson et al. 2006). Vielmehr "kriechen" sie (daher *crawling*) zum Ort der tatsächlichen Transmigration, wiederum vermittelt durch beta-2-Integrine, dem Mac-1 (*macrophage-1 antigen*) auf Leukozyten und seinem Liganden, dem ICAM-1 auf Endothelzellen (Wong et al. 2010).

Die transendotheliale Migration der Leukozyten von der luminalen Gefäßwand in das betroffene Gewebe kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen; zum einen parazellulär zwischen benachbarten Endothelzellen (*junctional*) oder transzellulär, durch den

Endothelzellkörper hindurch (*nonjunctional*) (Woodfin et al. 2010).

Die Räume zwischen benachbarten Endothelzellen, genannt *junctions*, beinhalten ein komplexes System aus Protein-Protein-Interaktionen, welche die Barrierefunktion aufrechterhalten. Andererseits ermöglichen viele dieser Moleküle durch Proteinbindungen (Integrin-Interaktionen) oder homophile Wechselwirkungen die parazelluläre Passage von Leukozyten. Vor allem die endothelialen Adhäsionsmoleküle PECAM (*platelet/endothelial-cell adhesion molecule*)-1, CD99 und diverse JAMs (*junctional adhesion molecules*) werden auf die luminale Oberfläche der Endothelzellen mobilisiert und lenken so Leukozyten durch die parazellulären Räume (Woodfin et al. 2010).

Der transzelluläre Migrationsweg stellt nur einen kleinen Prozentsatz der migrierenden Leukozyten dar. Prädilektionsstellen sind Orte, wo die Endothelzelle besonders dünn und somit der Transmigrationsweg verkürzt ist (Feng et al. 1998). ICAM-1-Bindung führt zur Translokation von ICAM-1 zu Caveolae (Membraneinstülpungen, die zu den *lipid rafts*, speziellen Membrandomänen, gehören). Diese ICAM-1-reichen Caveolae formieren sich zu Vesikulo-vakuolären Organellen (VVO), die sich mit Zytoskelettproteinen (z.B. Aktin) der Leukozyten verbinden und dadurch einen intrazellulären Kanal durch die Endothelzelle als Leitstruktur für die transmigrierenden Leukozyten bilden (Woodfin et al. 2010).

Die Leukozyten müssen auf ihrem Weg durch die Gefäßwand drei Barrieren überwinden: die Endothelzelle, die Basalmembran und ggf. noch eine Schicht aus Perizyten. Über die Migration durch die beiden letzteren ist bisher wenig bekannt. Es wird vermutet, dass auch hier Integrine der Leukozyten eine Rolle spielen bzw. leukozytäre Proteasen (z.B. Elastase) den Durchtritt ermöglichen (Woodfin et al. 2010).

Nach der Transmigration kommt es zur Adhärenz an geschädigte Hepatozyten durch das beta-2-Integrin Mac-1 der Neutrophilen und ICAM-1 der Hepatozyten (Ramaiah und Jaeschke 2007).

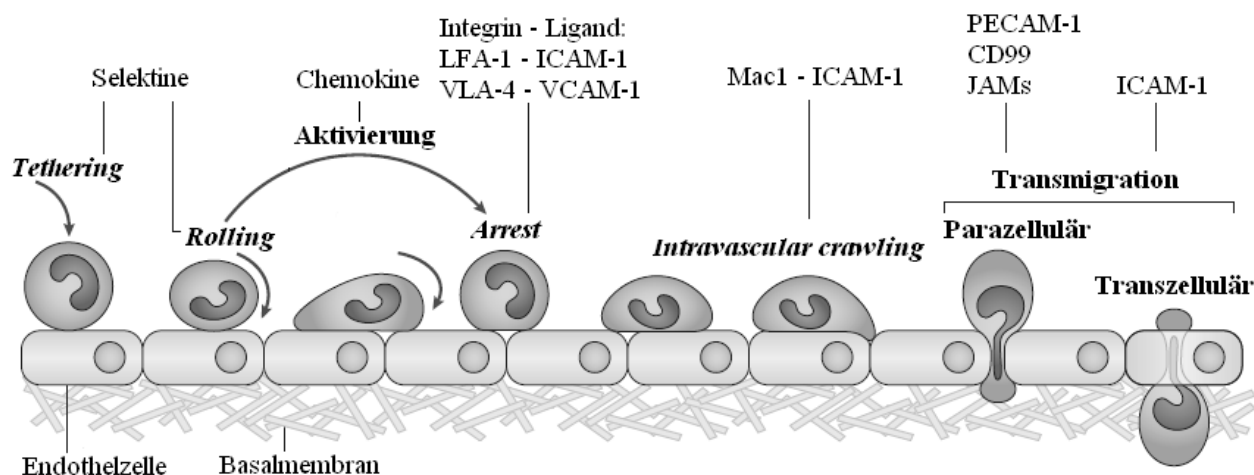


Abb. 1: Die Leukozytenadhäsionskaskade verändert nach (Ley et al. 2007). Die einzelnen Schritte sind fett gedruckt: Das initiale Einfangen (*tethering*) der Leukozyten und das *rolling* sind Selektin-vermittelt, die Aktivierung erfolgt durch Chemokine, die feste Adhäsion (*arrest*) wird durch Integrine realisiert. Nach dem gezielten Entlangkriechen an der Gefäßwand (*intravascular crawling*) zum Ort der Transmigration treten die Leukozyten entweder para- oder transzellulär durch das Endothel ins Gewebe über. Die entscheidenden Moleküle für jeden Schritt stehen jeweils über dem senkrechten Strich: ICAM-1, interzelluläres Adhäsionsmolekül 1; JAM, *junctional adhesion molecule*; LFA-1, Leukozyten-Funktions-assoziiertes Antigen-1; MAC1, *macrophage-1 antigen*; PECAM-1, *platelet/endothelial-cell adhesion molecule-1*; VCAM-1, *vascular-cell adhesion molecule 1*; VLA-4, *very late antigen 4* (ein beta-2-Integrin).

1.2 Die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei Sepsis

Neben der Adhäsionsmolekül-vermittelten Transmigration (Leukozytenadhäsionskaskade) können Neutrophile auch direkt in Wechselwirkung mit Hepatozyten treten. Dies ist der Fall, wenn die endotheliale Barriere in den Kapillaren bei einem septischen Geschehen gestört oder aufgehoben ist (Jaeschke et al. 1996). Der Barriereverlust ist bedingt durch Interleukine und Sauerstoffradikale (*respiratory burst*) sowie lysosomale Enzyme der Entzündungszellen, wodurch das sog. *capillary leak syndrome* mit konsekutiver Ödembildung und Organminderperfusion entsteht.

1.2.1 Sepsis

Das endotheliale Leck ist allerdings nur eine Folge der sehr komplexen Pathophysiologie der Sepsis. Das Krankheitsbild der Sepsis wird bestimmt von der Abwehrreaktion des Körpers gegen eine Infektion. Treten Erreger in den Blutkreislauf über, erkennen Immunzellen über Toll-like-Rezeptoren (TLR) bestimmte Oberflächenstrukturen dieser Pathogene, die sog. *pathogen-associated molecular pattern (PAMP)*. Zu den *PAMP* gehören Lipopolysaccharide (LPS) der Membran gramnegativer Bakterien, andere Zellwandbestandteile von Bakterien

oder Pilzen (Lipoteichonsäure, Peptidoglycane, Mannane) sowie freie Nucleinsäuren von Viren (Takeda und Akira 2007). Im Anschluss an die initiale Wirt-Mikroorganismus-Interaktion kommt es zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit einer Ausschüttung zahlreicher proinflammatorischer (TNF-alpha, IFN-gamma, IL-1-beta, IL-6, IL-9, NO, PAF, u.v.a.) und antiinflammatorischer Mediatoren (IL-4, IL-10) aus immunkompetenten Zellen (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Thrombozyten, Endothelzellen). Diese Mediatoren sorgen dafür, dass weitere Entzündungszellen, initial vor allem neutrophile Granulozyten, an den Entzündungsort rekrutiert werden und somit eine angemessene Wirtsantwort auf die eingedrungenen Erreger generiert werden kann (Weigand et al. 2004). Diese amplifizierte Immunantwort gerät allerdings außer Kontrolle, sobald die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren zugunsten der Proinflammation verschoben ist. Die Verteilung der freigesetzten Zytokine im Blut löst in diesem Fall eine Hyperinflammation aus (Hotchkiss und Karl 2003). Diese unkontrollierte systemische Immunaktivierung wird unabhängig vom initialen Auslöser als *systemic inflammatory response syndrome (SIRS)* bezeichnet (Levy et al. 2003). Infolge der unkontrollierten systemischen Ausweitung der Inflammationsreaktion werden auch infektortferne Organe in den Entzündungsprozess einbezogen und geschädigt, die primär nicht involviert waren. So entfalten Entzündungsmediatoren und aktivierte Immunzellen ihre destruktive Wirkung auch fernab vom initialen, entzündungsauslösenden Lokus. Als Ursache dieser systemischen Inflammation kommen sowohl lokale und generalisierte Infektionen als auch nicht-infektiöse Erkrankungen wie akute Pankreatitis, Verbrennungen oder Traumen in Betracht. Sepsis ist somit kurz als „SIRS plus Infektion“ definiert (Bone et al. 2009).

Die Sepsis geht mit zahlreichen pathophysiologischen Veränderungen einher. Durch den unkontrollierten Verbrauch plasmatischer Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten kommt es zur Verbrauchskoagulopathie mit okklusierenden Mikrothromben und Gewebehypoxie einerseits sowie Reperfusionsschäden und Organeinblutungen andererseits (disseminierte intravasale Gerinnung). Diese Minderperfusion und Gewebehypoxie führen zu Gewebedestruktionen, die zusätzliche Zytokinausschüttungen triggern und chemotaktisch auf weitere Entzündungszellen wirken. Der Entzündungsprozess erhält sich in der Folge selbst aufrecht. Aus dieser dysregulierten massiven systemischen Aktivierung des Immunsystems kann im schwerwiegendsten Fall ein Multiorganversagen (MODS/MOF) resultieren.

1.2.2 Leberzellschädigung durch Granulozyten bei Sepsis

Die Leber ist ein Hauptorgan für die Entstehung des Sepsis-assoziierten Multiorganversagens (*MOF*). Bei einem systemischen inflammatorischen Ereignis werden die neutrophilen Granulozyten als erste Immunzellen zum Ort der Entzündung dirigiert (Haslett 1997). Sie werden durch chemotaktisch wirksame Substanzen wie bakterielle Produkte (fMLP, Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin), Komplement (z.B. C5a), PAF, Leukotriene, Chemokine (z.B. IL-8/CXCL8) (Reddy und Standiford 2010) sowie untergegangene Parenchymzellen angezogen. Am Ort der Entzündung/Infektion bilden sie Phagozytosen, in denen sie durch proteolytische und oxidative Prozesse eingedrungene Pathogene bekämpfen können. Sie sind von größter Bedeutung für die lokale Begrenzung des bakteriellen Wachstums und für ein Verhindern der bakteriellen Ausbreitung im Organismus. Allerdings ist es von großer Notwendigkeit, dass die Immunantwort zur Vermeidung gewebedestruktiver Effekte engmaschig reguliert wird. So müssen am Beispiel der Leber zwar eingedrungene Bakterien wirksam eliminiert werden, gleichwohl sollten aber Hepatozyten von den zytotoxischen Metaboliten verschont bleiben. Geraten bei der Sepsis bzw. dem SIRS antibakterielle Prozesse auf der einen und hepatoprotektive Vorgänge auf der anderen Seite außer Gleichgewicht, so sind die Folgen einer unkontrollierten Inflammation fataler als die Wirkung des ursprünglichen Pathogens selbst. In diesem Fall übersteigen die Freisetzung von Proteasen wie Cathepsin G und Elastase sowie die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Jaeschke und Smith 1997) durch Neutrophile die hepatoprotektiven Ressourcen (z.B. Glutathion), wodurch auch gesunde, funktionsfähige Leberzellen geschädigt werden. Weitere Leberzellschädigung während der Sepsis ist der Hypoxie anzurechnen, welche durch die Minderperfusion im Kapillarbett entsteht. Diese ist zum einen bedingt durch die vermehrte Gerinnungsneigung mit konsekutiven Mikrothromben, zum anderen auf okklusierende Leukozytenaggregate durch verstärkte Leukozytenadhäsion am Endothel zurückzuführen (Ring und Stremmel 2000, Croner et al. 2006). In Abwesenheit einer Inflammation zirkulieren Neutrophile nur eine kurze Zeit (ca. sechs Stunden), bevor sie von Makrophagen in Leber, Milz und Knochenmark abgebaut werden. Erreichen sie jedoch einen Entzündungsort, wird ihre sonst sehr kurze Lebensspanne durch inflammatorische Mediatoren wie GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), Chemokine und andere chemotaktisch wirksame Substanzen verlängert (Reddy und Standiford 2010). Aktivierte und transmigrierte Neutrophile produzieren Zytokine und Chemokine, die zusätzliche Leukozyten rekrutieren und somit die Immunantwort und Zytokinkaskade amplifizieren sowie dadurch

zur Gewebeschädigung beitragen. Folglich spielen die neutrophilen Granulozyten bei Sepsis-bedingter Hepatotoxizität und konsekutivem Leberversagen eine entscheidende Rolle (Jaeschke et al. 1991, Hewett et al. 1992).

Neben den bisher genannten Zytokinen ist eine weitere Gruppe von Mediatoren in den Fokus der Aufmerksamkeit gelangt. Unlängst ist bekannt, dass Sphingolipide weit mehr als bloß inerte Bestandteil zellulärer Membranen sind.

1.3 Sphingolipide

Die Sphingolipide stellen neben den Glycolipiden und Sterolen eine der drei Hauptgruppen der Membranlipide dar (Futerman und Hannun 2004). Die Sphingolipide sind daher so interessant, weil sie neben ihrer Funktion als inerte Strukturkomponente in Zellmembranen auch als Mediatoren wichtiger Stoffwechselprozesse fungieren. So sind sie involviert in verschiedenen Zellprozessen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Inflammation. Sowohl als *first* (Ligand) und *second messenger* (intrazellulärer Mediator) als auch biophysikalisch durch ihre zentrale Rolle bei der Ausbildung von Mikrodomänen in Zellmembranen, den sog. *rafts*, nehmen Sphingolipide entscheidenden Einfluss auf diverse Signalwege der Zelle (Futerman und Hannun 2004). Diese *rafts* sind sehr kleine, eng gepackte sphingolipid- und cholesterolreiche Membrandomänen, die in einem flüssigeren Zustand als die restlichen Membranbestandteile vorliegen (Kolesnick et al. 2000).

Ogleich die Biosynthese und der Abbau der Sphingolipide schon intensiv untersucht wurden, ist immer noch wenig über die Funktion und die einzelnen Regulationsmechanismen insbesondere bei Entzündung bekannt.

1.3.1 Sphingomyelinasen und Makrodomänenbildung

Ein entscheidender Drehpunkt im Sphingolipidstoffwechsel ist die Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid durch die Sphingomyelinase (SMase). Sphingomyelinasen spalten die Phosphodiesterbindung des inerten Membranlipids Sphingomyelin in Phosphorylcholin und Ceramid. Ca. 50-70 % des gesamten Sphingomyelins befindet sich in den bereits erwähnten speziellen Membrandomänen, den *rafts*, wo es zu Ceramid hydrolysiert werden kann (Cremesti et al. 2002). Ceramid ist weitaus bioaktiver als Sphingomyelin und stellt quasi den Mittelpunkt des Sphingolipidstoffwechsels dar (Abb. 2). Es ist das Schlüsselsignalmolekül der *lipid rafts*. Ceramid aggregiert spontan mit anderen

Ceramidmolekülen und bildet auf diese Weise ceramidreiche Mikrodomänen innerhalb der *rafts*. Ceramidreiche Mikrodomänen weisen die Tendenz auf, spontan miteinander zu fusionieren und ceramidreiche Makrodomänen auszubilden (Zhang et al. 2009). Diese werden auch als ceramidreiche Membranplattformen bezeichnet (Grassme et al. 2008). Sie verändern die biophysikalischen Eigenschaften der Membran und führen außerdem dazu, dass Rezeptoren und Signalmoleküle "eingefangen" (*clustering*) und somit Signaltransduktionskaskaden moduliert bzw. amplifiziert werden (Liu und Anderson 1995, Gulbins und Kolesnick 2003).

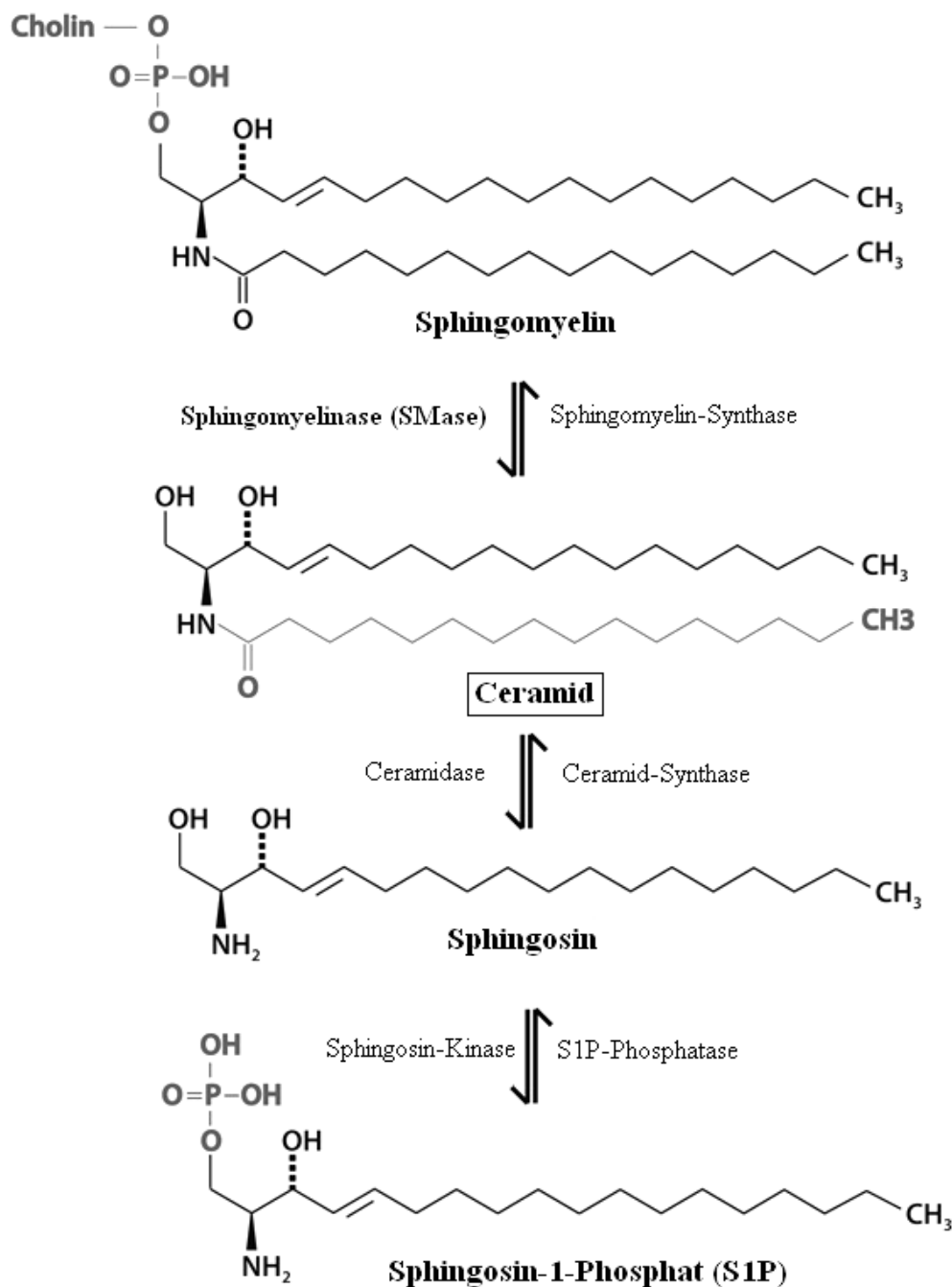


Abb. 2: Übersicht über den Sphingolipidstoffwechsel verändert nach (Uhlig und Gulbins 2008).

Bisher sind fünf Isoformen der Sphingomyelinase bekannt, welche sich in ihrem pH-Optimum und ihrer Cofaktorabhängigkeit unterscheiden: eine saure lysosomale und eine saure sezernierte SMase, Mg^{2+} -abhängige neutrale SMasen sowie eine alkalische Isoform (Uhlig und Gulbins 2008). Die beiden sauren Isoformen werden am häufigsten mit entzündlichen Prozessen und Sepsis assoziiert (Uhlig und Gulbins 2008), weshalb der Fokus der durchgeführten Experimente und vorliegenden Arbeit auf diese gelegt wurde. Die saure lysosomale sowie die saure sezernierte SMase stammen vom gleichen *smpd1* (*sphingomyelin phosphodiesterase*)-Gen ab. Folglich sind die Proteine sowohl im Blutplasma als auch in den intrazellulären Lysosomen vorhanden. Die lysosomale SMase wird durch verschiedenen Stimuli - darunter CD95 sowie bakterielle oder virale Infektionen - aus den intrazellulären Speichern auf die äußere Zellmembran transloziert, wo sie das in den *rafts* enthaltene Sphingomyelin zu Ceramid spaltet und somit Voraussetzung für die Bildung ceramidreicher Membrandomänen und somit für die Ceramid-abhängigen Signalwege ist (Grassme et al. 2008). Die sezernierte SMase-Isoform wird von Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen und anderen Zellen freigesetzt. Insbesondere Endothelzellen scheinen eine wichtige Quelle zu sein. Sie können die SMase sowohl apikal ins Blut als auch basolateral Richtung Basalmembran sezernieren. Stimulatorisch auf die Sekretion wirken hierbei proinflammatorische Mediatoren wie IL-1-beta, IFN-gamma, IFN-beta, TNF-alpha, PAF (*platelet activating factor*), Sauerstoffradikale sowie bakterielle Endotoxine (Marathe et al. 1998).

Bei einem Defekt des *smpd1*-Gens entsteht die Speicherkrankheit Niemann-Pick-Syndrom, dessen klinische Einteilung (Typ A und B) und Schweregrad von der residualen SMase-Aktivität abhängig sind (Smith und Schuchman 2008). Durch den *smpd1*-Gendefekt kommt es zu einem relativen oder absoluten SMase-Mangel, wodurch die Generierung von Ceramid gestört ist und konsekutiv Sphingomyelin in den Lysosomen sowie in der Zellmembran akkumuliert (Kuemmel et al. 1997). Die daraus resultierenden Membranabnormalitäten führen zu einer Änderung der Membraneigenschaften und zu einer Beeinträchtigung der SMase- bzw. Ceramid-vermittelten Signalkaskaden.

1.3.2 Sphingolipide und Inflammation

Unlängst wurde bekannt, dass der Sphingolipidstoffwechsel bzw. die Ceramidgenerierung eine wichtige Rolle bei der zellulären Stressantwort und der systemischen Inflammationsreaktion spielen (Mathias et al. 1998, Wong et al. 2000). Beispielsweise haben Septiker signifikant erhöhte plasmatische SMase-Aktivität und Ceramidspiegel im Vergleich

zu gesunden Kontrollen, deren Höhe mit einem schlechten Outcome korreliert (Claus et al. 2005). Proinflammatorische Mediatoren sowie Endotoxine, die während einer systemischen Inflammation bzw. Sepsis im Plasma zirkulieren, wirken stimulatorisch auf die Ceramidgenerierung (1.3.1).

Darüber hinaus sind die Sphingomyelinmetabolite an der Differenzierung und Apoptose von immunkompetenten Zellen beteiligt. Von der SMase synthetisiertes Ceramid kann zu einem Leberzellschaden führen sowie durch Endothelzellverletzung die Gefäßpermeabilität erhöhen, was vor allem bei der Sepsis von hoher Relevanz ist (Uhlir und Gulbins 2008). Des Weiteren nimmt es durch die Fusion zu speziellen Makrodomänen Einfluss auf die Signalprozesse diverser Zellen, die mit dem Inflammationsgeschehen assoziiert sind, allen voran Leukozyten und Endothelzellen. Beispielsweise veranlassen ceramidreiche Membranplattformen in Phagozyten die Fusion von Lysosomen und Phagosomen zum Phagolysosom, der Voraussetzung eines wirksamen intrazellulären Abtötens eingedrungener Pathogene (Gulbins et al. 2004). Zudem wird die durch eine Infektion getriggerte Apoptose *via* Fas/CD95 oder TNF-alpha durch die SMase vermittelt (Smith und Schuchman 2008). So sind SMase-defiziente Tiere von TNF-alpha-induzierter Apoptose der Hepatozyten und konsekutivem Leberversagen geschützt (Bollinger et al. 2005).

Ceramid triggert außerdem die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und stimuliert Endothelzellen zur Expression von P-Selektin für die Adhäsion der Leukozyten (1.1.1) (Bhatia et al. 2004).

Die Sphingolipide, allen voran Ceramid, scheinen in vielerlei Hinsicht an den Pathomechanismen von Entzündungsreaktionen und der Sepsis beteiligt zu sein. Allerdings sind die genauen Zusammenhänge noch unzureichend verstanden und erst weitere Untersuchungen werden mehr Aufschluss über das komplexe Netzwerk der Sphingolipide bringen.

2 Zielsetzung

Klinische Observationsstudien und präklinische Untersuchungen belegen, dass die Aktivität eines bestimmten, Sphingomyelin-spaltenden Enzyms, der sauren Sphingomyelinase (SMase) und der wichtigste Effektor des Sphingolipidstoffwechsels, das Ceramid, entscheidende Rollen bei inflammatorischen Prozessen, bei Sepsis und der Entwicklung eines Organversagens spielen. Umgekehrt betrachtet gehen entzündliche Geschehen mit einer Veränderung des Sphingolipidmusters einher. Ceramidreiche Makrodomänen in Zellmembranen vermitteln eine Vielzahl von Signalkaskaden, so auch zwischen immunkompetenten Zellen, welche die inflammatorischen Abläufe wie Zellaktivierung, Zytokinfreisetzung, Chemotaxis und Diapedese bestimmen.

Die Einwanderung von Leukozyten, allen voran der neutrophilen Granulozyten, in entzündliches Gewebe ist ein kritischer Schritt der Immunantwort des Organismus gegen einen eingedrungenen Erreger und wird regelhaft bei der Ausbildung eines Organversagens beobachtet. Die transendotheliale Leukozytenmigration in das Parenchym der Organe umfasst zahlreiche Mediatoren und Signalkaskaden zwischen Neutrophilen, Endothel- und Parenchymzellen. Welche Rolle die SMase bei diesem Prozess spielt ist bisher nicht bekannt. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Hypothesen bearbeitet:

(1) Eine genetische SMase-Defizienz nimmt bei einem systemischen inflammatorischen Ereignis Einfluss auf die transendotheliale Leukozytenmigration in die Leber.

(2) Die Expression diverser Gene für Transmigration, Chemotaxis und Phagozytose relevante Proteine in Leukozyten sowie Hepatozyten wird im Rahmen einer systemischen Inflammation durch die SMase beeinflusst.

Zur Simulation einer polymikrobiellen Infektion und zum Triggern einer systemischen Immunantwort wurde das PCI-Modell (*peritoneal contamination and infection*) angewandt. Hypothese (1) überprüfend wurden sechs Stunden nach intraperitonealer Faecesinjektion die Lebern der SMase-defizienten Mäuse, der Wildtypmäuse sowie der gesunden Kontrollmäuse entnommen und histologisch aufgearbeitet. Die neutrophilen Granulozyten wurden spezifisch angefärbt und deren Anzahl bestimmt. Die Fragestellung nach der Genexpression (2) wurde mittels quantitativer PCR von muriner Leber- sowie leukozytärer cDNA geklärt.

3 Methodik

3.1 Kits und Geräte

3.1.1 Kits

Leukozytenfärbung	LEUCOGNOST [®] NASDCL, Merck
Bakterienkultivierung	Blutagar, Schädleragar, Hirn-Herz-Glucose Bouillon
RNA-Isolation	Leber: RNeasy [®] Protect Mini Kit, Qiagen Blut: PAXgene [™] Blood RNA Kit, Qiagen
Globin-mRNA-Depletion	GLOBINclear [™] Kit, Ambion
Gelelektrophorese	Experion [™] RNA StdSens kit, Bio-Rad
cDNA-Synthese	RevertAid [™] First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas
Real-Time-PCR	2x Brilliant [®] II SYBR [®] Green Q PCR Master Mix, Stratagene

3.1.2 Geräte

Lichtmikroskop	PROVIS AX70, OLYMPUS [®]
Kamera	AxioCam MRc5, Carl Zeiss
Histokinette	TP 1020 Tissue Processor, Leica
Einbettautomat	EG 1160 Tissue Embedding Station, Leica
Rotationsmikrotom	RM 2165, Leica
Homogenisator	Ultra-Turrax [®] , IKA [®]
RNA-Isolation	Leber: TissueLyser [™] , Qiagen Blut: PAXgene [™] Blood RNA Tube, Qiagen QIAcube [™] , Qiagen
Gelelektrophorese	Experion [™] Automated Electrophoresis System, Bio-Rad
cDNA-Synthese	PTC-200 Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad
Real-Time-PCR	Rotor-Gene rotary analyzer, Corbett Life Science
Spektrophotometrie	NanoDrop [™] 1000 Spektrophotometer mit der dazugehörigen Software: Nanodrop 3.7.0, Thermo Fisher Scientific

3.2 Primer für die Real-Time-PCR

Die folgende Tabelle (Tab. 1) zeigt die verwendeten Primer einschließlich der dazugehörigen Sequenzen, der PCR-Produktgröße sowie der Herstellerfirma.

Tab. 1: Sequenzübersicht der verwendeten Primer

Primer	Sequenz 5`-3`	PCR- Produktgröße [bp]	Hersteller
ACTB	fw: GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT rv: CGGATGTCAACGTCACACTT	92	biomers.net GmbH
Arl3	fw: GCTGAGTTGTGTGCCCGTGCT rv: TGGACGCCCTCGCCTGTGA	156	biomers.net GmbH
Arl5a	fw: CCTCGCTGCCTTGGGTGCTT rv: GAGCCTGGTGGTCTTGGGGGA	86	biomers.net GmbH
Cxcl2	fw: AGCCACTCTCAAGGGCGGTCA rv: CCCAGGCTCCTCCTTTCCAGGT	121	biomers.net GmbH
Cxcl9	fw: CTCAGCTCTGCCATGAAGTCCGC rv: GGATCGTGCCTCGGCTGGTG	133	biomers.net GmbH
Esm1	fw: TCTGCCTCCCACACAGAGCGT rv: GGCCGAGCAGCGTTCCCTTC	86	biomers.net GmbH
Ifrd1	fw: GCCGCTCCTCGCCTCTCTTG rv: CCGGTGCCGCCTACACTTGG	125	biomers.net GmbH
Ltf	fw: CTGTGCCCTGTGTATTGGTG rv: ATGCAACATTTCTGCCTTC	122	biomers.net GmbH
Rnd1	fw: ACCTGGAGGGCTCGGCTTTCA rv: AGGCTTCGGACGGGGCTCTT	118	biomers.net GmbH

3.3 Datenbanken

Literaturrecherche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ http://apps.isiknowledge.com/UA_GeneralSearch_input.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&SID=Q1HLI2f3gDPKecI5NkD&preferencesSaved=
Genom	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Primerdesign	http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm
Primeranalyse	http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/
Primerblast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

3.4 Mäuseversuche nach dem PCI-Modell

Für die Versuche wurden unter Standardbedingungen gehaltene, zehn Wochen alte Wildtyp- sowie SMase-defiziente Mäuse nach dem Generierungsmodell von Horinouchi verwendet (Horinouchi et al. 1995). Hierbei wird ein Vektor in die Gensequenz der sauren SMase eingebracht, wodurch die Kodierungsfähigkeit dieser Sequenz aufgehoben wird (*gene targeting*). Die so entstandenen Mäuse weisen keine nachweisbare SMase-Aktivität mehr auf. Bei einem willkürlich ausgewählten Teil der Wildtyp- und SMase-defizienten Mäuse wurde in Anlehnung an das PCI-Modell von Bauhofer (Bauhofer et al. 2002) eine humane Faecessuspension (3.5) mit einer Dosis von 10 µl/kg KG in die Peritonealhöhle injiziert*. Den restlichen Mäusen wurde eine Natriumchloridlösung intraperitoneal injiziert. Sie dienten als gesunde Negativkontrollen. Sechs Stunden nach PCI bzw. NaCl-Injektion wurden alle Mäuse durch intraperitoneale Ketamininjektion (110 mg/kg KG) narkotisiert. Nach medianer Laparotomie mit einer kleinen Schere und Pinzette wurde aus der *V. cava inferior* Blut abgenommen sowie die Leber entnommen. Die Lebern für die RNA-Isolation wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, die zur histologischen Aufarbeitung vorgesehenen Lebern wurden in Formaldehyd fixiert.

* Tierversuchsgenehmigungsnummer: TVA 22-2684-04-02-037/08

Die Einteilung in vier Gruppen wurde wie folgt vorgenommen:

- KOP (SMase-Knock-Out bei Peritonitis, d.h. nach PCI)
- KOS (SMase-Knock-Out *sham*, d.h. gesund)
- WTP (Wildtyp bei Peritonitis)
- WTS (Wildtyp *sham*)

3.5 Präparation der humanen Faecessuspension

Es wurden Stuhlproben von drei gesunden, Nichtvegetariern benutzt. Die Proben wurden mit einer Thioglycolatsuspension (14,5 g Thioglycolat, 50 g Bariumsulfat, 50 ml zweifach destilliertes Wasser) im Verhältnis 1:1 sowie mit Katalase (0,19 mg/100 ml) zur Optimierung des Bakterienwachstums und Inaktivierung von ROS verdünnt. Zur Kryokonservierung wurde 10 %-iges Glycerin hinzugegeben. Die Suspension wurde in einem Mixer unter anaeroben Bedingungen homogenisiert. Die fertigen Faecessuspensionen wurden bis zur Verwendung bei -80°C in Aliquots gelagert. Die Zusammensetzung und die *colony forming units (cfu)* der einzelnen Bakterienstämme (Tab. 2) wurden durch mikrobiologische Untersuchungsmethoden ermittelt.

Tab. 2: Mikrobiologische Zusammensetzung der Faecessuspension

Gruppe		Bakterienzahl (cfu/ml)	
aerob		1,23 * 10 ⁶	
anaerob		110 * 10 ⁶	
Gram-positiv		36,7 * 10 ⁶	
Gram-negativ		74,5 * 10 ⁶	
Bakterium	Inkubation	Gramfärbung	Bakterienzahl
<i>E. Coli</i>	aerob	Gram-negativ	4,8*10 ⁵
<i>G Streptococci</i>	aerob	Gram-positiv	2,0*10 ⁵
<i>Enterococci</i>	aerob	Gram-positiv	5,0*10 ⁵
<i>Klebsiella oxytoca</i>	aerob	Gram-negativ	0,5*10 ⁵
<i>Peptostreptococci</i>	anaerob	Gram-positiv	360*10 ⁵
<i>Veilonella</i>	anaerob	Gram-negativ	320*10 ⁵
<i>Bacteroides</i>	anaerob	Gram-negativ	410*10 ⁵
<i>Pervotella</i>	anaerob	Gram-negativ	10*10 ⁵

3.6 Histologische Aufarbeitung der Leberproben

3.6.1 Fixierung

Um postmortal auftretende, autolytische Veränderung der Organe und histochemisch bedingte Gewebe- und Zellverletzungen zu vermeiden, ist es notwendig, die Organe in Formaldehyd zu fixieren. Hierbei kommt es zur Ausfällung von Zellbestandteilen sowie zu einer Vernetzung von Proteinen durch Ausbildung von Methylenbrücken zwischen Aminogruppen der Proteine. Nach der Entnahme wurden die vollständigen Lebern für 24 Stunden in 4 %-igem Paraformaldehyd fixiert und im Kühlraum bei 4°C gelagert. Nach 15-minütiger Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Lebern für weitere 12 Stunden in 70 %-igem Ethanol im Kühlraum aufbewahrt.

3.6.2 Paraffineinbettung

Um möglichst dünne Gewebeschnitte für die Mikroskopie erstellen zu können, müssen die Organe in ein festes Medium eingebettet werden. Zunächst muss jedoch die Fixierungsflüssigkeit herausgewaschen und das Gewebe mit Alkohol (Ethanol) vollständig entwässert werden. Um anschließend in Paraffin eingegossen werden zu können, müssen die Organe mit einer geeigneten Zwischenflüssigkeit (Xylol) behandelt werden, welche sich sowohl mit dem entwässernden Ethanol als auch mit Paraffin mischt.

Die Formaldehyd-fixierten Leberpräparate wurden in einer Histokinette in aufsteigender Alkoholreihe für je eine Stunde entwässert (70 %, 70 %, 96 %, 96 %, 100 %, 100 %, 100 %-Ethanol, 1:1 100 %-Ethanol + Xylol) und anschließend zweimal für je eine Stunde in Xylol überführt. Danach wurden die Proben zweimal für je eine Stunde in geschmolzenes Paraffin gegeben. Diese Schritte liefen automatisch in der Histokinette für zwölf Stunden über Nacht ab. Am folgenden Tag wurden die Leberpräparate mit flüssigem Paraffin übergossen und in Kassetten eingebettet. Durch Kühlen erhärtete der Paraffinblock und wurde schnittfähig, so dass am Mikrotom 6 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen werden konnten.

3.6.3 Esterasefärbung

Zur Anfärbung der neutrophilen Granulozyten wurde der Farbstoff LEUCOGNOST[®] NASDCL verwendet. Das Prinzip beruht auf dem enzymhistochemischen Nachweis der Naphthol AS-D Chloracetat-Esterase in Leukozyten. Die Chloracetat-Esterase bewirkt die Hydrolyse von Naphthol-Chloracetat zu einer Naphtholverbindung. Diese reagiert in einer Kopplungsreaktion mit einem Diazoniumsalz zu einem wasserunlöslichen rotvioletten Azofarbstoff (Abb. 3).

Die Objektträger wurden zweimal (10 min, 5 min) in Xylol gegeben und anschließend der absteigenden Alkoholreihe für je eine Minute zum Entparaffinieren zugeführt (100 %, 100 %, 96 %, 80 %, 60 %, 50 %). Nach 2-minütigem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Objektträger für 30 Minuten in die Färbelösung gegeben (die Herstellung der Färbelösung ist dem Herstellerprotokoll zu entnehmen). Danach wurden die Objektträger für 5 Minuten in destilliertes Wasser gestellt und anschließend für 10 Sekunden mit zuvor filtrierter Mayers Häkalaunlösung gegengefärbt. Zur Herstellung der Häkalaunlösung wurde 1 g Hämatoxylin in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend 0,2 g Natriumjodat sowie 50 g Kalialaun (Kaliumaluminiumsulfat) hinzugegeben. Nach völligem Lösen dieser Bestandteile wurden zu 100 ml dieser Stammlösung 5 g Chloralhydrat und 0,1 g Zitronensäure hinzugefügt. Mayers Häkalaun ist eine klassische Färbelösung für die Kernfärbung. In der Häkalaunlösung bildet Hämatoxylin mit Aluminiumionen des Zellkerns eine Komplexverbindung, die blau erscheint.

3.6.4 Dokumentation der Leberschnitte

Um die Esterase-gefärbten neutrophilen Granulozyten, welche in das Leberparenchym transmigrierten, quantitativ erfassen zu können, wurden die Leberschnitte unter einem Mikroskop mittels einer speziellen Mikroskopkamera (AxioCam MRc5 von Carl Zeiss) und der dazugehörigen Software ausgewertet. Hierzu wurden pro Leber 20 Gesichtsfelder in 400-facher Vergrößerung aufgenommen und als Bilddatei gespeichert. Uneinheitlichkeiten zwischen Bildern hinsichtlich Helligkeit und Kontrast wurden mit dem Microsoft Office Picture Manager ausgeglichen. Im Anschluss wurden für jede Leber die intraparenchymalen Leukozyten von zwei unabhängigen Beobachtern auf 20 Gesichtsfeldern verblindet gezählt, addiert und als Leukozyten/20 Gesichtsfelder dokumentiert.

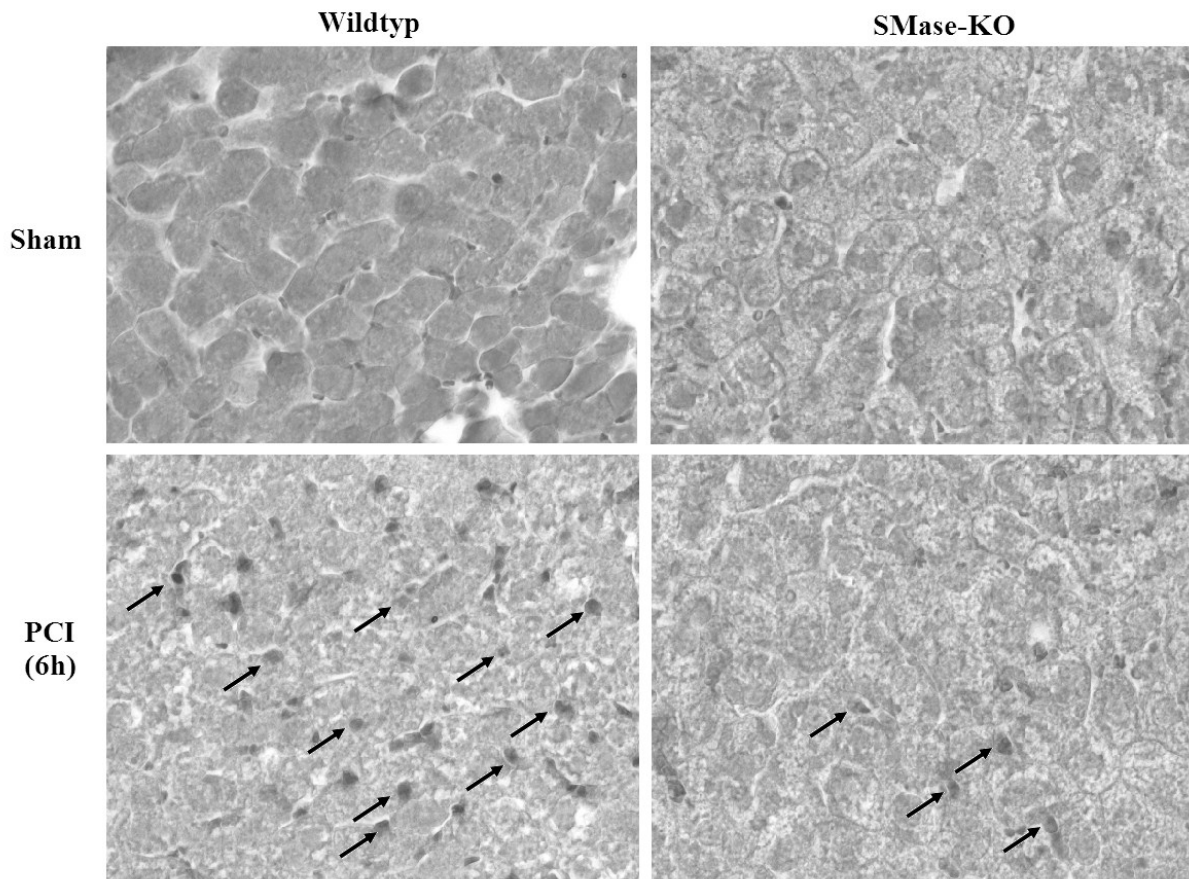


Abb. 3: Esterasefärbung der neutrophilen Granulozyten in der Leber. Es ist pro Gruppe je ein repräsentatives Gesichtsfeld dargestellt (400-fach vergrößert): oben links: Wildtyp *sham* (gesund); oben rechts: SMase-KO *sham*; unten links: Wildtyp sechs Stunden nach PCI; unten rechts: SMase-KO sechs Stunden nach PCI. Die Pfeile markieren die gezählten intraparenchymalen neutrophilen Granulozyten.

3.7 Kompartimentspezifische Bakterienlast

Um die Bakterienlast in den Kompartimenten Blut und Leber zu ermitteln, wurden den Ketamin-narkotisierten Mäusen sechs Stunden nach PCI die Lebern entnommen bzw. Vollblut aus der *V. cava inferior* abgenommen. Die Lebern wurden mit Ethanol gespült und mit 3 ml Natriumchloridlösung eine Minute lang im Ultra-Turrax[®] homogenisiert. Im Anschluss wurden die Leberhomogenisate und Blutproben jeweils mit 2 ml Hirn-Herz-Glucose Bouillon gevortexet und wie folgt verdünnt:

- Leber: unverdünnt und 1:200
- Blut: unverdünnt und 1:10

100 µl der Leberlösungen und 50 µl der Blutlösungen wurden auf speziellen Agarplatten ausplattiert – Blutagar für aerobe, Schädleragar für anaerobe Bedingungen – und über Nacht

bei 37°C inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die auf dem Agar gewachsenen Bakterienkolonien (*cfu*) ausgezählt.

3.8 RNA-Isolation aus den Zellen

3.8.1 RNA-Isolation aus dem Lebergewebe

Von den kryokonservierten (-80°C) Lebern wurden unter sterilen Bedingungen ca. 30 mg-Proben abgeschnitten und nach Zugabe von β -Mercaptoethanol und Pufferlösung im TissueLyser™ (Qiagen) homogenisiert. Im Anschluss wurde der Überstand für fünf Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten im QIAcube™ (Qiagen) mit dem RNeasy® Protect Mini Kit. Für nähere Hinweise zum Versuchsablauf sei hierfür auf das Herstellerprotokoll verwiesen. Zuletzt wurde die gewonnene RNA für fünf Minuten bei 60°C im Peltier Thermal Cycler inkubiert.

3.8.2 RNA-Isolation aus dem Blut

Um die RNA der entnommenen Blutproben zu konservieren, war die Blutaufbewahrung in speziellen Tubes angezeigt. Hierzu wurden PAXgene™ Blood RNA Tubes verwendet, in denen ein Zusatzstoff nach Angaben des Herstellers enthalten ist, der die Degradierung der RNA durch im Blut enthaltene RNasen verhindert sowie eine unerwünschte Induktion der Genexpression vermindert. Die venöse Blutabnahme erfolgte mit einer 10 ml-Spritze, in der 200 μ l des Zusatzstoffes vorgelegt waren. Anschließend wurde das Blut in die PAXgene™ Blood RNA Tubes überführt und Zusatzstoff bis zu einem Verhältnis von 2,76 ml Zusatzstoff pro abgenommenen Milliliter Blut hinzugegeben. Die gefüllten Blood RNA Tubes wurden für die ersten 24 Stunden bei -20°C und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Das Blut enthält große Mengen an α - und β -Globin-mRNA Transkripte in Erythrozyten und deren Vorläuferzellen, welche mit der Detektion von quantitativ weniger vorliegenden Transkripten interferieren und Artefakte in der PCR-Analyse erzeugen. Auf eine Zellfraktionierung bzw. Leukozytenisolierung der Blutprobe wurde verzichtet, da jede zusätzliche Manipulation zur Zellaktivierung und Veränderung des Genexpressionsmusters führen könnte und somit die PCR-Ergebnisse verfälschen würde (Vartanian et al. 2009). Stattdessen wurde eine Eliminierung der Globin-mRNA mit dem GLOBINclear™ Kit durchgeführt. Diese Methode basiert auf einer Hybridisierung der Globin-mRNA mit

biotinylierten Oligonukleotiden. Nach Hinzugabe von magnetischen Streptavidin-Beads werden die biotinylierten Oligonukleotide vom Streptavidin gebunden und durch einen Magneten separiert. Das Globin-mRNA-depletierte Blut wurde anschließend in ein neues, RNase-freies Tube überführt. Nach der Globinbereinigung ist davon auszugehen, dass ausschließlich leukozytäre RNA im Blut vorliegt. Nähere Angaben zur Versuchsdurchführung sind dem Herstellerprotokoll zu entnehmen.

Die weiteren Schritte erfolgten analog der Leber-RNA-Isolation im QIAcube™.

3.9 Spektrophotometrie

Die RNA-Konzentration wurde am NanoDrop™ 1000 spektrophotometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte anhand von 1 µl-Proben bei einer an die Konzentration angepassten Schichtdicke von einem Millimeter. Das Gerät zeichnet das Absorptionsspektrum der Probe über einen Wellenlängenbereich von 220 bis 350 nm auf. Nach dem Lambert-Beer Gesetz $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ wird die RNA-Konzentration (c) entsprechend der optischen Dichte bei 260 nm und dem Extinktionskoeffizienten (ϵ) von 40 L/(mol·cm) berechnet. Der Quotient aus der bei 260 und 230 nm Wellenlänge gemessenen Absorptionen (E) OD_{260}/OD_{230} gibt Aufschluss über niedermolekulare Verunreinigungen (Kohlenhydrate, Peptide) der RNA-Proben. Proteinverunreinigungen wurden über das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} bestimmt, da aromatische Aminosäuren Licht mit der Wellenlänge von 280 nm absorbieren. Es wurden nur Proben eingesetzt, die folgende Bedingungen erfüllten:

- OD_{260}/OD_{230} liegt zwischen 2,0 und 2,5
- $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,8$

3.10 Gelelektrophorese der RNA

Zur Bewertung der Integrität und Reinheit der isolierten RNA-Proben wurde eine Kapillar-Gelelektrophorese (*micro-fluidic capillary electrophoresis*) mit dem Experion™ Automated Electrophoresis System von Bio-Rad durchgeführt. Dies ist ein Gel-beladener Chip mit kleinen Einbuchtungen (Wells). Die Gel-gefüllten Wells werden jeweils mit den zu messenden RNA-Proben, einem Fluoreszenzfarbstoff sowie einer Leiterprobe beladen. Die kapillar-elektrophoretische Auftrennung der RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge

von 260 nm detektiert und mittels der Software ausgewertet. Für die genauen Anweisungen sei auf das Herstellerprotokoll verwiesen.

Die Dokumentation (Abb. 4) ergab zwei scharf begrenzte Banden, welche die 18S und 28S Untereinheiten der rRNA darstellen. Wenn diese sich als scharf begrenzt erweisen und keine weiteren Banden zu erkennen sind, ist davon auszugehen, dass die in diesem Verfahren nicht eindeutig darstellbare mRNA durch den Isolationsvorgang nicht degradiert wurde. Außerdem kann durch diese Qualitätskontrolle eine Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden.

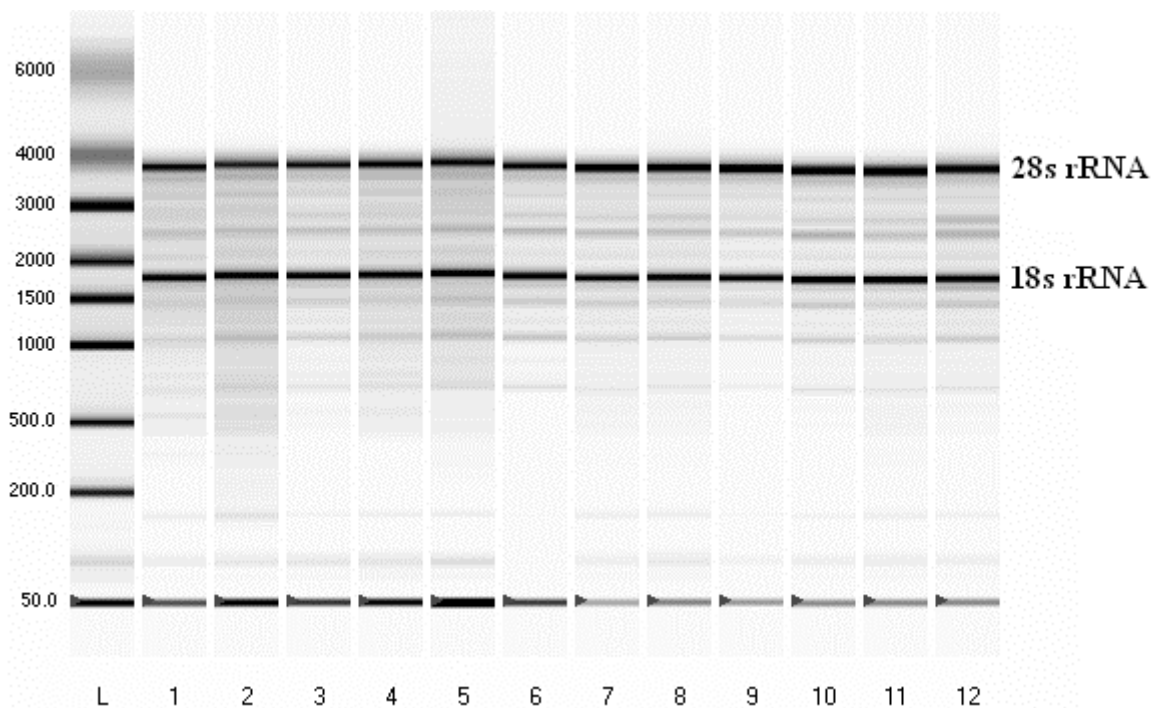


Abb. 4: Qualitätskontrolle der isolierten RNA durch Gelelektrophorese. Zwei prominente Banden stellen die 18S und 28S Untereinheiten der rRNA-Proben 1-12 dar. Die mRNA ist aufgrund ihrer geringen Nachweisgrenze nicht zu erkennen. Bei Intaktheit der beiden rRNA-Banden ist davon auszugehen, dass die mRNA während des Isolationsvorgangs ebenfalls keinen Schaden genommen hat. Beschriftung links in bp (Basenpaaren). L, Leiter.

3.11 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas durchgeführt. Um vergleichbare Resultate zu erreichen, wurde nach der spektroskopischen Konzentrationsbestimmung im Fall der Leber-RNA 2000 ng, im Fall der Leukozyten-RNA 600 ng mit RNase-freiem Wasser auf 9,9 µl verdünnt.

Der Versuchsansatz für den Präinkubationsmix in tabellarischer Form:

RNA	9,80 µl
Oligo (dT) ₁₈ (Primermix)	1,20 µl
Random Hexamer (Primer)	1,00 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	12,00 µl

Im Peltier Thermal Cycler erfolgte die Denaturierung bei 65°C für 5 min mit anschließender Abkühlung bei 4°C für 2 min.

Der folgende Maininkubationsmix wurde vor dem Starten der reversen Transkription zu den 12 µl Präinkubationsmix hinzugegeben:

5x Reaction Buffer	4,00 µl
dNTP (10 mM)	2,00 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 u/µl)	1,00 µl
Revert Aid RT (200 u/µl)	1,00 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	8,00 µl

Für die reverse Transkription wurden die Tubes mit einem Gesamtvolumen von jeweils 20 µl im Peltier Thermal Cycler nach folgenden Einstellungen inkubiert:

- 25°C 5 min
- 42°C 60 min (Primeranlagerung und Extension)
- 70°C 5 min (Denaturierung)
- 4°C

Im Anschluss wurde die synthetisierte cDNA auf 5 ng/µl (Leber) bzw. 4 ng/µl (Leukozyten) verdünnt.

3.12 Primeretablierung

Im Vorfeld der Experimente ist es notwendig, die einzusetzenden Primer zu etablieren, damit die aus der Real-Time-PCR gewonnenen Daten auch aussagekräftig sind. Hierzu wurde in einer Genomdatenbank (pubmed) die Transkriptsequenz ermittelt und mittels eines Primerdesignprogramms die entsprechenden Primer erzeugt. Die Primererstellung erfolgte nach den folgenden Kriterien:

- resultierendes Transkript < 200 bp
- Forward- und Reverseprimer binden in zwei verschiedenen Exons
- Schmelztemperatur $60 \pm 0,5^\circ\text{C}$
- Primerlänge 19-23 bp
- Längendifferenz zwischen Forward- und Reverseprimer ≤ 2 pb
- GC-Gehalt 45-70 %
- keine homologen Sequenzen innerhalb der Primer, um Primerdimere zu vermeiden
- Primer sollte möglichst wenig Hairpinstrukturen bilden, mit wenig beteiligten Nukleotiden und niedriger Schmelztemperatur T_M (bis maximal 40°C)
- Abgleich der Primersequenz in einer Genomdatenbank, um Co-Amplifikate ausschließen zu können (BLAST)

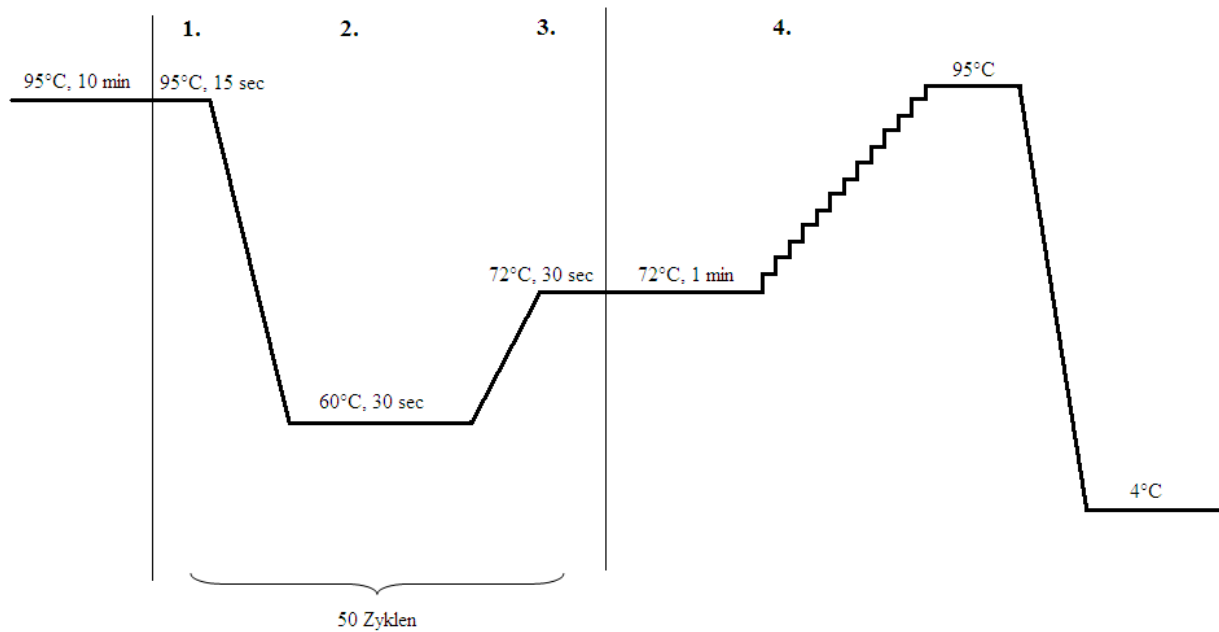
3.13 Quantitative PCR

Für die qPCR wurde der Rotor-Gene rotary analyzer von Corbett Life Science verwendet, einem Gerät das Thermocycler und Fluorimeter zugleich ist. Die Messung der Amplifikate findet noch während des Messens statt (daher *Real-Time*, d.h. in Echtzeit). Die Detektion erfolgt durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green, der, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden ist, bei einer Wellenlänge von 490 nm fluoresziert.

Pro Probe wurde ein Reaktionsvolumen von 20 μl eingesetzt.

cDNA (4/5 ng/ μl)	5 μl
Primer-Mix (fw- und rv-Primer; 2 μM)	5 μl
2x Brilliant [®] II SYBR [®] Green Q PCR Master Mix	10 μl
<hr/> Gesamtvolumen	<hr/> 20 μl

Folgendes PCR-Schema wurde verwendet (Abb. 5):



- 1= Denaturierung
- 2= Annealing (Anlagerung der Primer an die DNA)
- 3= Elongation (DNA-Amplifizierung)
- 4= Ermitteln der Schmelztemperatur

Abb. 5: Zeitlicher Ablauf der dreistufigen Real-Time-PCR (1-3) und anschließende Ermittlung der Schmelzkurve (4)

3.14 Auswertung der quantitativen PCR

3.14.1 Schmelzkurvenanalyse

Da der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green unspezifisch für doppelsträngige DNA ist und somit auch Primer-Dimere sowie nichtspezifische PCR-Produkte bindet, wurde die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Mit dieser Methode kann sichergestellt werden, dass nur ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde. Sie beruht darauf, dass jedes PCR-Produkt in Abhängigkeit seiner Länge sowie seines GC-Gehalts bei einer bestimmten Temperatur schmilzt (denaturiert). Dazu wurden die Proben schrittweise von 72°C bis auf 95°C erhitzt, so dass die doppelsträngige DNA wieder denaturiert und als Einzelstrang vorliegt. Diese Denaturierung des PCR-Produkts hat einen starken Abfall des Fluoreszenzsignals zur Folge, da der Fluoreszenzfarbstoff nur bei Bindung an doppelsträngige DNA fluoresziert. Der Punkt, an dem das Fluoreszenzsignal abfällt, nennt man Schmelztemperatur T_m . Da diese charakteristisch für das entstandene PCR-Produkt ist, kann durch die Schmelzkurvenanalyse auf das vervielfältigte Produkt geschlossen werden. Jedes PCR-Produkt wurde mit dieser Methode analysiert und wich maximal um 0,5°C voneinander ab.

3.14.2 Normierung

Die PCR-Ergebnisse wurden zur Auswertung auf das Referenzgen (*housekeeper*) ACTB bezogen und normiert. ACTB wurde mittels der geNorm Software, welche auf dem mathematischen Prinzip von Vandesompele et al. basiert (Vandesompele et al. 2002), auf seine Stabilität bzw. Varianz geprüft und erwies sich als das stabilste Gen.

3.14.3 Auswertung der PCR-Daten

Die Auswertung der PCR erfolgte über die Fluoreszenzdaten während der linearen Amplifikationsphase, in der die Intensität des Fluoreszenzsignals proportional zur Menge des vervielfältigten Produkts ist. Zur Auswertung benutzt man den sog. C_t -Wert (*threshold cycle*). Der C_t -Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Produkt-Fluoreszenz über das Grundrauschen (auch Hintergrundrauschen genannt) zu verzeichnen ist. Zur mathematischen Auswertung wurde die Software qBasePlus von Biogazelle verwendet, welche auf der PCR-Analyse von Hellemans beruht (Hellemans et al. 2007). qBasePlus

transformiert die C_T -Mittelwerte unter Einbeziehung der PCR-Amplifikationseffizienz (E) in relative Quantitäten (RQ). Diese werden auf das Referenzgen ACTB normiert, wodurch man sog. skalierte normalisierte relative Quantitäten (CNRQ) erhält, die statistisch ausgewertet und als Boxplots dargestellt wurden.

3.15 Statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der SPSS Software Version 17.0 durchgeführt. Für den Vergleich der transmigrierten Leukozyten zwischen Wildtyp- und SMase-defizienten Mäusen sechs Stunden nach PCI wurde der nichtparametrische, exakte Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Bakterienlasten (*cfu/colony forming units*) zwischen jenen beiden Gruppen wurden gleichfalls anhand des exakten Mann-Whitney-U-Tests miteinander verglichen. Zum Vergleich der relativen Genexpressionen wurde der zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Testergebnisse wurden auf einem Niveau von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Das jeweilige Signifikanzniveau wurde in den Grafiken mit folgender Symbolik abgebildet:

- $p < 0,05$: *
- $p < 0,01$: **
- $p < 0,001$: ***

Die grafische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Software Origin 8. Dabei wurden die Ergebnisse in Form von *boxplots* dargestellt:

- Die *boxplots* umfassen den Wertebereich von der ersten Quartile ($Q_{25\%}$) bis zur dritten Quartile ($Q_{75\%}$).
- Die waagerechte Linie innerhalb der *boxplots* kennzeichnet den Median.
- Das ausgefüllte Quadrat repräsentiert den Mittelwert.
- Die *whiskers* umfassen den Wertebereich von der 10. bis zur 90. Perzentile.
- Kreuze außerhalb der *whiskers* kennzeichnen Werteausreißer definiert als:
 - x_i ist Ausreißer nach unten, wenn $Q_{25\%} - x_i \geq 1,5 \cdot (Q_{75\%} - Q_{25\%})$
 - x_i ist Ausreißer nach oben, wenn $x_i - Q_{75\%} \geq 1,5 \cdot (Q_{75\%} - Q_{25\%})$

4 Ergebnisse

4.1 Die saure Sphingomyelinase beeinflusst die Leukozytentransmigration in das Parenchym der Leber

Die in Abb. 6 dargestellte Auszählung der eingewanderten Leukozyten, vorrangig der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs), ergab zwischen den gesunden (sham) und den PCI-induzierten, sechs Stunden-septischen Tieren (PCI) für beide Gruppen jeweils eine statistisch signifikante Erhöhung (WT sham: $12,7 \pm 9,0$ vs. WT PCI 6h: $208,0 \pm 36,0$; $p < 0,02$; KO sham: $11,0 \pm 2,7$ vs. KO PCI 6h: $156,8 \pm 39,0$; $p < 0,02$, Abb. 6). Vergleicht man Wildtyp- mit SMase-defizienten Tieren sechs Stunden post PCI, so zeigen die defizienten Tiere eine geringere Anzahl eingewanderter Leukozyten (WT PCI 6h: $208,0 \pm 36,0$ vs. KO PCI 6h: $156,8 \pm 39,0$; $p < 0,04$, Abb. 6).

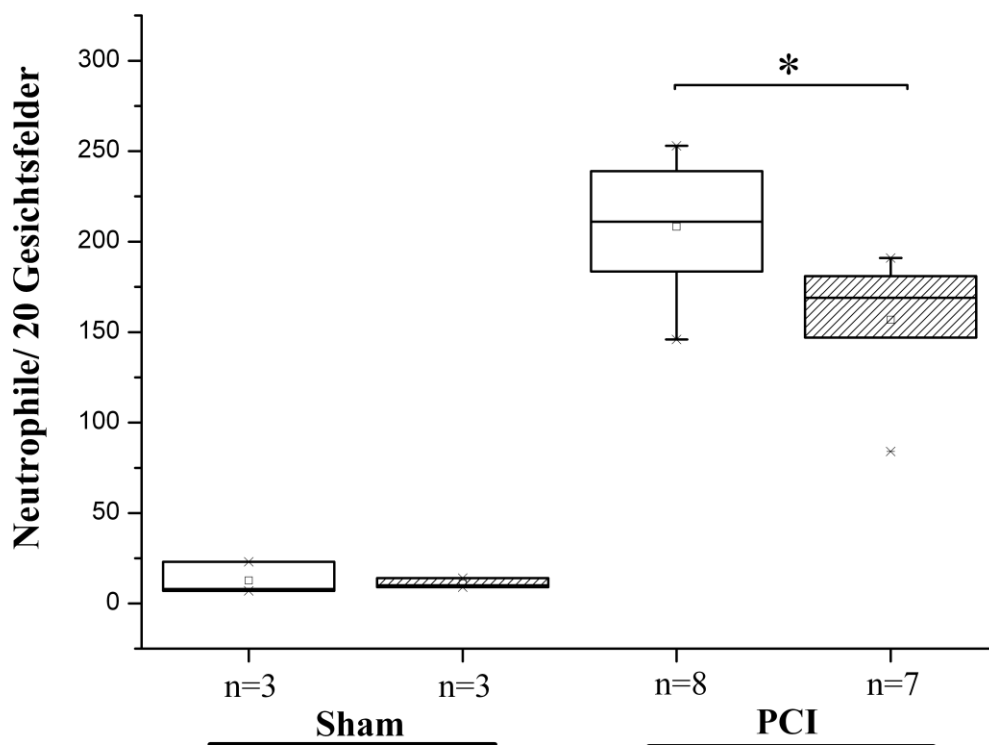


Abb. 6: Vergleich der Anzahl der transendothelial migrierten neutrophilen Granulozyten im Leberparenchym zwischen gesunden (sham) Wildtyp- (unschraffierte Box) und SMase-Knock-Out-Tieren (schrattierte Box) sowie kranken Wildtyp- und Knock-Out-Tieren sechs Stunden nach PCI. Diese Art der Darstellung wurde in den folgenden Grafiken beibehalten (Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,04$).

4.2 Die kompartimentspezifische Bakterienlast nach polymikrobieller Faecesinjektion wird durch die SMase beeinflusst

Sechs Stunden nach intraperitonealer Faecesinjektion wiesen die SMase-defizienten Tiere gegenüber den Wildtyporganismen signifikant höhere *cfu*-Ergebnisse im Blut sowohl bei den unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen kultivierten Bakterien auf (aerob: WT: $313,8 \pm 284,4$ vs. KO: $423,8 \pm 158,2$; $p < 0,05$; anaerob: WT: $555,2 \pm 76,9$ vs. KO: $630,8 \pm 85,4$; $p < 0,05$, Abb. 7).

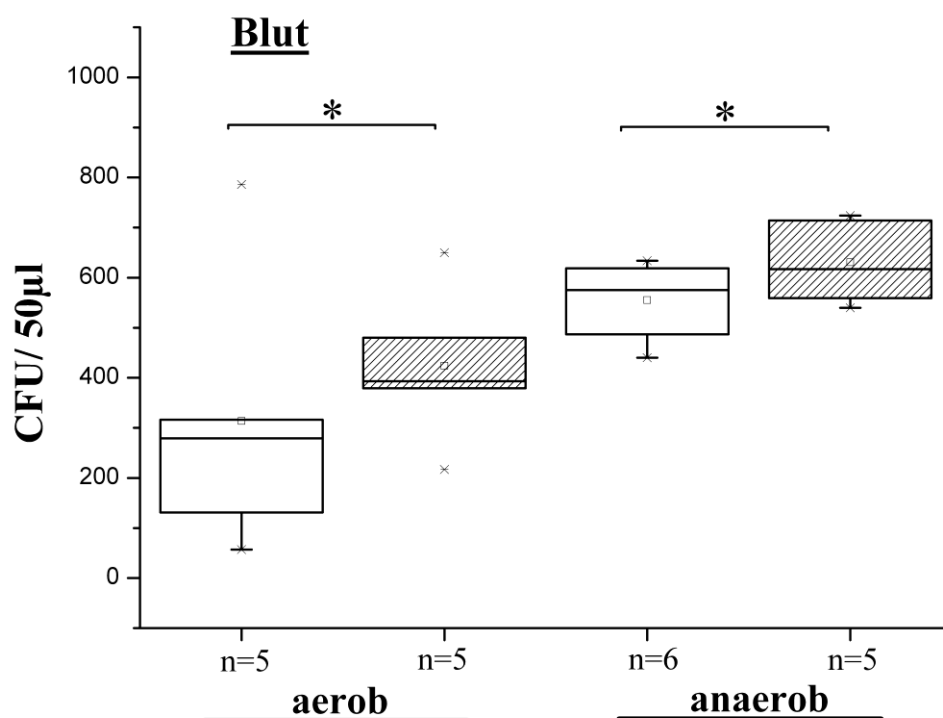


Abb. 7: Die Rolle der SMase bei der Entwicklung einer Bakteriämie. Die Bakterienlast wird als *cfu* pro 50µl eingesetzter Blutlösung angegeben und zwischen Wildtyp- (unschraffierte Box) und SMase-defizienten Tieren (schraffierte Box) unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen verglichen. Die verwendeten Blutproben wurden für 48 Stunden kultiviert. Für zwei gesunde Wildtypkontrollen wurden *cfu*-Werte von < 10 ermittelt (Mann-Whitney-U-Test; aerob: $p < 0,05$; anaerob: $p < 0,05$).

Die Betrachtung der bakteriellen Besiedlung der Leber sechs Stunden nach PCI spiegelt nur für die unter anaeroben Bedingungen kultivierten Bakterienstämme das Ergebnis der Blutanalyse wieder. Die Anzahl der unter aeroben Konditionen angezüchteten *cfu* ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und SMase-defizienten Tieren (aerob: WT: $8 \pm 5,7$ vs. KO: $21 \pm 9,6$; $p < 0,06$; anaerob: WT: $173 \pm 112,1$ vs. KO: $501 \pm 277,3$; $p < 0,05$, Abb. 8).

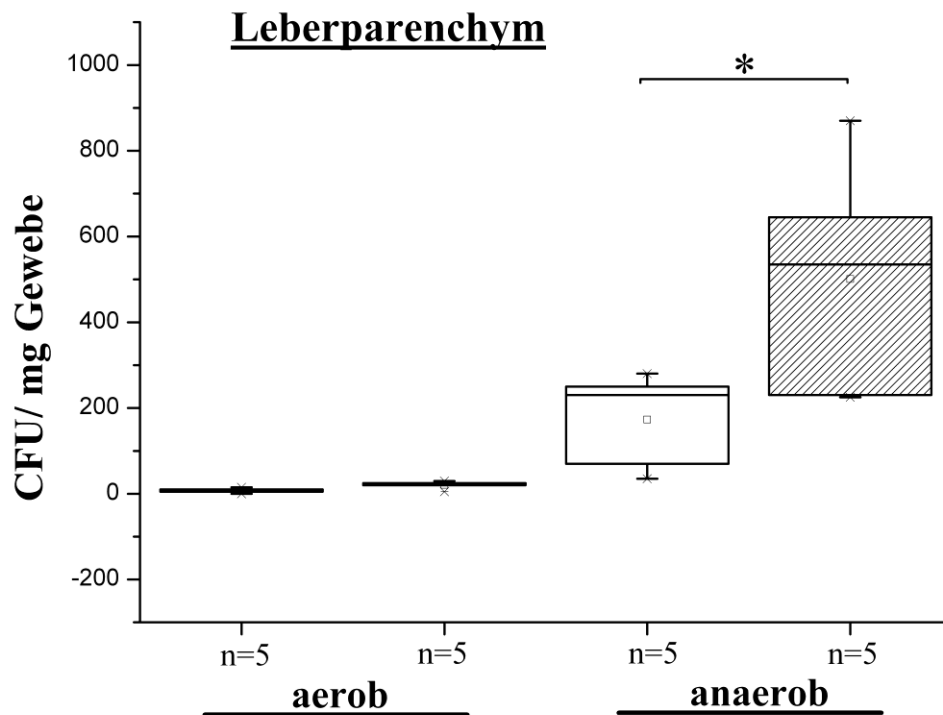


Abb. 8: Der Einfluss der SMase auf die hepatische Bakterienlast verglichen zwischen Wildtyp- (unshraffierte Box) und SMase-defizienten Tieren (schraffiert). Die Bakterienlast wird als *cfu* pro mg verwendetem Lebergewebe angegeben. Das Lebergewebehomogenisat wurde 48 Stunden sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Zwei gesunde Wildtyp-Negativkontrollen zeigten *cfu*-Werte <10 (Mann-Whitney-U-Test; aerob: $p < 0,06$; anaerob: $p < 0,05$).

4.3 Der Einfluss der sauren Sphingomyelinase auf die Expression Chemotaxis und Diapedese relevanter Gene in Leukozyten und Hepatozyten bei Sepsis

4.3.1 Die Genexpression der GTP-bindenden Proteine Arl3 und Arl5a in Leukozyten und Hepatozyten wird durch die SMase beeinflusst

Im Vergleich der Leukozyten lagen sowohl die Arl3- als auch die Arl5a-Genexpressionen der SMase-KO-Tiere statistisch signifikant über jenen der Wildtypiere sechs Stunden nach PCI (Arl3: WT: $0,49 \pm 0,14$ vs. SMase-KO: $1,09 \pm 0,26$; $p < 0,001$; Abb. 9, Arl5a: WT: $0,52 \pm 0,14$ vs. SMase-KO: $1,2 \pm 0,3$; $p < 0,001$, Abb. 11).

In den Hepatozyten zeigten die Expressionen beider Gene ein umgekehrtes Verhältnis. Hier war die Expression der SMase-KO-Tiere statistisch signifikant gegenüber den Wildtypieren sechs Stunden nach PCI vermindert (Arl3: WT: $1,02 \pm 0,33$ vs. SMase-KO: $0,49 \pm 0,13$; $p < 0,001$; Abb. 10, Arl5a: WT: $1,19 \pm 0,71$ vs. SMase-KO: $0,48 \pm 0,08$; $p < 0,01$, Abb. 12).

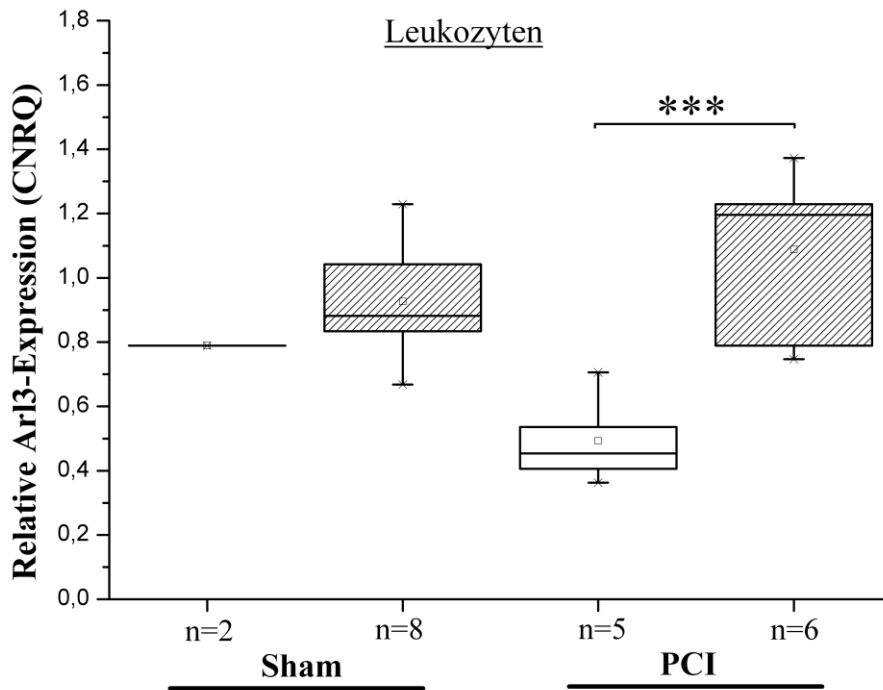


Abb. 9: Vergleich der Arl3-Expression zwischen Wildtyp- (unschraffiert) und SMase-defizienten Tieren (schraffiert) sechs Stunden nach PCI in Leukozyten (t-Test, $p < 0,001$).

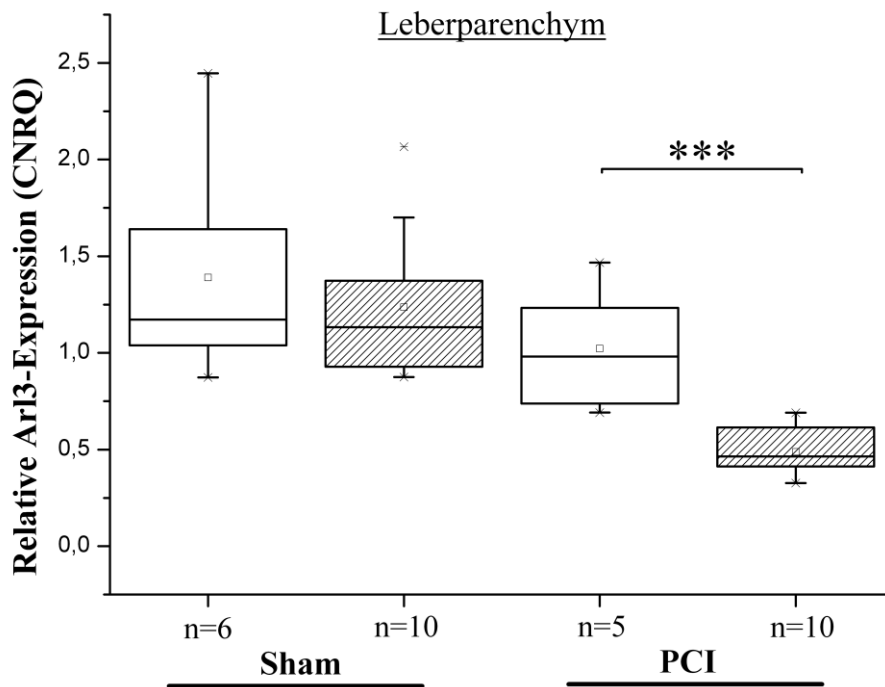


Abb. 10: Vergleich der Arl3-Expression zwischen Wildtyp- (unschraffiert) und SMase-defizienten Tieren (schraffiert) sechs Stunden nach PCI in Hepatozyten (t-Test, $p < 0,001$).

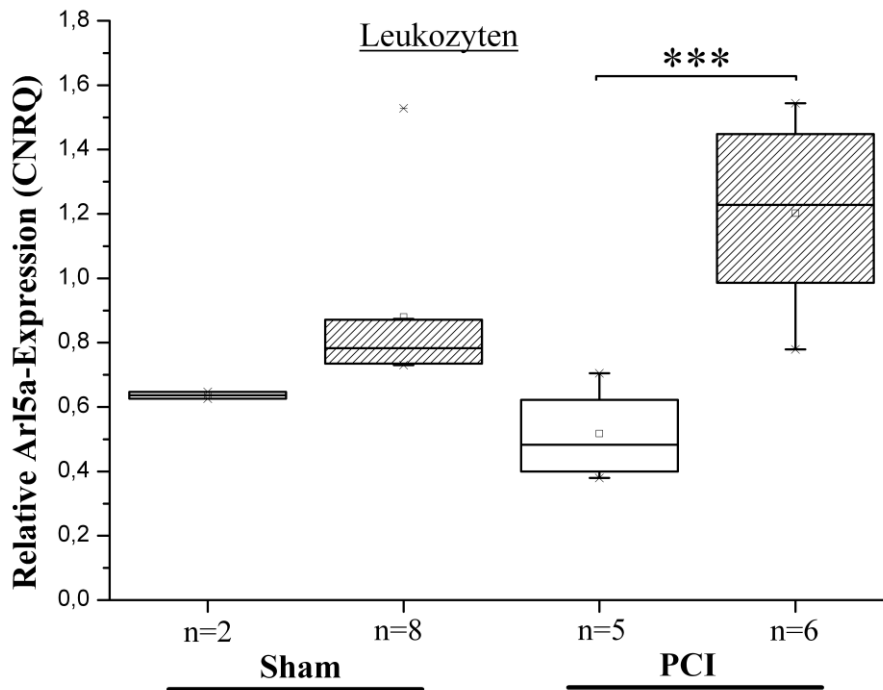


Abb. 11: Vergleich der Arl5a-Expression zwischen Wildtyp- (unschraffiert) und SMase-defizienten Tieren (schraffiert) sechs Stunden nach PCI in Leukozyten (t-Test, $p < 0,001$).

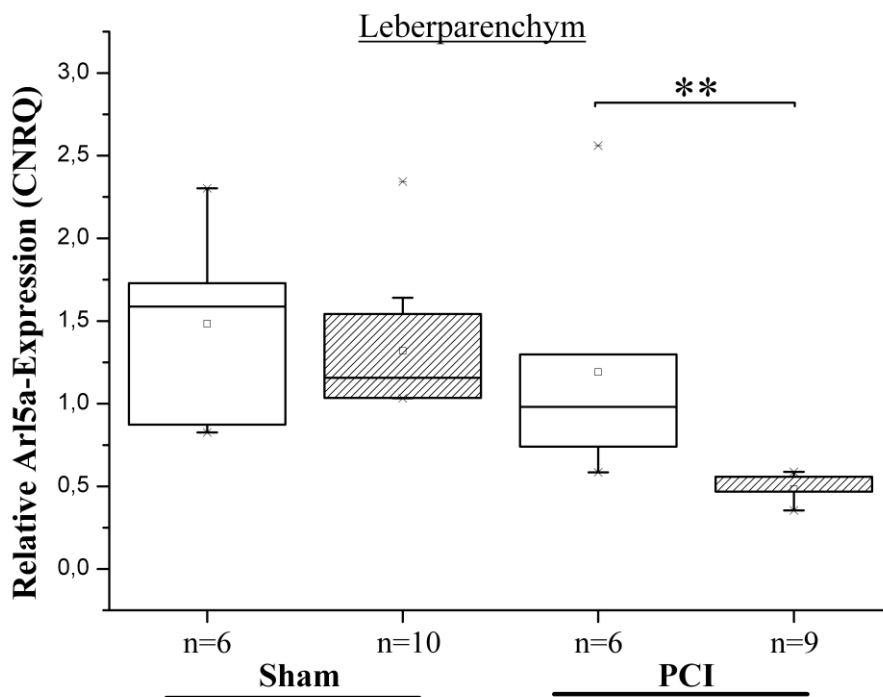


Abb. 12: Vergleich der Arl5a-Expression zwischen Wildtyp- (unschraffiert) und SMase-defizienten Tieren (schraffiert) sechs Stunden nach PCI in Hepatozyten (t-Test, $p < 0,01$).

4.3.2 Die Genexpression von Esm-1 in Leukozyten wird durch die SMase beeinflusst

Unter septischen Verhältnissen (sechs Stunden post PCI) wurde eine starke Hochregulierung des Esm-1-Gens in Leukozyten der SMase-KO-Tiere gegenüber den Wildtyptieren deutlich (WT: $0,66 \pm 0,22$ vs. SMase-KO: $1,84 \pm 0,27$; $p < 0,001$, Abb. 13).

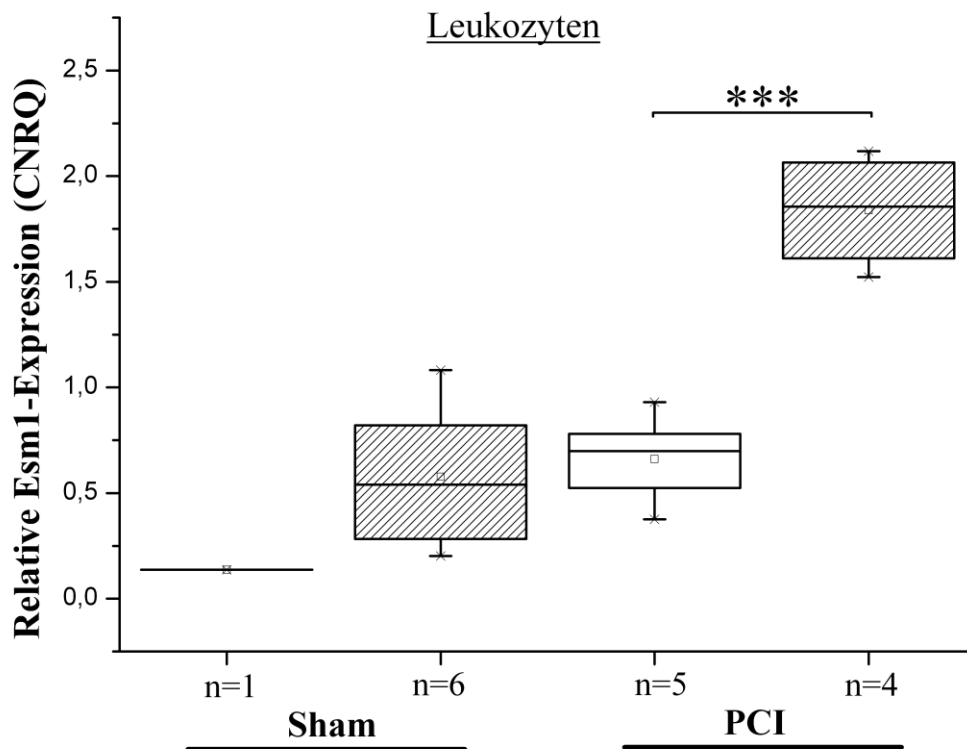


Abb. 13: Vergleich der leukozytären Esm-1-Expression zwischen Wildtyp- (unschraffiert) und SMase-defizienten Tieren (schraffiert) sechs Stunden nach PCI (t-Test, $p < 0,001$).

4.3.3 Die Genexpressionen der chemotaktischen Zytokine Cxcl2 und Cxcl9 in Leukozyten werden durch die SMase beeinflusst

Vergleicht man die Expression von Cxcl9 in Wildtyp- und SMase-defizienten Tieren in Leukozyten sechs Stunden nach PCI, so ist bei Letzteren eine statistisch signifikante Erhöhung auffallend (WT: $3,2 \pm 4,23$ vs. SMase-KO: $90,43 \pm 51,91$; $p < 0,01$, Abb. 14).

Die Cxcl2-Expression ist in den SMase-KO-Tieren ebenfalls erhöht, jedoch nicht statistisch signifikant (WT: $10,75 \pm 7,61$ vs. SMase-KO: $17,61 \pm 7,86$; $p < 0,2$, Abb. 15).

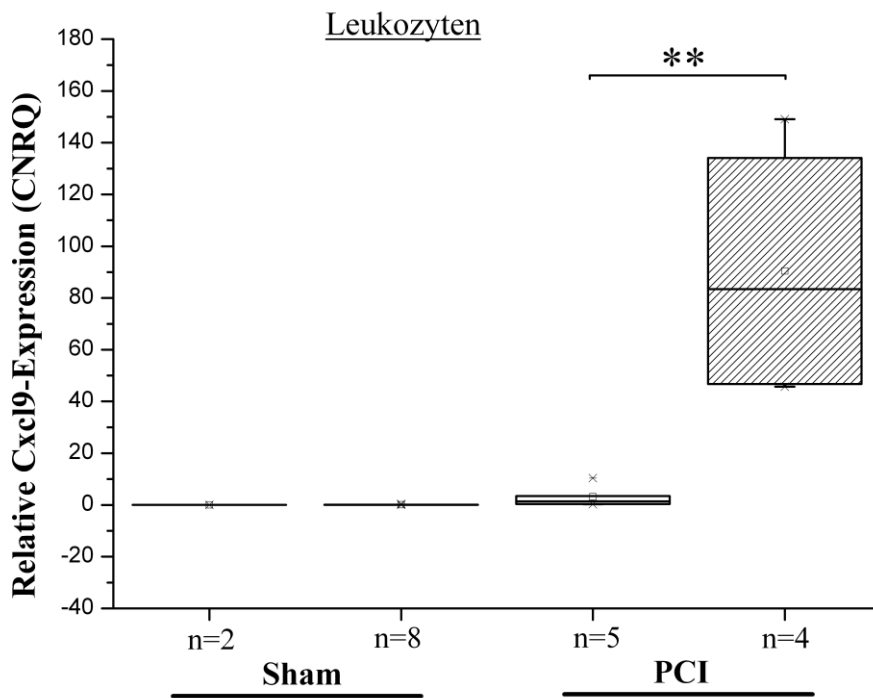


Abb. 14: Vergleich der leukozytären Expression von Cxcl9 zwischen Wildtyp- (unschraffiert) und SMase-defizienten Tieren (schraffiert) sechs Stunden nach PCI (t-Test, $p < 0,01$).

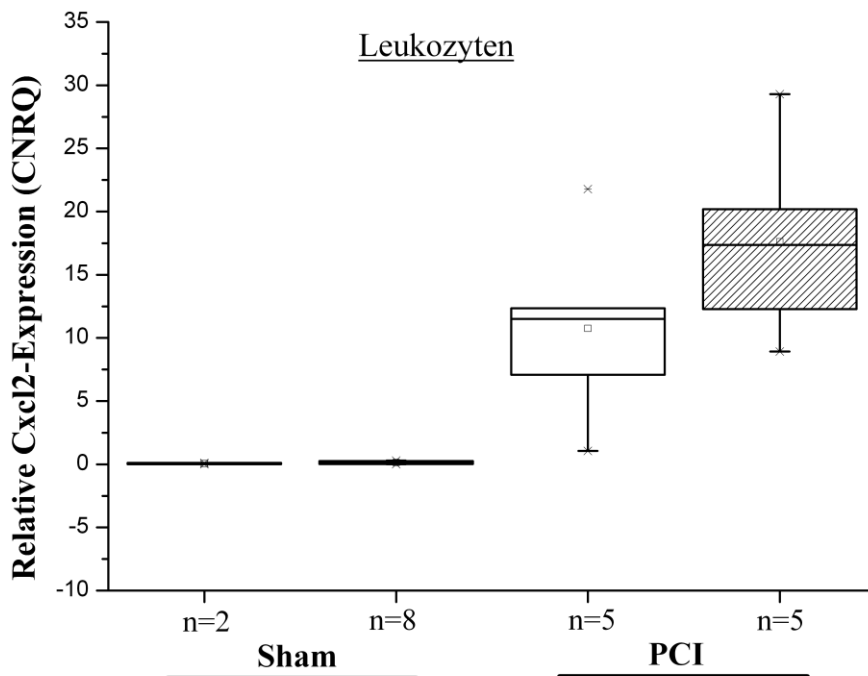


Abb. 15: Vergleich der leukozytären Expression von Cxcl2 zwischen Wildtyp- (unschraffiert) und SMase-defizienten Tieren (schraffiert) sechs Stunden nach PCI (t-Test, $p < 0,2$).

Sowohl in der Gruppe der Wildtyptiere als auch in der der SMase-defizienten Tiere, war sechs Stunden nach i.p.-Faecesinjektion ein signifikanter Anstieg der hepatozytären Cxcl2-Expression zu beobachten (WT sham: $0,12 \pm 0,08$ vs. WT PCI 6h: $12,25 \pm 5,82$; $p < 0,001$; KO sham: $0,29 \pm 0,29$ vs. KO PCI 6h: $12,09 \pm 6,95$; $p < 0,001$, Abb. 16).

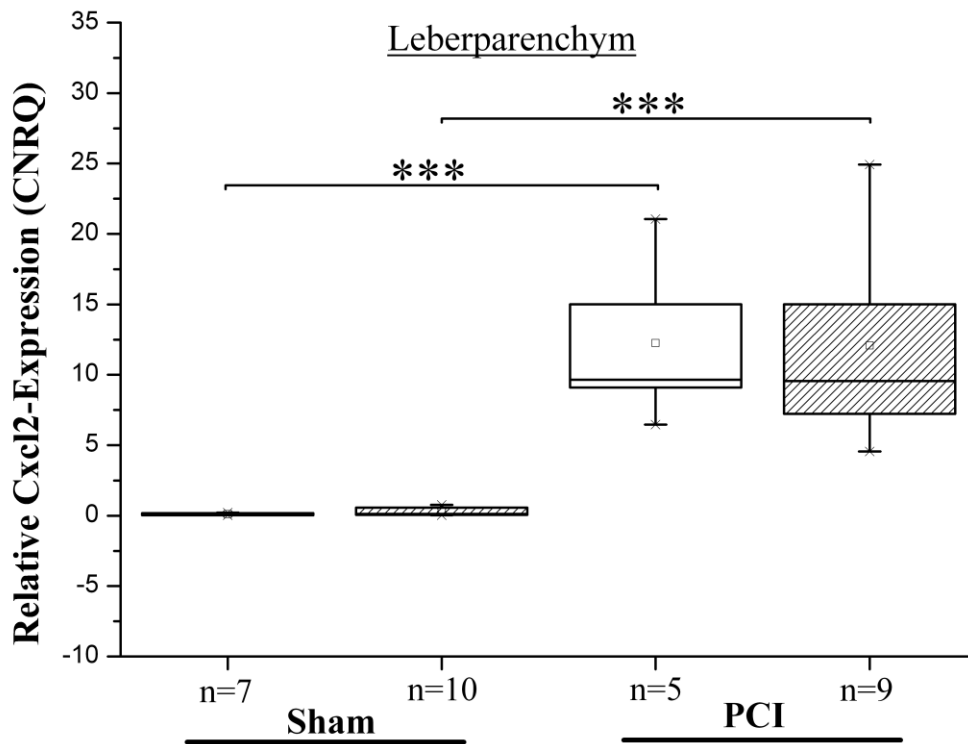


Abb. 16: Vergleich der hepatozytären Expression von Cxcl2 zwischen gesunden (sham) Wildtyp- (unschraffiert) und SMase-defizienten Tieren (schraffiert) mit den Mäusen sechs Stunden nach PCI (t-Test, Wildtyp: $p < 0,001$; Knock-Out: $p < 0,001$).

4.3.4 Die Genexpression der Protease Lactotransferrin (Ltf) in Leukozyten wird durch die SMase beeinflusst

Verglichen mit den septischen Wildtyptieren zeigte sich eine statistisch signifikante Hochregulierung des Ltf-Gens in den Leukozyten der SMase-KO-Tiere sechs Stunden nach PCI (WT: $9,95 \pm 2,81$ vs. SMase-KO: $6,19 \pm 0,87$; $p < 0,05$, Abb. 17).

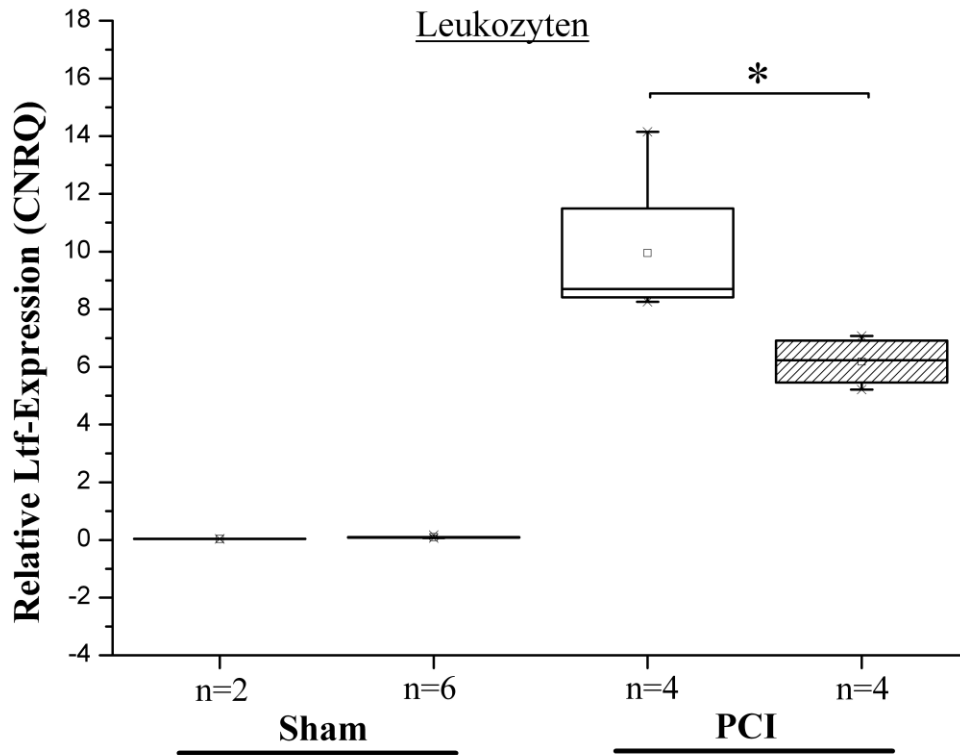


Abb. 17: Vergleich der leukozytären Ltf-Expression zwischen Wildtyp- (unschraffiert) und SMase-defizienten Tieren (schraffiert) sechs Stunden nach PCI (t-Test, $p < 0,05$).

4.3.5 Die Genexpression von Ifrd1 in Leukozyten wird durch die SMase beeinflusst

Sechs Stunden nach PCI ist die Expression des Ifrd1-Gens in den Leukozyten der SMase-KO-Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren statistisch signifikant erhöht (WT: $0,92 \pm 0,32$ vs. SMase-KO: $2,96 \pm 1,33$; $p < 0,01$, Abb. 18).

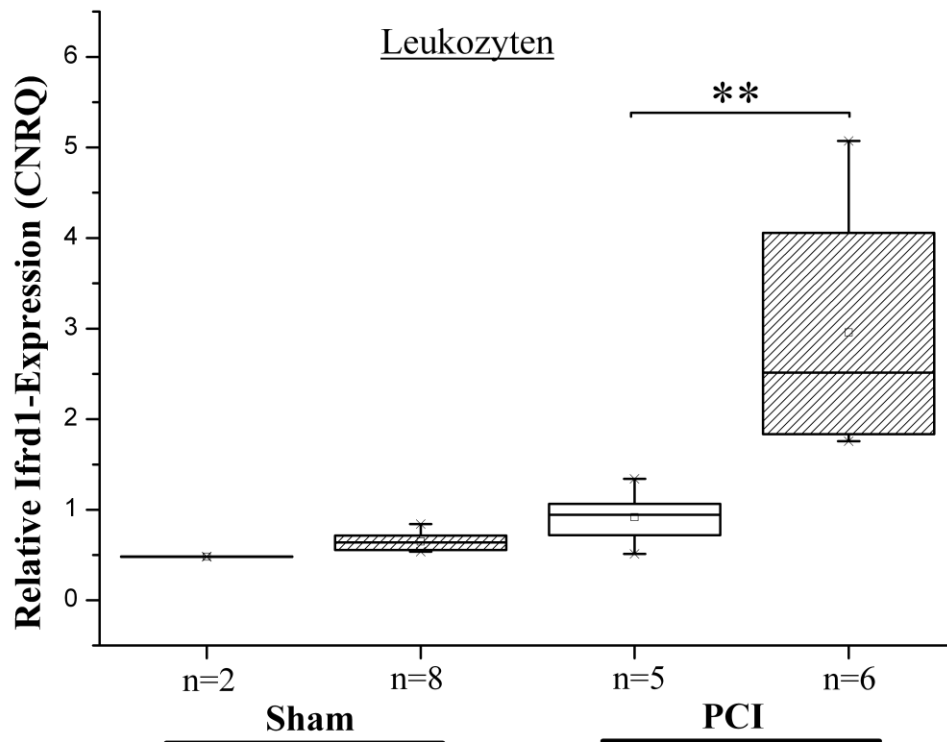


Abb. 18: Vergleich der leukozytären Ifrd1-Expression zwischen Wildtyp- (unschraffiert) und SMase-defizienten Tieren (schraffiert) sechs Stunden nach PCI (t-Test, $p < 0,01$).

4.3.6 Die Genexpression von Rnd1 in Leukozyten und Hepatozyten wird durch die SMase beeinflusst

Die Analyse der Rnd1-Expression sechs Stunden nach Faecesinjektion ergab sowohl in den zirkulierenden Leukozyten (WT: $2,37 \pm 0,76$ vs. SMase-KO: $12,25 \pm 3,36$; $p < 0,001$, Abb. 19) als auch im Lebergewebe der SMase-KO-Tiere eine signifikante Erhöhung gegenüber den Wildtyp-Tieren (WT: $1,69 \pm 0,91$ vs. SMase-KO: $4,92 \pm 2,9$; $p < 0,04$, Abb. 20).

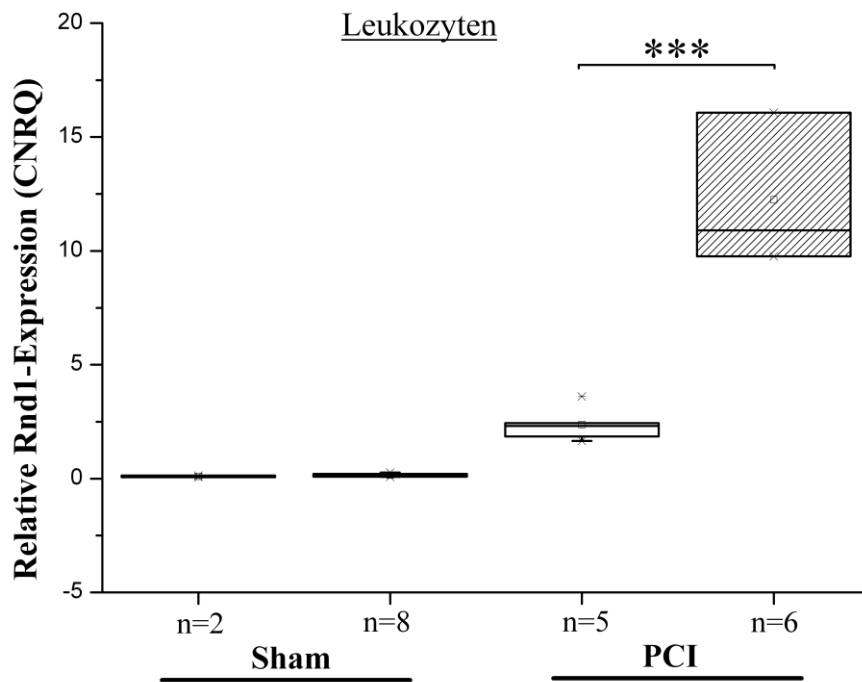


Abb. 19: Vergleich der leukozytären Rnd1-Expression zwischen Wildtyp- (unschraffiert) und SMase-defizienten Tieren (schraffiert) sechs Stunden nach PCI (t-Test, $p < 0,001$).

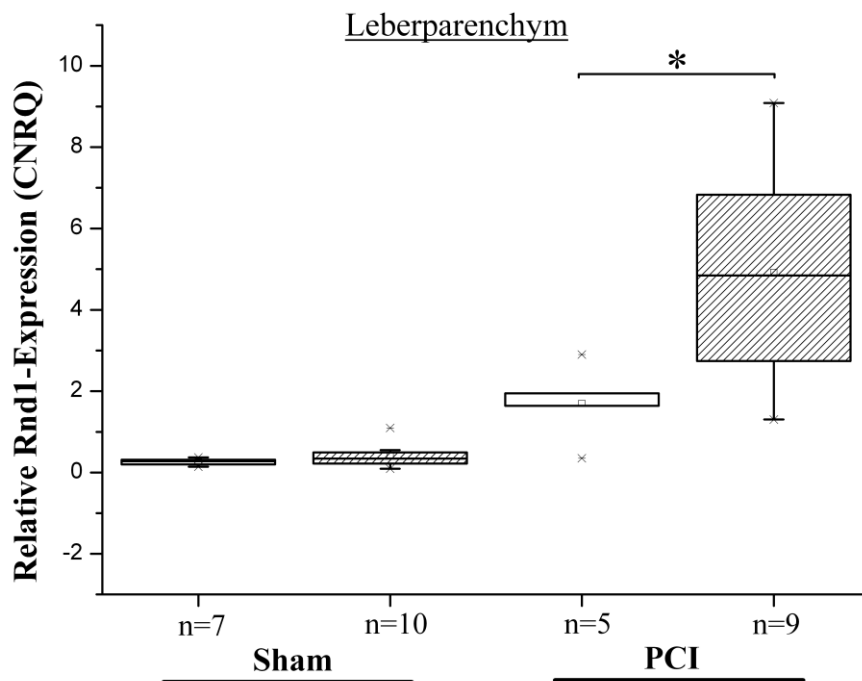


Abb. 20: Vergleich der hepatozytären Rnd1-Expression zwischen Wildtyp- (unschraffiert) und SMase-defizienten Tieren (schraffiert) sechs Stunden nach PCI (t-Test, $p < 0,04$).

5 Diskussion

„Ein zweischneidiges Schwert“ - diese Bezeichnung findet man immer wieder, wenn über die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Pathogenese der Sepsis gesprochen wird. Sie sind zum einen unabdingbar für die lokale Eindämmung eines eingedrungenen Erregers und zur Verhütung der Generalisierung einer Infektion, d.h. des bakteriellen Ausbreitens im Organismus. Zum anderen jedoch sind Neutrophile im Kontext einer systemischen Immunantwort (SIRS) maßgeblich an der Ausbildung eines Multiorganversagens (*MOF*) beteiligt (Hotchkiss und Karl 2003). Kommt es im Rahmen der Sepsis bzw. des Systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) zum Versagen von einem oder mehreren Organen, so verschlechtert sich die Prognose dramatisch. Ein entscheidendes Organ ist die Leber. Sie ist das zentrale Organ des Stoffwechsels, metabolisiert diverse Stoffwechselprodukte (u.a. Ammoniak, Hämoglobin) und synthetisiert Fibrinogen sowie andere wichtige Gerinnungsfaktoren, deren Mangel durch die Verbrauchskoagulopathie/disseminierte intravasale Gerinnung (*DIC*) bei Sepsis zu lebensbedrohlichen Organeinblutungen und Ödemen führen kann. Wird die Leber durch eine systemische Inflammation geschädigt, können die Gerinnungsfaktoren nicht mehr nachsynthetisiert werden, was die Folgen der *DIC* noch potenziert. Des Weiteren wird die hepatische Filtrationsfunktion schließlich verloren gehen mit der Konsequenz, dass Endotoxine und Zytokine in erhöhter Konzentration in den Systemkreislauf gelangen, die normalerweise in der Leber abgebaut werden und folglich zur Persistenz oder gar Verschlimmerung der Wirtsantwort führen. Auch als Organ der Immunantwort ist die Leber von Bedeutung. So können Kupfferzellen als gewebständige Makrophagen der Lebersinusoide, welche 80-90 % der Gewebsmakrophagen des Körpers darstellen, Bakterien und Endotoxine im Zuge einer systemischen Infektion phagozytieren (Gregory und Wing 2002). Somit kommt der Leber beim Systemischen inflammatorischen Response-Syndrom eine wichtige Rolle zu, deren Aufrechterhaltung in der Therapie der Sepsis von großem Interesse sein muss.

Als Ursache für das Leberversagen bei Sepsis werden zahlreiche Pathomechanismen teilweise kontrovers diskutiert. Zum einen kommt es durch die Aktivierung des Komplementsystems und der Thrombozyten zu Mikroperfusionsstörungen in den Lebergefäßen (Croner et al. 2006) mit konsekutiver Gewebshypoxie. Außerdem setzen Kupfferzellen proinflammatorische Zytokine frei, wie z.B. TNF-alpha, IL-6 und IL-1-beta sowie reaktive Sauerstoffspezies (*ROS*), welche indirekt wirksam die Inflammation aufrechterhalten bzw.

direkt die Hepatozyten schädigen (Ring und Stremmel 2000). Auch neutrophile Granulozyten spielen bei der Leberschädigung eine große Rolle. Sie reagieren auf chemotaktische Reize durch Kupfferzellen, geschädigtes Leberparenchym und Endotoxine mit anschließender Akkumulation in den Lebersinusoiden und verstärkter Leukozytenadhäsion am Endothel. Durch die Expression von Zelladhäsionsmolekülen (*CAM/ICAM*) auf Endothelzellen bzw. Hepatozyten transmigrieren die Granulozyten ins Parenchym und können durch Mediatorenfreisetzung zum Leberversagen führen (Reddy und Standiford 2010) sowie durch Chemokinfreisetzung weitere Leukozyten rekrutieren. Schon Molnar et al. konnten in einem Tiermodell für polymikrobielle Sepsis zeigen, dass neutropenische Tiere weniger hepatozelluläre Dysfunktion aufwiesen (Molnar et al. 1997). In einer aktuellen Publikation ist eine positive Korrelation der Anzahl transmigrierter Leukozyten mit der hepatozellulären Apoptoserate aufgezeigt (Traeger et al. 2010).

Somit ist die Leukozytentransmigration ein Schlüsselphänomen der Leberschädigung und der Apoptoseinduktion bei Sepsis. Da die Transmigration durch Zelladhäsionsvorgänge und Signalübertragungen über die Zellmembran vonstatten geht, ist die Leukozytenantwort kombiniert mit dem Sphingomyelinmetabolismus betrachtet eine interessante Fragestellung. Denn unlängst ist bekannt, dass Sphingomyelin und seine Metabolite durch die Bildung von besonderen Membrandomänen, den ceramidreichen Makrodomänen, eine zentrale Rolle bei transmembranösen Signaltransduktionskaskaden spielen.

Tatsächlich ergaben die Ergebnisse einen Einfluss der SMase bzw. deren Metabolite auf die transendotheliale Migration neutrophiler Granulozyten in das Leberparenchym im Rahmen der Immunreaktion bei Sepsis. Weiterhin wurde deutlich, dass die SMase hierbei auf die Expression solcher Gene Einfluss nimmt, die für Proteine codieren, welche im Zusammenhang mit der Pathogenabwehr, d.h. Chemotaxis, Transmigration und Phagozytoseaktivität, der Leukozyten stehen.

Schon einige Studien konnten nachweisen, dass die Metabolite des Sphingomyelinstoffwechsels eine entscheidende Rolle bei der zellulären Stressantwort und der systemischen Inflammationsreaktion spielen (Mathias et al. 1998, Wong et al. 2000). So konnte bei akuter und chronischer Inflammation gezeigt werden, dass die plasmatische SMase-Aktivität und der Ceramidspiegel im Plasma im Vergleich zu gesunden Kontrollen deutlich erhöht sind und zusätzlich mit schlechtem Outcome korrelieren (Claus et al. 2005, Doehner et al. 2007). Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist der in den vorliegenden Experimenten am Beispiel der Leber untersuchte Beitrag der SMase auf die Einwanderung von Entzündungszellen, initial der neutrophilen Granulozyten, in das Parenchym der

Viszeralorgane und der damit verbundenen Gewebeschädigung.

Als Sepsismodell in unserem Tierversuch entschieden wir uns für das *Peritoneal Contamination and Infection*-Modell (PCI) angelehnt an das Modell von Bauhofer und Lorenz, d.h. die intraperitoneale Injektion einer Faecessuspension, welche die Synergie aus aeroben und anaeroben Bakterien nachempfendet (Bauhofer et al. 2002). Das PCI-Modell simuliert eine polymikrobielle Infektion in der Peritonealhöhle mit anschließender Translokation der Bakterien ins Blut sowie konsekutiver systemischer Inflammation und Multiorganversagen. Die Anwendung humaner Faecesproben (3.5) erhöht die Vergleichbarkeit mit dem Keimspektrum der klinischen Situation. Die mikrobiologische Zusammensetzung entspricht dem Erregerspektrum der humanen Peritonitis. Da sowohl Aerobier als auch Anaerobier in der Faecesprobe enthalten sind, ist das PCI-Modell beispielsweise dem *Escherichia coli*-Modell überlegen. Bei entsprechender Dosierung (5 µl/g KG) werden bei den Mäusen des PCI-Modells regelhaft die klassischen Zeichen der humanen Sepsis wie Leukozytose, Thrombozytopenie, Zytokinsturm sowie eine 50-prozentige Letalität innerhalb der ersten 48 Stunden beobachtet. Darüber hinaus ließen sich die Bakterien innerhalb der ersten sechs Stunden nach Injektion entsprechend dem „Goldstandard“ der Sepsisdiagnostik durch mikrobiologische Anzucht im Blut nachweisen.

Ein weiterer Vorteil des PCI-Modells liegt in der Anwendung gewichtsadaptierter Faeceseinjektionen, wodurch einheitliche Schweregrade der Sepsis induziert werden und Messreihen vergleichbar sind. Das Modell der PCI ist daher ein hoch standardisiertes, reproduzierbares Sepsismodell, das abgesehen von einer intraperitonealen Injektion ohne chirurgische Eingriffe durchgeführt werden kann.

5.1 Die SMase und ihr Einfluss auf die Leukozytentransmigration in das Leberparenchym als Immunantwort bei Sepsis

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Rolle der SMase bzw. ihrer Metabolite auf den Prozess der Leukozytentransmigration in hepatisches Gewebe. Der SMase scheint hierbei eine wichtige Position in der Immunantwortkaskade der Neutrophilen, bestehend aus *tethering*, *rolling*, Adhäsion, Aktivierung, *crawling* und transendothelialer Migration (Ley et al. 2007), zuzukommen.

Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist in den Ergebnissen von MacKinnon et al. zu finden. Sie bestätigten dem Sphingomyelinmetabolit Sphingosin-1-Phosphat (S1P) eine Schlüsselrolle für das Priming von Neutrophilen, deren Polarisierung (Formveränderung) und Superoxidproduktion und somit deren Migrationsfähigkeit zum Ort der Entzündung

(MacKinnon et al. 2002). S1P entsteht im weiteren Verlauf der Hydrolyse von Sphingomyelin durch die SMase (Abb. 21). Folglich ist es plausibel, dass SMase-KO-Tiere auch eine defiziente S1P-Synthese aufweisen. S1P fungiert neben seiner Rolle als reine Sphingolipidstrukturkomponente der Zellmembran auch als intrazellulärer *second messenger*. S1P könnte hierbei für eine intrazelluläre Kalziumerhöhung in den Neutrophilen sorgen, was stark zum Priming beiträgt (Condliffe et al. 1998).

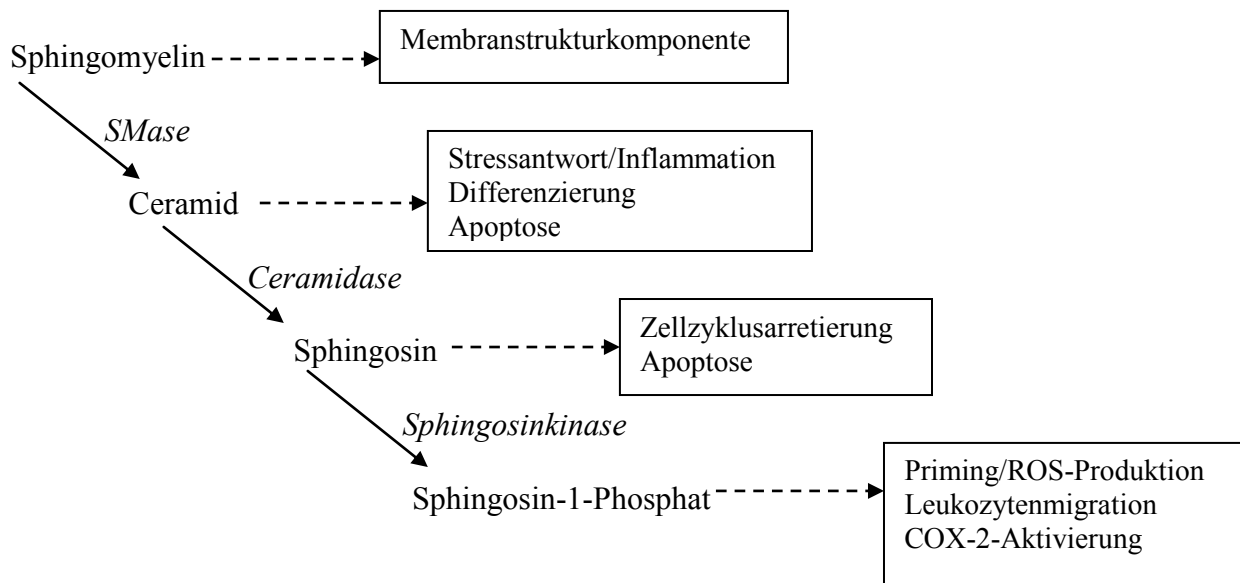


Abb. 21: Metabolisierungsweg von Sphingomyelin zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Die beteiligten Enzyme sind kursiv dargestellt. Die Hauptfunktionen der einzelnen Metabolite sind eingerahmt.

Einen weiteren Erklärungsansatz bieten die Resultate von Bhatia et al., die nachweisen konnten, dass durch Ceramid aktivierte Endothelzellen durch die Exozytose von Weibel-Palade-Körperchen P-Selektin sezernieren, welches die Adhäsion und das Rolling der Neutrophilen an der Gefäßwand vermittelt, zwei für die Leukozytentransmigration obligate Schritte (Bhatia et al. 2004).

Schon länger ist bekannt, dass durch die SMase gebildetes Ceramid in den *rafts* der Zellmembran zu größeren ceramidreichen Makrodomänen fusioniert (Liu und Anderson 1995, Gulbins und Kolesnick 2003). Diese fördern entweder durch eine Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften der Zellmembran oder durch direkte Ceramid-Protein-Interaktionen das "Einfangen" bzw. die Ansammlung von Signalrezeptoren und/oder intrazellulären Signalproteinen innerhalb dieser ceramidreichen Membrandomänen (Bollinger et al. 2005). Dies führt folglich zu einer Stabilisierung der Rezeptor-Ligand-Interaktion und zur Amplifizierung der Signalintensität. Hier liegt es nahe, dass die ceramidreichen Membrandomänen auch eine Rolle als Signalverstärker bei der Leukozyten-Endothel-

Interaktion spielen, z.B. der Integrin-ICAM oder der Selektin-Kohlenhydratligand-Wechselwirkungen. Die ceramidreichen Domänen könnten hierbei zu einer verstärkten Einwanderung von Granulozyten in parenchymatöse Organe führen.

Des Weiteren ist die bei einer systemischen Inflammation stattfindende Endothelschädigung Ceramid-abhängig (Haimovitz-Friedman et al. 1997) und SMase defiziente Mäuse zeigen signifikant weniger apoptotische Endothelzellen. Auch in der Lunge erhöht Ceramid durch eine Endothelschädigung die vaskuläre Permeabilität und führt im Rahmen eines ARDS bei septischen Patienten zu Lungenödem (Uhlig und Gulbins 2008). Diese Permeabilitätssteigerung scheint jedoch nicht durch eine Ceramid-induzierte Endothelzellapoptose bedingt zu sein und bedarf weiterer Nachforschungen (Lindner et al. 2005). Eine Ceramid-vermittelte Endothelverletzung mit folgender Abnahme der vaskulären Permeabilitätsbarriere könnte bei den Wildtypmäusen zu einer verstärkten Einwanderung von Granulozyten in das Leberparenchym geführt haben.

Einen nicht ganz unerheblichen Beitrag zur SMase-/Ceramid-vermittelten Granulozytentransmigration könnte auch ein Phänomen spielen, welches unabhängig der Leukozyten-Endothel-Interaktionen abläuft, nämlich im Leberparenchym des septischen Organismus selbst stattfindet. Ceramidreiche Membrandomänen sind sowohl für die CD95-abhängige (Grassme et al. 2003) als auch für die Fas-vermittelte Apoptose (Miyaji et al. 2005) unabdingbar und Garcia-Ruiz et al. konnten zeigen, dass die SMase für eine TNF-alpha-vermittelte Apoptose der Hepatozyten benötigt wird (Garcia-Ruiz et al. 2003). Die Ceramid-abhängige verstärkte hepatozelluläre Apoptoserate der Wildtypiere führt zu einem vermehrten Anfall von Zellzerfall- bzw. Zellabfallprodukten. Diese wiederum wirken stark chemotaktisch und locken vermehrt Granulozyten an, die in das Leberparenchym transmigrieren.

Darüber hinaus könnte die SMase auch indirekt die Leukozytentransmigration begünstigen. Die vorliegenden Untersuchungen über die bakterielle Keimlast sechs Stunden nach PCI ergaben eine signifikant erhöhte Anzahl von *colony forming units (CFU)* von Bakterien im Blut und in der Leber von SMase-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen. *CFU* sind koloniebildende Einheiten, welche im Idealfall jeweils aus einem kultivierbaren Bakterium herangewachsen sind und somit Hinweise auf die Anzahl der in der Probe ursprünglich enthaltenen Bakterien geben. Die erhöhte Bakteriämie der SMase-defizienten Mäuse kann durch eine Modulation der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion die Transmigration einschränken und somit für eine verminderte Leukozytenzahl in den parenchymatösen Organen wie der Leber führen. Wie kann aber eine erhöhte Bakterienlast

die Leukozytentransmigration beeinträchtigen? Eine mögliche Kausalität für dieses Phänomen beschrieben Doulet et al. bei Versuchen mit Zellkulturen (Doulet et al. 2006). Nach Infektion mit *Neisseria meningitidis* interagiert das Bakterium mit dem Endothel und rekrutiert Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und Zytoskelettkomponenten, welche die endotheliale Andockstelle für Leukozyten bilden und somit die Transmigration ins Gewebe ermöglichen. *N. meningitidis* konkurriert folglich mit Neutrophilen um diese endothelialen Andockstellen und kann bei starker Bakteriämie, wie sie im Blut der SMase-defizienten Mäuse zu beobachten war, die transendotheliale Migration der Neutrophilen verhindern.

Auch Edwards et al. entdeckten eine Bakterien-induzierte Transmigrationseinschränkung der Neutrophilen (Edwards et al. 2005). *Streptokokkus pyogenes*, isoliert aus dem Blut infizierter Patienten, ist in der Lage, Interleukin-8 (IL-8, auch Cxcl8) abzubauen. IL-8 ist ein Schlüsselchemokin für die Aktivierung sowie Transmigration von Neutrophilen. Dessen vermehrte Degradierung kann eine Inhibition der transendothelialen Migration zur Folge haben. Zwar sind in den letzteren Beispielen nur die Bakterien *N. meningitidis* und *S. pyogenes* aufgeführt, es ist aber zu vermuten, dass auch Bakterien der polymikrobiellen Faecessuspension des PCI-Modells auf gleiche oder ähnliche Weise zu einer Verminderung der Leukozytentransmigration führen, wie sie in den SMase-defizienten Mäusen, welche eine erhöhte Bakteriämie aufwiesen, zu beobachten war.

Nicht zuletzt ist auch die Expression einer Vielzahl von Genen Ceramid- bzw. SMase-reguliert und auch hier könnten einige Erklärungen für die Ceramid-vermittelte Leukozytentransmigration liegen. Die folgenden Punkte sollen einige dieser in den Experimenten untersuchten Transkripte in Leukozyten und in Hepatozyten genauer betrachten.

5.2 Die SMase beeinflusst die Expression diverser Gene in Leukozyten und Hepatozyten

5.2.1 Die SMase beeinflusst die Expressionen der Gene für die GTPasen Arl3 und Arl5a

Die Translationsprodukte der Gene Arl3 und Arl5a sind Arf (ADP-Ribosylierungsfaktor)-ähnliche GTPasen. Diese GTP-bindenden Proteine der Ras-Superfamilie sind, wenn an Guanosintriphosphat (GTP) gebunden, aktiv und durch Umwandlung von GTP in Guanosindiphosphat (GDP) inaktiv.

Arls sind an einer Vielzahl intrazellulärer Signaltransduktions- und

Vesikeltransportvorgängen beteiligt und insbesondere für die Leberfunktion von Bedeutung (Schrick et al. 2006). Arl3 spielt eine Rolle bei Mikrotubuli-assoziierten Prozessen und wird für die Zytokinese (Zellteilung), Mitose und somit für die Proliferation benötigt (Zhou et al. 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die Betrachtung der Genexpression der Arls nicht zuletzt deswegen interessant, weil bekannt ist, dass die Aktivierung durch Chemoattraktantien, ohne die eine Leukozytenrekrutierung und -transmigration nicht stattfinden könnte, am entsprechenden G-Protein-gekoppelten Rezeptor auf den Leukozyten durch GTP-bindende Proteine der Ras-Familie reguliert wird (Laudanna et al. 1996, Ley et al. 2007). Sie sind obligater Bestandteil der in der Immunabwehr gegen mikrobielle Invasoren in Leukozyten stattfindenden Signaltransduktionskaskaden. Die Chemotaxis ist die zielgerichtete Dirigierung von Leukozyten zum Ort der Infektion und führt im Leukozyt zur Aktivierung der Motilität. Diese wird realisiert durch Prozesse wie Aktinpolymerisierung/-depolymerisierung, Integrin-vermittelte Adhäsion sowie durch Veränderungen der Zellform. Am Ort der Infektion werden die Phagozytose der Pathogene und der *Respiratory burst* bzw. die Sekretion antimikrobieller Granula durch Adhäsions- und Membranänderungsvorgänge, Zytoskelettumgestaltungen, Aktinpolymerisierung und Proteintransport- und -sekretionsvorgänge umgesetzt. All diese Prozesse werden durch GTPasen der Ras-Familie, zu denen auch die Arls gehören, reguliert (Bokoch 1995).

Die Auswertung der PCR-Daten zeigte bei den plasmatischen Leukozyten sowohl eine signifikante Erhöhung der Arl3- als auch der Arl5a-Genexpression der SMase-defizienten Tiere verglichen mit den Wildtyptieren. Man kann hier spekulieren, dass die Leukozyten der SMase-defizienten Tiere durch vermehrte Synthese von GTPasen und folglich Amplifikation der Signaltransduktion stärker auf chemotaktische Reize reagieren, eine höhere Motilität und ausgeprägtere phagozytische Aktivität aufweisen. Ob sich hieraus ein Benefit für SMase-defiziente Tiere ableiten lässt, müssen weitere Experimente klären.

In der Leber zeigten die Genexpressionsdaten der PCR ein gegenteiliges Resultat. Hier waren sowohl die Expression von Arl3 also auch von Arl5a bei den Wildtyptieren signifikant gegenüber den SMase-defizienten Tieren erhöht. Dies könnte daraus resultieren, dass durch die vermehrte Einwanderung von Neutrophilen in das Leberparenchym und folglich Mediatorenfreisetzung die Leberzellschädigung der Wildtypiere schon ausgeprägter ist, was sich durch eine verminderte Mitose- und Zytokineserate auszeichnet. Da Arl3 für die Zellteilung und -funktion unabdingbar ist, könnte er ein Marker für die stärkere Progression der Leberzell- bzw. Lebergewebedysfunktion der Wildtyp- im Vergleich zu den SMase-defizienten Tieren sein.

5.2.2 Die SMase als Immunomodulator des LFA-1/ICAM-1-Signalwegs via Esm-1-Genexpression

Ein unverzichtbarer Schritt der Leukozytenemigration vom Blut ins Gewebe ist die Interaktion zwischen dem Leukozyten-Funktions-assoziierten Antigen (LFA)-1 auf Leukozyten und dem interzellulären Adhäsionsmolekül (ICAM)-1 der Endothelzellen bzw. Hepatozyten, deren Expressionen bei einer systemischen Inflammation durch Zytokine und Endotoxine hochreguliert werden (Jaeschke und Hasegawa 2006).

Neutrophile werden im Zuge einer systemischen Stressantwort durch inflammatorische Zytokine (TNF-alpha), Chemokine (IL-8, IL-1) und Komplementfaktoren (C5a) aktiviert (Priming). Sie akkumulieren in den Lebersinusoiden und transmigrieren, wenn sie ein chemotaktisches Signal z.B. durch Produktion des Chemokins IL-8 von geschädigten Hepatozyten erhalten, in das Leberparenchym. Die Transmigration wird ermöglicht durch die Bindung von Adhäsionsmolekülen, wie dem LFA-1, einem beta-2-Integrin (CD11a/CD18) auf den Neutrophilen und ICAM-1 auf Endothelzellen. Nach der Transmigration heften sich die Neutrophilen an Hepatozyten, wiederum vermittelt durch leukozytäre beta-2-Integrine und ICAM-1 auf Hepatozyten. Dieser Vorgang kann jedoch mit einer starken Hepatotoxizität einhergehen, wie Essani et al. zeigten (Essani et al. 1997). Sie wiesen nach, dass die Blockade von ICAM-1 Hepatozyten vor Schäden durch Neutrophile schützt.

Was hat aber Esm-1 damit zu tun? Das Esm-1-Gen codiert für das *Endothelial cell-specific molecule 1*, einem extrazellulären, im Blut zirkulierenden Proteoglykan, auch genannt Endocan. Esm-1 wird überwiegend von Endothelzellen sezerniert und steht, wie auch die Integrine und andere Zelladhäsionsmoleküle, unter der Kontrolle inflammatorischer Zytokine wie TNF-alpha und IL-1-beta (Bechard et al. 2001). Esm-1 agiert jedoch antiinflammatorisch, indem es auf der Oberfläche von Leukozyten direkt an das LFA-1-Integrin bindet und die LFA-1/ICAM-1-Interaktion verhindert (Abb. 22). Durch Untersuchungen mit CD11- und CD18-Antikörpern vermuteten Bechard et al., dass Esm-1 wahrscheinlich nicht die ICAM-1-Bindungsstelle am LFA-1-Molekül direkt blockiert, sondern durch Konformationsänderung des LFA-1-Moleküls die ICAM-1-Bindung inhibiert (Bechard et al. 2001). Daraus ergibt sich eine Schlüsselrolle für Esm-1 als Regulator der Rekrutierung von Entzündungszellen, für die Leukozyt-Endothelzell-Adhäsion und für die Leukozytentransmigration mit folgender Organtoxizität (Sarrazin et al. 2006, Scherpereel et al. 2006).

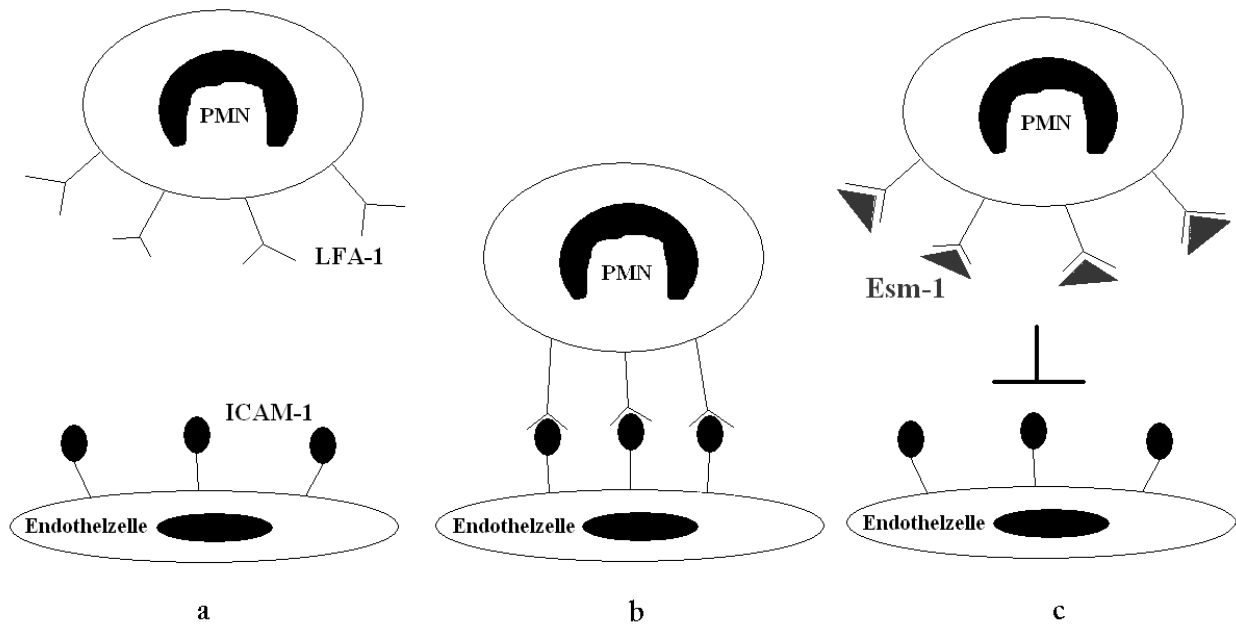


Abb 22: Regulation der LFA-1/ICAM-1-Interaktion durch Esm-1. a) PMN (polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt) mit dem LFA (Leukozyten Funktions-assoziiertes Antigen)-1, Endothelzelle mit dem Interzellulären Adhäsionsmolekül (ICAM)-1. b) ICAM-1 gebunden an LFA-1. c) Esm-1 bindet an LFA-1 und inhibiert die ICAM-1-Bindungsstelle.

Zwar wird in den meisten Publikationen das Endothel als wichtigster Sekretionsort für Esm-1 genannt, allerdings ergaben die vorliegenden PCR-Ergebnisse auch für die leukozytäre Genexpression eine signifikante Erhöhung von Esm-1 in den SMase-defizienten Leukozyten im Vergleich zu den Wildtyp-Leukozyten der septischen Mäuse. Man kann argumentieren, dass die SMase-Defizienz Einfluss auf die Esm-1-Genexpression und Proteintranslation in den Leukozyten zu nehmen scheint und somit ein weiterer Erklärungsbeitrag für die verminderte Leukozytentransmigration in das Leberparenchym vorliegt. Allerdings ist wenig über den Anteil des in Leukozyten synthetisierten Esm-1 bekannt. An dieser Stelle wäre die Betrachtung der Esm-1-Genexpression in Endothelzellen, dem Hauptsyntheseort von Esm-1, im Vergleich zwischen SMase-defizienten und Wildtyp-tieren interessant, was aber nicht Gegenstand der Experimente war und erst durch weitere Untersuchungen erforscht werden muss.

5.2.3 Die Wirkung der SMase auf die Expression der Gene für die Chemokine Cxcl2 und Cxcl9

Die CXC-Chemokine sind chemotaktisch-wirksame Zytokine, welche die Aktivität von Adhäsionsrezeptoren auf der Zelloberfläche von Leukozyten modulieren und deren Migration in entzündetes Gewebe dirigieren (Luster 1998).

Cxcl2, auch bekannt als MIP2-alpha (*macrophage inflammatory protein 2-alpha*) oder GRO-

beta (*growth regulated protein-beta*), ist ein von Monozyten und neutrophilen Granulozyten sezerniertes Chemokin, welches spezifisch am Chemokinrezeptor CXCR2 wirkt. CXCR2 wird insbesondere auf Neutrophilen exprimiert.

Ein weiteres Chemokin, Cxcl9 oder Mig (*monokine-induced by IFN-gamma*), wird von Neutrophilen und Makrophagen sezerniert und bindet zusammen mit Cxcl10 und Cxcl11 spezifisch am CXCR3-Rezeptor von Typ1-T-Helferzellen.

Die CXC-Chemokine nehmen somit einen wichtigen Einfluss auf die Leukozytentransmigration. Li et al. konnten zeigen, dass insbesondere Cxcl2, produziert von Hepatozyten, eine Schlüsselrolle bei der Leukozyteninfiltration in Sepsis-geschädigtes Lebergewebe spielt (Li et al. 2004). Durch deren weitere Versuche mit monoklonalen Antikörpern gegen Cxcl2 ließ sich die transendotheliale Leukozytenmigration in die Leber um mehr als 83 % vermindern.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen eine signifikante Hochregulierung sowohl der Cxcl2- als auch der Cxcl9-Genexpression in Hepatozyten sechs Stunden post PCI verglichen mit den gesunden Kontrolllebern. Allerdings ließ sich kein signifikanter Unterschied der hepatischen Genexpression zwischen den Wildtyp- und SMase-defizienten Tieren aufzeigen. Dennoch kann das PCI-Modell somit den wichtigen Beitrag dieser Chemokine zur Leukozytentransmigration in geschädigtes Leberparenchym verifizieren.

Die Auswertung der leukozytären Chemokin-Genexpression liefert ein zunächst paradoxes Bild. Sechs Stunden nach PCI fanden sich in den Leukozyten der SMase-defizienten Mäuse eine Erhöhung der Cxcl2- (nicht signifikant) sowie der Cxcl9-Expression (signifikant) verglichen mit den Wildtyptieren. Allerdings müsste eine folglich erhöhte Chemokinkonzentration im Blut zu einer vermehrten Leukozytentransmigration ins Gewebe führen, die jedoch bei den SMase-defizienten Tieren vermindert war. Hier ist zu erwähnen, dass sich die Leukozyten immer entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration bewegen. Demzufolge wäre die Leukozytenmigration am stärksten bzw. der Chemokinkonzentrationsgradient am größten bei geringer Chemokinplasmakonzentration und hoher intraparenchymaler Chemokinkonzentration am Zielort durch lokale Chemokinproduktion durch Parenchymzellen wie z.B. Hepatozyten oder durch bereits transmigrierte Leukozyten (Cassatella 1995).

Entscheidend ist demnach nicht die absolute Plasmachemokinkonzentration, sondern das Verhältnis zwischen systemischer Plasma- und lokaler Chemokinkonzentration. Dies konnten zahlreiche Versuche sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigen. Durch intravenöse Applikation von Interleukin (IL)-8, einem starkem Chemokin für neutrophile Granulozyten,

und konsekutiver Erhöhung der IL-8-Plasmakonzentration ließ sich eine signifikant verminderte Einwanderung von Leukozyten in parenchymatöse Organe beobachten (Hechtman et al. 1991, Ley et al. 1993, Call et al. 2001).

Die erhöhte lokale Chemokinproduktion kann als Mechanismus verstanden werden, um Leukozyten zur Pathogenabwehr zum Ort der Schädigung zu dirigieren, während intakte Bereiche mit geringer/fehlender Chemokinsekretion von der leukozytären Immunantwort ausgenommen bleiben.

Über die Beeinflussung der Genexpression wichtiger Chemokine wie Cxcl2 und Cxcl9 scheint die SMase durch eine Erhöhung der plasmatischen Chemokinkonzentration und folgender Verminderung des Chemokingradienten lokal:systemisch die Leukozytentransmigration zu beschränken. Allerdings sind die untersuchten Chemokine gewiss nicht allein für die Leukozytentransmigration verantwortlich, sondern auch ein Reihe weiterer Chemokine, Zytokine und lokaler Faktoren, deren Beeinflussung durch die SMase es noch zu ergründen gilt. Zudem war die Betrachtung auf der Ebene der Rezeptoren für die Vielzahl von Chemo- und Zytokinen nicht Gegenstand der vorliegenden Experimente. Zum einen ist auch hier ein Einfluss der SMase auf die Genexpression zu vermuten, zum anderen ist eine Modulierung der Signaltransduktion bzw. eine Wechselwirkung der Rezeptoren mit den ceramidreichen Domänen denkbar.

5.2.4 Die Lactotransferrin-Genexpression: der Beitrag der SMase zur Immunomodulation und Bakterieneradikation

Lactotransferrin (Ltf), auch Lactoferrin, ist ein Eisen-bindendes Glycoprotein und bedeutender Bestandteil der Granula, welche von neutrophilen Granulozyten im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens im Blut und im betroffenen infizierten Gewebe zur Pathogenabwehr freigesetzt werden (Legrand et al. 2008).

Die Lactotransferrinkonzentration im Blut steigt demnach bei einer systemischen Inflammation stark an (Bennett und Kokocinski 1978), was auch in der Genexpressionsanalyse der Leukozyten ersichtlich war. Die Ltf-Expression war sowohl in den SMase-defizienten- als auch in den Wildtyp-Leukozyten signifikant gegenüber den gesunden Kontrollen erhöht, allerdings bei SMase-Defizienz signifikant weniger verglichen mit dem Wildtyp.

Lactotransferrin wirkt einerseits direkt bakterizid, indem es an Lactotransferrin-Rezeptoren auf der Bakterienmembran bindet. Diese Bindungsstellen könnten Poren sein und Lactotransferrin führt bei Bindung zur Destabilisierung der Bakterienmembran (Erdei et al.

1994, Sallmann et al. 1999). Andererseits greift Lactotransferrin indirekt in das Immunsystem ein, indem es durch eine Stimulierung der Freisetzung von GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) die vermehrte Produktion von Granulozyten im Knochenmark anregt (Sawatzki und Rich 1989). GM-CSF ist ein von Immun- und Endothelzellen gebildetes Zytokin für die Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen zu Granulozyten im Knochenmark. Weiterhin kann Lactotransferrin an Neutrophile und Makrophagen binden, was zum einen die Phagozytoseaktivität steigert (Kai et al. 2002) und zum anderen zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF-alpha stimuliert (Sorimachi et al. 1997).

Somit scheint eine SMase-Defizienz durch eine verminderte Lactotransferrin-Genexpression und anschließender Proteintranslation zu einer reduzierten Pathogenabwehr zu führen, was der in den vorliegenden Experimenten beobachteten erhöhten Bakterienlast in Blut und Leber der SMase-defizienten Tiere entspricht. Einschränkend bleibt allerdings zu erwähnen, dass in den vorliegenden Experimenten nur die Genexpression der zirkulierenden Leukozyten betrachtet wurde. Der plasmatische Anteil des Lactotransferrins stellt jedoch nur die Spitze des Eisbergs dar. Der Hauptteil wird von Neutrophilen am Ort der Inflammation sezerniert (Legrand et al. 2005).

Die Koinzidenz der verstärkten Ltf-Genexpression in den Wildtyp-Leukozyten mit der Wirkung von Lactotransferrin auf GM-CSF, welcher zu einer erhöhten Ausschwemmung von Leukozyten aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf führt, könnte im Zusammenhang stehen mit der in unserem Labor beobachteten signifikant erhöhten Leukozytenkonzentration im Plasma der Wildtyp- gegenüber der SMase-defizienten Tiere sechs Stunden nach PCI (unveröffentlichte Daten). Man kann spekulieren, dass der bloße Überschuss an zirkulierenden Leukozyten in den Wildtyp-Tieren zu einer vermehrten Transmigration in das Leberparenchym geführt hat. Andererseits wurden bereits Zusammenhänge zwischen der Lactotransferrinkonzentration im Plasma und einer vermehrten Leukozytentransmigration ins Gewebe beschrieben. So führt von Neutrophilen freigesetztes Lactotransferrin zu einer Verletzung des Endothels und Veränderung der Barrierefunktion. Dies zieht eine vermehrte Akkumulation von Neutrophilen, eine verstärkte Leukozyten-Endothel-Adhäsion sowie eine amplifizierte Leukozytendiapedese zum Ort der Inflammation nach sich (Kurose et al. 1994). Lactotransferrin vermittelt hierbei die Translokation von P-Selektin, einem Zelladhäsionsprotein, zur Zelloberfläche der Endothelzellen. Endotheliales P-Selektin tritt in Wechselwirkung mit Oberflächenmolekülen auf Leukozyten und führt zur Adhäsion von Neutrophilen am Endothel, einem obligaten Schritt der Leukozytentransmigration.

5.2.5 Die SMase als Regulator der Effektorfunktionen von neutrophilen Granulozyten?

Nach der Betrachtung diverser Gene für plasmatische Proteine, die von Leukozyten sezerniert werden und direkt an der Bakterieneradikation bzw. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beteiligt sind, stellt sich die Frage, ob auch ein Zusammenhang zwischen der SMase und der Expression für Gene von Transkriptionsfaktoren besteht, die mit dem inflammatorischen Geschehen assoziiert sind. Hier schien die Expressionsanalyse von *Ifrd1* sinnvoll, einem Gen, das für den *Interferon-related developmental regulator 1* codiert. Dieser ist ein vorrangig von Neutrophilen während ihrer terminalen Differenzierungsphase exprimierter Co-Regulator für NF-kappaB (NF-κB) (Ehrnhoefer 2009), dem entscheidenden Transkriptionsfaktor für inflammatorische und immunologische Prozesse (Abb. 23).

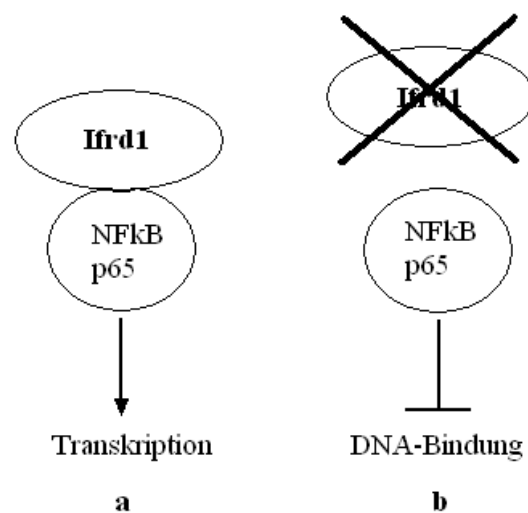


Abb. 23: Ifrd1 als Co-Regulator der NF-κB -Untereinheit p65. a) Direkte Interaktion zwischen Ifrd1 und NF-kappaB führt zur Bindung von NF-κB an DNA und zur Transkription. **b)** Ifrd1-Inhibition bzw. -Defizienz hemmen die Bindung von NF-κB an DNA und somit die neutrophilen Effektorfunktionen.

Ifrd1 spielt eine wichtige Rolle bei den spezifischen Effektorfunktionen von neutrophilen Granulozyten, welche ihrerseits NF-κB-abhängig sind. So war eine Ifrd1-Defizienz im Mausmodell assoziiert mit einer verminderten NF-κB-Transaktivierung sowie mit einer eingeschränkten Freisetzung von Sauerstoffradikalen (*oxidative burst*), weniger Bakterienabtötung und reduzierter TNF-alpha-Produktion durch Neutrophile (Gu et al. 2009). Allerdings blieben die Chemotaxis und die Leukozytenzahl unverändert. In Betracht der in SMase-defizienten Mäusen beobachteten erhöhten Bakterienlast würde man im Vergleich zur Wildtypgruppe eine verminderte Ifrd1-Genexpression und somit reduzierte Effektorfunktionen durch Neutrophile gegen Pathogene erwarten. Überraschenderweise zeigte die Genexpressionsanalyse der Leukozyten ein gegenteiliges Bild. Die SMase-defizienten

Leukozyten wiesen eine signifikant erhöhte Ifrd1-Genexpression verglichen mit den Wildtypzellen auf. Hier wäre es möglich, dass durch die in den SMase-defizienten Mäusen erhöhte Bakteriämie und somit gesteigerte Endotoxinämie die Ifrd1-Genexpression durch LPS-Induktion hochreguliert wird, ähnlich wie auch NF- κ B durch LPS induziert werden kann. Dies würde eine proinflammatorische Reaktion des Immunsystems auf die erhöhte Pathogenlast darstellen. Auch ist bekannt, dass durch die SMase gebildetes Ceramid NF- κ B inhibiert (Signorelli et al. 2001, Abboushi et al. 2004). In der SMase-defizienten Maus, in der die Generierung von Ceramid unterbunden ist, könnte der NF- κ B hemmende Effekt wegfallen. So würde NF- κ B aktiviert sein und ein relativ erhöhter Bedarf von seinem Co-Aktivator Ifrd1 bestehen. Infolgedessen könnte zur Deckung dieses Bedarfs über bisher unbekannte Mechanismen eine Hochregulierung der Ifrd1-Genexpression erfolgt sein. An dieser Stelle wäre eine weitere Analyse der NF- κ B-Genexpression sinnvoll, was nicht Teil der Untersuchungen war.

Die Betrachtung der Ifrd1-Genexpression lässt vermuten, dass die SMase bzw. das Ceramid nicht zwangsläufig direkt an der Expression diverser Gene beteiligt sind, sondern dass eventuell auch die Konsequenzen der SMase-Defizienz bzw. des Ceramidmangels, hier genannt die erhöhte Bakteriämie, reaktiv ein verändertes Genexpressionsmuster bedingen können.

5.2.6 Signaltransduktionsvorgänge während der Zelltransmigration werden durch die SMase beeinflusst

Wie in den bisherigen Ergebnissen gezeigt, nimmt die SMase Einfluss auf verschiedene Gene für Proteine der Leukozyten-Endothelzell-Adhäsion, Chemotaxis, Phagozytose und Transkription. Wie sieht es aber mit Schlüsselementen der Signaltransduktionsvorgänge aus, die während der Leukozytenadhäsion und -transmigration ablaufen? Hier lag unser Fokus auf Rnd1, welches durch das Rnd1-Gen codiert wird und die Zelladhäsion hemmt. Erwartungsgemäß lag die Genexpression von Rnd1 sowohl bei den SMase-defizienten Leukozyten als auch bei den SMase-defizienten Leberzellen signifikant höher als bei den entsprechenden Wildtypzellen sechs Stunden nach PCI und bestärkt unsere Vermutung, dass die SMase eine wichtige Rolle bei der Leukozytentransmigration wahrnimmt.

Rnd1 gehört zur Familie der Rho-GTPasen. Diese wiederum sind Teil der Ras-Superfamilie, zu der auch Arl3 und Arl5a zählen, und an unzähligen Signaltransduktionsvorgängen beteiligt. GTPasen sind in GTP-gebundener Form aktiv und in GDP-gebundener Form inaktiv. Allerdings gehört Rnd1 einer Sondergruppe von Rho-GTPasen an, die praktisch keine

GTPase-Aktivität aufweisen und konstitutiv in GTP-gebundener, aktiver Form vorliegen (Nobes et al. 1998). Rnd1 wird vorrangig im Hirn und in der Leber exprimiert und vermittelt den Abbau von Aktin-Myosin-Filamenten und Fokaladhäsionen. Diese sind verankernde Zellverbindungen, die auf Zellseite aus Integrinen bestehen und das Aktin-Zytoskelett der Zelle an die extrazelluläre Matrix koppeln (Katoh et al. 2002). Folglich führt Rnd1 zu einer Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts und dem Ausbleiben von Integrinanhäufungen auf der Zelloberfläche, wodurch die Zelle ihre morphologischen Eigenschaften einbüßt, rund wird (daher Rnd für englisch *round*) und ihre Adhäsionsfähigkeit verliert, der Grundvoraussetzung für die Zellmigration (Chardin 2006). Nobes et al. vermuteten, dass Rnd1 über eine Antagonisierung der Rho-regulierten Signalwege wirkt, wahrscheinlich über Wechselwirkungen mit einem gemeinsamen Element im Signalweg (Nobes et al. 1998). Die Signalwege der ursprünglichen Rho-GTPasen, im Gegensatz zu denen des neueren Rho-Vertreters Rnd1, vermitteln auf extrazelluläre Signale hin, z.B. durch Chemokine, die Bildung von Aktin-Myosin-Filamenten sowie Integrin-basierenden Fokaladhäsionen für die Zelladhäsion und somit Zelltransmigration (Hall 1998). Rnd1 antagonisiert demnach dieses zentrale Bindeglied zwischen G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren und Integrin-vermittelter Leukozytenadhäsion (Laudanna et al. 1996).

Weiterhin interessant sind Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe von Vayssiere, die eine Interaktion von Rnd1 und der SH2-Domäne des Adapterproteins Grb7 nachweisen konnten (Vayssiere et al. 2000). Grb7 vermittelt Protein-Protein-Interaktionen und spielt eine wichtige Rolle bei Integrin-Signaltransduktionswegen sowie Zellmigration (Han et al. 2001). Die direkte Bindung zwischen Rnd1 und Grb7 führt zum Abbau von Aktinfilamenten und zum Verlust der Zelladhäsion. Man kann einschränkend behaupten, dass der Beitrag von Grb7 nur als Folge der Rnd1-Aktivität zu sehen ist. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass Rnd1 und Grb7 jeweils eigene Rollen in der Zellmigration spielen und dass die Rnd1-Grb7-Interaktion diese Wirkungen noch potenziert.

Somit liefert die sowohl in SMase-defizienten Leukozyten als auch in SMase-defizienten Hepatozyten erhöhte Rnd1-Genexpression mit folgender Antagonisierung der Zelladhäsion-assoziierten Signaltransduktionswege einen weiteren Hinweis darauf, wie die SMase und ihre Produkte in Zelladhäsions- und -transmigrationsvorgänge eingreifen kann.

5.3 Methodenkritik

Nach aktuellem Stand der Wissenschaft ist die apoptotische Veränderung im Tiermodell, insbesondere bei Nagern, ein stets reproduzierbares Phänomen, welches bei der Pathophysiologie des *remote organ failure* eine bedeutsame Rolle zu spielen scheint und für das Verständnis dieser Prozesse unverzichtbar ist. Allerdings besteht unter dem Gesichtspunkt der Translationalität eine gravierende Lücke zu den Ergebnissen von histopathologischen Untersuchungen septischer Patienten, bei denen mit Ausnahme von apoptotischen Lymphozyten Gewebsveränderungen, welche auf Apoptoseinduktion hinweisen müssten, lediglich vereinzelt beobachtet wurden (Hotchkiss und Karl 2003).

Einschränkend bleibt weiter anzumerken, dass in den durchgeführten Experimenten lediglich das Genexpressionsmuster der zirkulierenden Leukozyten analysiert wurde. Eine zusätzliche Betrachtung der Genexpression der bereits in das Leberparenchym transmigrierten und aktivierten (Priming) Leukozyten gäbe näheren Aufschluss darüber, was sich an der Gefäßwand durch Ceramid-vermittelte Signalwege zwischen Leukozyten und Endothel unter dem Einfluss diverser Zytokine abspielt. Hinzu kommt, dass in der Genexpressionsanalyse nicht zwischen den einzelnen Subgruppen der Leukozyten differenziert wurde. Zwar stellen neutrophile Granulozyten, auf denen in der vorliegenden Arbeit der Fokus lag, unter physiologischen und besonders unter septischen Bedingungen den größten Anteil dar, allerdings müssen kleinere Abweichungen der neutrophilen Genexpression durch andere leukozytäre Subgruppen eingerechnet werden. Darüber hinaus ist zu beachten, dass es sich bei den Genexpressionsdaten aus der Leber stets um Mischpopulationen inklusive transmigrierter Zellen handelt, was eine strikte, zelltypspezifische Differenzierung der Expressionsmuster nicht gestattet. Dieser Einschränkung könnte durch die Anwendung von Laserdissektionsmikroskopie und Einzelzell-PCR begegnet werden.

Zu letzt bleibt zu erwähnen, dass die Auswertung der Genexpression durch die PCR lediglich Modifikationen auf Transkriptionsebene aufzeigen kann. Sie lässt nur sehr bedingt Schlüsse darauf zu, was auf der Ebene der Proteintranslation oder -sekretion geschieht. Prozesse wie die posttranslationale Modifikation oder Regulierungsmechanismen hinsichtlich der Proteinsekretion, d.h. wie viel Protein schließlich tatsächlich ins Blut freigesetzt wird und zirkuliert, bleiben in den Analysen der vorliegenden Arbeit unberücksichtigt und sollten beispielsweise mit proteinbiochemischen oder immunhistochemischen Methoden näher untersucht werden.

Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liegt das PCI-Modell einer intraperitonealen polymikrobiellen Infektion zugrunde, welches der klinischen Fragestellung einer Sepsis sehr nahe kommt. Anhand dieses Modells konnte tierexperimentell der Einfluss der SMase und ihrer Reaktionsprodukte auf das Migrationsverhalten und das Genexpressionsschema von neutrophilen Granulozyten und Hepatozyten unter septischen Bedingungen untersucht werden. Zur Darstellung der diversen Aspekte auf den unterschiedlichen Ebenen sind die mutmaßlich SMase-abhängigen Regulationsmechanismen und Stressantworten in der folgenden Abbildung schematisch zusammengefasst (Abb. 24):

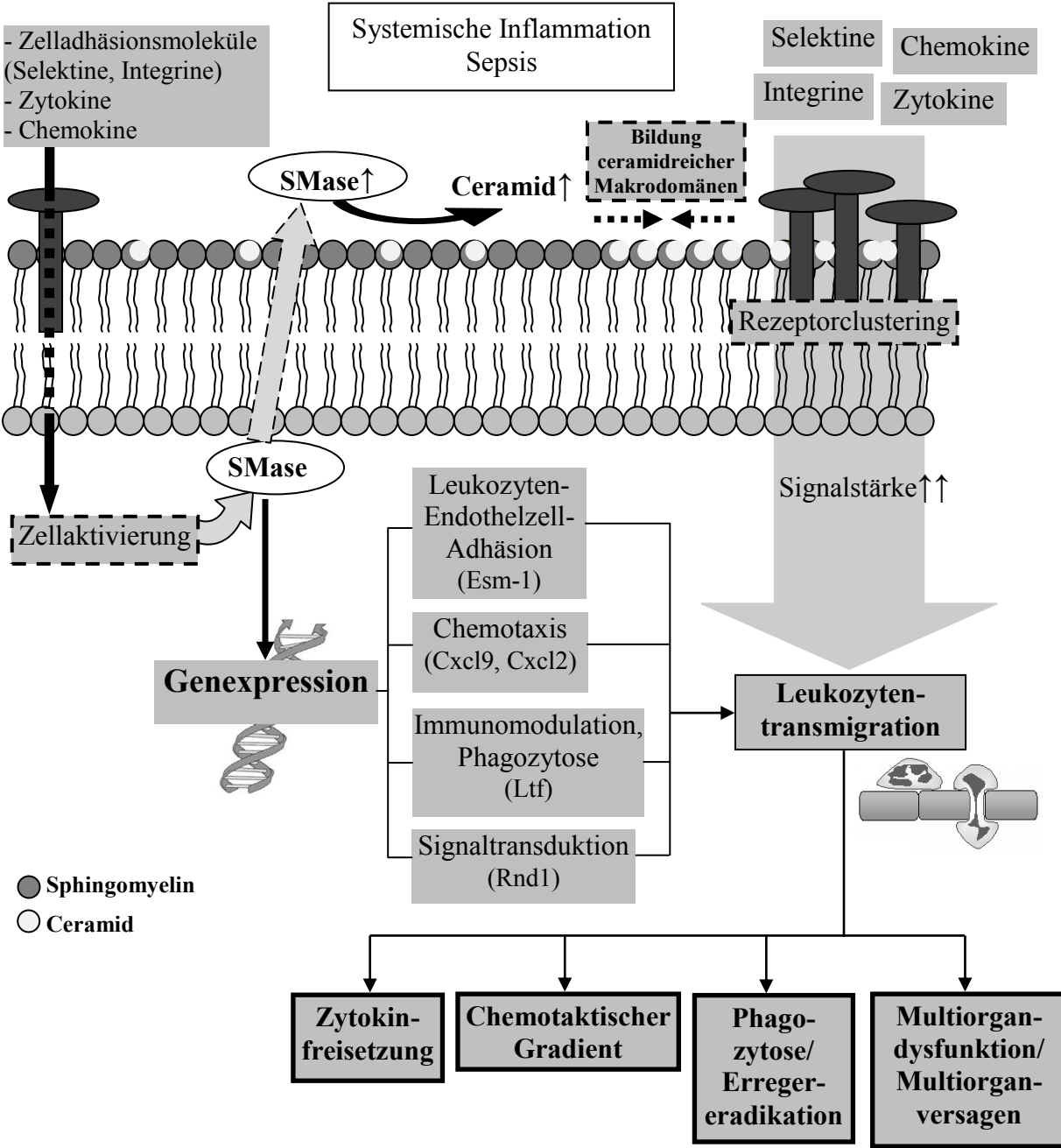


Abb. 24: Schematische Darstellung der SMase-Wirkung auf die Bildung ceramidreicher Makrodomänen und die Genexpression. Im Rahmen einer systemischen Inflammation bzw. Sepsis

kommt es zu einer Aktivierung der Zelle durch proinflammatorische Stimulation mittels Zelladhäsionsmolekülen, Zytokinen und Chemokinen. Infolgedessen wird die SMase aus intrazellulären Speichern auf die Außenseite der Zellmembran transloziert, wo sie das in den *lipid rafts* befindliche Sphingomyelin zu Ceramid hydrolysiert. Ceramidmoleküle fusionieren zu ceramidreichen Makrodomänen innerhalb der *lipid rafts*. Diese Membrandomänen vermögen die Membraneigenschaften so zu modifizieren, dass weitere Liganden durch eine Konzentrierung von Rezeptoren (Rezeptorclustering) bevorzugt binden, die Signalstärke amplifiziert wird und somit die Transmigration-vermittelnden Signaltransduktionskaskaden induziert werden können.

Transmigrierte Leukozyten sezernieren Enzyme und Zytokine zur Pathogenbekämpfung sowie Chemokine zur Schaffung eines chemotaktischen Gradienten für die Transmigration weiterer Immunzellen. Bei überschießender, unkontrollierter Immunantwort kann eine Transmigration von Leukozyten, vorrangig der neutrophilen Granulozyten, durch Zellschädigungen parenchymatöser Organe regelhaft bei einem Multiorganversagen beobachtet werden.

Darüber hinaus nimmt die SMase bei proinflammatorischer Stimulation der Zelle Einfluss auf die Expression diverser Gene, welche mit entscheidenden Prozessen der Leukozytentransmigration assoziiert sind: Esm-1 vermittelt zwischen Leukozyten und Endothelzellen über die LFA-1/ICAM-1-Interaktion. Die Chemokine Cxcl9 und Cxcl2 aktivieren Adhäsionsrezeptoren und dirigieren Leukozyten zum Ort der Inflammation. Lactotransferrin (Ltf) wirkt einerseits direkt bakterizid, stimuliert andererseits die Sekretion von GM-CSF und proinflammatorischen Zytokinen. Das G-Protein Rnd1 spielt eine wichtige Rolle bei Zelladhäsion-assoziierten Signaltransduktionswegen.

Schließlich ist auch ein Einfluss der SMase auf die kompartimentspezifische Bakterienlast zu beobachten. Sechs Stunden nach PCI zeigen die aus Leber und Blut der SMase-defizienten Mäuse stammenden Lösungen, auf speziellem Agar ausplattiert und für 48 Stunden kultiviert, eine erhöhte Anzahl von Bakterienkolonien.

6 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen deutlichen Einfluss der sauren Sphingomyelinase bzw. ihres Metaboliten, dem Ceramid, welches Bestandteil von speziellen Membrandomänen der Zellmembranen ist, auf das Transmigrationsverhalten von Leukozyten. Im Rahmen einer PCI-induzierten, generalisierten Immunantwort war in den Wildtyporganismen eine signifikant erhöhte transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten in das Leberparenchym verglichen mit den SMase-defizienten Tieren zu verzeichnen.

Folglich ist davon auszugehen, dass ceramidreiche Makrodomänen innerhalb der Zellmembranen auch jene Signalkaskaden modulieren bzw. amplifizieren, welche die Transmigrationsprozesse zwischen Leukozyten und Endothelzellen ermöglichen. Ähnlich wie dies für die Fas- und CD95-abhängige Apoptoseinduktion schon diskutiert wurde, scheinen auch hier die ceramidreichen Makrodomänen die biophysikalischen Eigenschaften der Zellmembran zu verändern bzw. Proteininteraktionen zu ermöglichen, so dass Rezeptormoleküle „eingefangen“ (*clustering*) und Rezeptor-Ligand-Interaktionen stabilisiert werden, wodurch das Ablaufen bestimmter die Leukozytenadhäsionskaskade realisierende Signalwege begünstigt wird.

Ein weiterer Mechanismus, welcher die Leukozytentransmigration vorantreibt, ist in einer Ceramid-abhängigen Endothelzelldestruktion zu vermuten. Der daraus folgende Barriereverlust und die gesteigerte Permeabilität könnten direkt zu einer erhöhten Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe führen. Denkbar ist auch, dass es im Rahmen der generalisierten Inflammationsreaktion zu einer Ceramid-vermittelten Apoptoseinduktion der Hepatozyten z.B. durch den Fas- oder CD95-Ligand gekommen ist. Dies würde ein starkes chemotaktisches Signal für zirkulierende Leukozyten darstellen und sie zum Ort der Schädigung in das Leberparenchym dirigieren. Allerdings waren Untersuchungen hinsichtlich Zellschäden und Apoptoserate nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und müssten erst durch weitere Experimente analysiert werden.

Einen nicht unwichtigen Beitrag zu den Effektorfunktionen und dem Migrationsverhalten von Leukozyten scheint die saure Sphingomyelinase über eine Regulierung der Genexpression zu leisten. Die vorliegenden Ergebnissen zeigen einen Einfluss der SMase auf die Expression diverser Gene für Proteine der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, Chemotaxis, Phagozytose, Transkription sowie für Schlüsselemente von Signaltransduktionskaskaden, welche die komplexen Vorgänge der Leukozytenadhäsion und –transmigration realisieren.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass das leukozytäre Genexpressionsmuster nur für zirkulierende Leukozyten untersucht wurde. Erst zusätzliche, weitaus aufwendigere Experimente könnten Aufschluss über die Genexpression der bereits transmigrierten, intraparenchymalen Leukozyten geben. Eine Limitation der PCR bleibt auch, dass lediglich Aussagen auf Transkriptionsebene getroffen werden können. Schlussfolgerungen über die tatsächliche Proteintranslation sowie –sekretion sind schwer zu ziehen. Hier würden weitere Analysen der Proteinkonzentrationen im Plasma, auf den Zellmembranen und dem *microenvironment* während *rolling*, *adherence* und *diapedesis* erforderlich werden. Letztere Parameter sind erfahrungsgemäß schwer zu fassen, so dass dieser Aspekt auch mit funktionellen Untersuchungen wie beispielsweise der Intravitalmikroskopie ergänzt werden könnte.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die vorliegenden Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen der Sphingomyelinase bzw. der Sphingolipide und dem Transmigrationsverhalten von Neutrophilen hinweisen.

Weitere experimentelle Untersuchungen werden zeigen müssen, ob eine Inhibition der SMase ein potientes Ziel in der Behandlung von systemischen Entzündungsgeschehen und der Sepsis darstellen wird.

7 Literaturverzeichnis

- Abboushi N, El-Hed A, El-Assaad W, Kozhaya L, El-Sabban M, Bazarbachi A, Badreddine R, Bielawska A, Usta J, Dbaibo G. 2004. Ceramide inhibits IL-2 production by preventing protein kinase C-dependent NF-kappaB activation: possible role in protein kinase Ctheta regulation. *J Immunol*, 173 (5):3193-3200.
- Arnaout M, Mahalingam B, Xiong J. 2005. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21:381-410.
- 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.
- Bechard D, Scherpereel A, Hammad H, Gentina T, Tsicopoulos A, Aumercier M, Pestel J, Dessaint JP, Tonnel AB, Lassalle P. 2001. Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*, 167 (6):3099-3106.
- Bennett R, Kokocinski T. 1978. Lactoferrin content of peripheral blood cells. *Br J Haematol*, 39 (4):509-521.
- Bhatia R, Matsushita K, Yamakuchi M, Morrell C, Cao W, Lowenstein C. 2004. Ceramide triggers Weibel-Palade body exocytosis. *Circ Res*, 95 (3):319-324.
- Bokoch GM. 1995. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*, 86 (5):1649-1660.
- Bollinger CR, Teichgraber V, Gulbins E. 2005. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim Biophys Acta*, 1746 (3):284-294.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 2009. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest*, 136 (5 Suppl):e28.
- Butcher EC. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67 (6):1033-1036.
- Call DR, Nemzek JA, Ebong SJ, Bolgos GL, Newcomb DE, Remick DG. 2001. Ratio of local to systemic chemokine concentrations regulates neutrophil recruitment. *Am J Pathol*, 158 (2):715-721.
- Cassatella MA. 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today*, 16 (1):21-26.
- Chardin P. 2006. Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (1):54-62.
- Claus RA, Bunck AC, Bockmeyer CL, Brunkhorst FM, Losche W, Kinscherf R, Deigner HP. 2005. Role of increased sphingomyelinase activity in apoptosis and organ failure of patients with severe sepsis. *FASEB J*, 19 (12):1719-1721.
- Condliffe A, Kitchen E, Chilvers E. 1998. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci (Lond)*, 94 (5):461-471.
- Cremesti A, Goni F, Kolesnick R. 2002. Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Lett*, 531 (1):47-53.
- Croner RS, Hoerer E, Kulu Y, Hackert T, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. 2006. Hepatic platelet and leukocyte adherence during endotoxemia. *Crit Care*, 10 (1):R15.
- Doehner W, Bunck AC, Rauchhaus M, von Haehling S, Brunkhorst FM, Ciccoira M, Tschope C, Ponikowski P, Claus RA, Anker SD. 2007. Secretory sphingomyelinase is

- upregulated in chronic heart failure: a second messenger system of immune activation relates to body composition, muscular functional capacity, and peripheral blood flow. *Eur Heart J*, 28 (7):821-828.
- Doulet N, Donnadiou E, Laran-Chich M, Niedergang F, Nassif X, Couraud P, Bourdoulous S. 2006. Neisseria meningitidis infection of human endothelial cells interferes with leukocyte transmigration by preventing the formation of endothelial docking structures. *J Cell Biol*, 173 (4):627-637.
- Edwards R, Taylor G, Ferguson M, Murray S, Rendell N, Wrigley A, Bai Z, Boyle J, Finney S, Jones A, Russell H, Turner C, Cohen J, Faulkner L, Sriskandan S. 2005. Specific C-terminal cleavage and inactivation of interleukin-8 by invasive disease isolates of *Streptococcus pyogenes*. *J Infect Dis*, 192 (5):783-790.
- Ehrnhoefer D. 2009. IFRD1 modulates disease severity in cystic fibrosis through the regulation of neutrophil effector function. *Clin Genet*, 76 (2):148-149.
- Erdei J, Forsgren A, Naidu A. 1994. Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 62 (4):1236-1240.
- Essani N, Bajt M, Farhood A, Vonderfecht S, Jaeschke H. 1997. Transcriptional activation of vascular cell adhesion molecule-1 gene in vivo and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock. *J Immunol*, 158 (12):5941-5948.
- Feng D, Nagy J, Pyne K, Dvorak H, Dvorak A. 1998. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med*, 187 (6):903-915.
- Futerman A, Hannun Y. 2004. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep*, 5 (8):777-782.
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernandez-Checa JC. 2003. Defective TNF-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest*, 111 (2):197-208.
- Grassme H, Becker KA, Zhang Y, Gulbins E. 2008. Ceramide in bacterial infections and cystic fibrosis. *Biol Chem*, 389 (11):1371-1379.
- Grassmé H, Cremesti A, Kolesnick R, Gulbins E. 2003. Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene*, 22 (35):5457-5470.
- Gregory S, Wing E. 2002. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. *J Leukoc Biol*, 72 (2):239-248.
- Gu Y, Harley IT, Henderson LB, Aronow BJ, Vietor I, Huber LA, Harley JB, Kilpatrick JR, Langefeld CD, Williams AH, Jegga AG, Chen J, Wills-Karp M, Arshad SH, Ewart SL, Thio CL, Flick LM, Filippi MD, Grimes HL, Drumm ML, Cutting GR, Knowles MR, Karp CL. 2009. Identification of IFRD1 as a modifier gene for cystic fibrosis lung disease. *Nature*, 458 (7241):1039-1042.
- Gulbins E, Kolesnick R. 2003. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene*, 22 (45):7070-7077.
- Gulbins E, Dreschers S, Wilker B, Grassme H. 2004. Ceramide, membrane rafts and infections. *J Mol Med*, 82 (6):357-363.
- Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Bayoumy S, Garzotto M, McLoughlin M, Gallily R, Edwards Cr, Schuchman E, Fuks Z, Kolesnick R. 1997. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med*, 186 (11):1831-1841.
- Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279 (5350):509-514.
- Han D, Shen T, Guan J. 2001. The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signaling molecules and potential cellular functions. *Oncogene*, 20 (44):6315-6321.
- Haslett C. 1997. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. *Br Med Bull*, 53 (3):669-683.

- Hechtman D, Cybulsky M, Fuchs H, Baker J, Gimbrone MJ. 1991. Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *J Immunol*, 147 (3):883-892.
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*, 8 (2):R19.
- Hewett J, Schultze A, VanCise S, Roth R. 1992. Neutrophil depletion protects against liver injury from bacterial endotoxin. *Lab Invest*, 66 (3):347-361.
- Horinouchi K, Erlich S, Perl DP, Ferlinz K, Bisgaier CL, Sandhoff K, Desnick RJ, Stewart CL, Schuchman EH. 1995. Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat Genet*, 10 (3):288-293.
- Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348 (2):138-150.
- Jaeschke H, Smith CW. 1997a. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol*, 61 (6):647-653.
- Jaeschke H, Hasegawa T. 2006. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int*, 26 (8):912-919.
- Jaeschke H, Farhood A, Smith C. 1991. Neutrophil-induced liver cell injury in endotoxin shock is a CD11b/CD18-dependent mechanism. *Am J Physiol*, 261 (6 Pt 1):G1051-1056.
- Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA. 1996. Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol*, 139 (2):213-226.
- Kai K, Komine K, Komine Y, Kuroishi T, Kozutsumi T, Kobayashi J, Ohta M, Kitamura H, Kumagai K. 2002. Lactoferrin stimulates A *Staphylococcus aureus* killing activity of bovine phagocytes in the mammary gland. *Microbiol Immunol*, 46 (3):187-194.
- Katoh H, Harada A, Mori K, Negishi M. 2002. Socius is a novel Rnd GTPase-interacting protein involved in disassembly of actin stress fibers. *Mol Cell Biol*, 22 (9):2952-2964.
- Koch T, Funk RH. 2001. [Cellular dysfunction in the pathogenesis of organ failure. New insights from molecular and cell biology]. *Anaesthesist*, 50 (10):742-749.
- Kolesnick RN, Goni FM, Alonso A. 2000. Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J Cell Physiol*, 184 (3):285-300.
- Kuemmel TA, Thiele J, Schroeder R, Stoffel W. 1997. Pathology of visceral organs and bone marrow in an acid sphingomyelinase deficient knock-out mouse line, mimicking human Niemann-Pick disease type A. A light and electron microscopic study. *Pathol Res Pract*, 193 (10):663-671.
- Kurose I, Yamada T, Wolf R, Granger D. 1994. P-selectin-dependent leukocyte recruitment and intestinal mucosal injury induced by lactoferrin. *J Leukoc Biol*, 55 (6):771-777.
- Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. 1996. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science*, 271 (5251):981-983.
- Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. 2005. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*, 62 (22):2549-2559.
- Legrand D, Pierce A, Ellass E, Carpentier M, Mariller C, Mazurier J. 2008. Lactoferrin structure and functions. *Adv Exp Med Biol*, 606:163-194.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*, 29 (4):530-538.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky M, Nourshargh S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7 (9):678-689.

- Ley K, Baker J, Cybulsky M, Gimbrone MJ, Luscinskas F. 1993. Intravenous interleukin-8 inhibits granulocyte emigration from rabbit mesenteric venules without altering L-selectin expression or leukocyte rolling. *J Immunol*, 151 (11):6347-6357.
- Li X, Klintman D, Liu Q, Sato T, Jeppsson B, Thorlacius H. 2004. Critical role of CXC chemokines in endotoxemic liver injury in mice. *J Leukoc Biol*, 75 (3):443-452.
- Lindner K, Uhlig U, Uhlig S. 2005. Ceramide alters endothelial cell permeability by a nonapoptotic mechanism. *Br J Pharmacol*, 145 (1):132-140.
- Liu P, Anderson R. 1995. Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J Biol Chem*, 270 (45):27179-27185.
- Luster AD. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, 338 (7):436-445.
- MacKinnon AC, Buckley A, Chilvers ER, Rossi AG, Haslett C, Sethi T. 2002. Sphingosine kinase: a point of convergence in the action of diverse neutrophil priming agents. *J Immunol*, 169 (11):6394-6400.
- Marathe S, Schissel S, Yellin M, Beatini N, Mintzer R, Williams K, Tabas I. 1998. Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J Biol Chem*, 273 (7):4081-4088.
- Mathias S, Peña L, Kolesnick R. 1998. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J*, 335 (Pt 3):465-480.
- Miyaji M, Jin Z, Yamaoka S, Amakawa R, Fukuhara S, Sato S, Kobayashi T, Domae N, Mimori T, Bloom E, Okazaki T, Umehara H. 2005. Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med*, 202 (2):249-259.
- Molnar RG, Wang P, Ayala A, Ganey PE, Roth RA, Chaudry IH. 1997. The role of neutrophils in producing hepatocellular dysfunction during the hyperdynamic stage of sepsis in rats. *J Surg Res*, 73 (2):117-122.
- Nobes CD, Lauritzen I, Mattei MG, Paris S, Hall A, Chardin P. 1998. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol*, 141 (1):187-197.
- Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne C, Kubes P. 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*, 203 (12):2569-2575.
- Ramaiah SK, Jaeschke H. 2007. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol*, 35 (6):757-766.
- Reddy RC, Standiford TJ. 2010. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr Opin Hematol*, 17 (1):18-24.
- Ring A, Stremmel W. 2000. The hepatic microvascular responses to sepsis. *Semin Thromb Hemost*, 26 (5):589-594.
- Sallmann F, Baveye-Descamps S, Pattus F, Salmon V, Branza N, Spik G, Legrand D. 1999. Porins OmpC and PhoE of *Escherichia coli* as specific cell-surface targets of human lactoferrin. Binding characteristics and biological effects. *J Biol Chem*, 274 (23):16107-16114.
- Sarrazin S, Adam E, Lyon M, Depontieu F, Motte V, Landolfi C, Lortat-Jacob H, Becharard D, Lassalle P, Delehedde M. 2006. Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, 1765 (1):25-37.
- Sawatzki G, Rich I. 1989. Lactoferrin stimulates colony stimulating factor production in vitro and in vivo. *Blood Cells*, 15 (2):371-385.
- Schenkel A, Mamdouh Z, Muller W. 2004. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol*, 5 (4):393-400.

- Scherpereel A, Depontieu F, Grigoriu B, Cavestri B, Tsiopoulos A, Gentina T, Jourdain M, Pugin J, Tonnel AB, Lassalle P. 2006. Endocan, a new endothelial marker in human sepsis. *Crit Care Med*, 34 (2):532-537.
- Schrick JJ, Vogel P, Abuin A, Hampton B, Rice DS. 2006. ADP-ribosylation factor-like 3 is involved in kidney and photoreceptor development. *Am J Pathol*, 168 (4):1288-1298.
- Signorelli P, Luberto C, Hannun Y. 2001. Ceramide inhibition of NF-kappaB activation involves reverse translocation of classical protein kinase C (PKC) isoenzymes: requirement for kinase activity and carboxyl-terminal phosphorylation of PKC for the ceramide response. *FASEB J*, 15 (13):2401-2414.
- Smith EL, Schuchman EH. 2008. The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *FASEB J*, 22 (10):3419-3431.
- Sorimachi K, Akimoto K, Hattori Y, Ieiri T, Niwa A. 1997. Activation of macrophages by lactoferrin: secretion of TNF-alpha, IL-8 and NO. *Biochem Mol Biol Int*, 43 (1):79-87.
- Springer TA. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76 (2):301-314.
- Takeda K, Akira S. 2007. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 14:Unit 14.12.
- Traeger T, Mikulcak M, Eipel C, Abshagen K, Diedrich S, Heidecke CD, Maier S, Vollmar B. 2010. Kupffer cell depletion reduces hepatic inflammation and apoptosis but decreases survival in abdominal sepsis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 22 (9):1039-1049.
- Uhlig S, Gulbins E. 2008. Sphingolipids in the lungs. *Am J Respir Crit Care Med*, 178 (11):1100-1114.
- 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.
- Vartanian K, Slottke R, Johnstone T, Casale A, Planck SR, Choi D, Smith JR, Rosenbaum JT, Harrington CA. 2009. Gene expression profiling of whole blood: comparison of target preparation methods for accurate and reproducible microarray analysis. *BMC Genomics*, 10:2.
- Vayssiere B, Zalcman G, Mahe Y, Mirey G, Ligensa T, Weidner KM, Chardin P, Camonis J. 2000. Interaction of the Grb7 adapter protein with Rnd1, a new member of the Rho family. *FEBS Lett*, 467 (1):91-96.
- Weigand M, Hörner C, Bardenheuer H, Bouchon A. 2004. The systemic inflammatory response syndrome. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 18 (3):455-475.
- Wong C, Heit B, Kubes P. 2010. Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation. *Cardiovasc Res*, 86 (2):183-191.
- Wong M, Xie B, Beatini N, Phu P, Marathe S, Johns A, Gold P, Hirsch E, Williams K, Licinio J, Tabas I. 2000. Acute systemic inflammation up-regulates secretory sphingomyelinase in vivo: a possible link between inflammatory cytokines and atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (15):8681-8686.
- Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. 2010. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol*, 17 (1):9-17.
- Zhang Y, Li X, Becker KA, Gulbins E. 2009. Ceramide-enriched membrane domains--structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 1788 (1):178-183.
- Zhou C, Cunningham L, Marcus AI, Li Y, Kahn RA. 2006. Arl2 and Arl3 regulate different microtubule-dependent processes. *Mol Biol Cell*, 17 (5):2476-2487.

Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn PD Dr. Ralf Alexander Claus. Er war nicht nur der initiale Ideengeber, sondern auch ein exzellenter Betreuer sowohl während der experimentellen Phase als auch während der Verfassung der vorliegenden Arbeit. Seine Tür stand mir jederzeit offen und für die wertvolle Unterstützung bin ich sehr dankbar.

Zudem möchte ich mich recht herzlich bei Frau Brigitte Specht und Frau Edith Walther für die hilfreiche Anleitung und tägliche Unterstützung während der Laborarbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich Frau Dipl. Ing. Iris Suckert, Herrn Dr. Gordon Otto sowie Frau Birgit Schikowski größte Dankbarkeit zukommen lassen. Ihre teure Unterstützung bei den Tierexperimenten weiß ich sehr zu schätzen.

Zudem gilt mein Dank all den Doktoranden, Diplomanden, Praktikanten und Mitarbeitern der Experimentellen Anästhesiologie. Vielen Dank für den täglichen Beistand und die hilfreichen Ratschläge!

Ein großer Dank geht an alle meine Freunde und Studienkollegen. Sie waren mir stets eine große Stütze und konnten mir nach so manchem langen Labortag noch ein Lachen abgewinnen.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht haben.

Vielen Dank!

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:

- PD Dr. rer. nat. med. habil. Ralf Alexander Claus
- Markus Bläss

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 wissenschaftlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 02.09.2010