

**TRANSKRIPTOMIK DER INFLAMMATION AN DER MAUS:
DIE LUNGE ALS AUSGANGSORGAN UND ALS ZIELORGAN DER
SEPSIS.**

Dissertation

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

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

von Martina Weber

geboren am 03. November 1973 in Kaiserslautern

FÜR LEVIN

„Mauern haben ihren Sinn. Sie geben uns die Chance zu zeigen, wie sehr wir etwas wollen.“

Randy Pausch, The last lecture.

Gutachter:

- 1.
- 2.
- 3.

Tag der öffentlichen Verteidigung

Abkürzungsverzeichnis

ANV	akutes Nierenversagen
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BRM	<i>bead resuspension mix</i>
CCL	<i>C-C motif ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cRNA	<i>complementary RNA</i>
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
CXCL	<i>C-X-C motif ligand</i>
DAMP	<i>danger-Associated Molecular Pattern</i>
DNA	<i>Desoxy-ribonucleic acid</i> , Desoxy-Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamid-Tetra-Acetat
G	Gauge, Größenangabe für Venenverweilkanülen
g	Mittlere Erdschwerebeschleunigung = 9,8 m/s ²
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GEDI	<i>Gene Expression Dynamics Inspector</i>
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ISG	Interferon stimulierte Gene
KBE	Kolonie bildende Einheit
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LBP	LPS-bindendes Protein
Log ₂ FC	Logarithmus der Expressionsveränderung (FC = <i>fold change</i>) zur Basis 2
LPS	Lipopolysaccharid
MD2	MD2-Protein, <i>lymphocyte antigen 96</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MODS	Multiorgan-Dysfunktionssyndrom
mRNA	<i>messenger-RNA</i> , Boten-RNA
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>

NO	Stickstoffmonoxid
p.a.	<i>pro analysi</i>
p.i.	<i>post infectionem</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii, potentia Hydrogenii</i> , negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenaktivität
PRR	Mustererkennungsrezeptor, <i>pattern recognition receptor</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen/min
rRNA	ribosomale RNA
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SMB	<i>streptavidin magnetic beads</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
THB	<i>Todd Hewitt Broth</i>
TIRAP	<i>TIR-domain-containing adaptor-protein, MyD88-like adaptor</i>
TIR-Domäne	Toll/IL-1 Rezeptor zytoplasmatische Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-Domain-containing adaptor-inducing interferon beta</i>
β-HMG-CoA	β-Hydroxy-Methyl-Glutaryl-Coenzym A

Genbezeichnungsverzeichnis

(x)	steht für eine austauschbare Zahl, um Redundanzen zu vermeiden
Actb	<i>actin beta</i> , Beta-Aktin
Ap1	<i>activator protein 1</i>
Ccl (x)	<i>chemokine (C-C motif) ligand (x)</i>
Ccr5	<i>chemokine (C-C motif) receptor 5</i>
Ccr12	<i>chemokine (C-C motif) receptor-like 2</i>
Cd40	<i>Cd40 molecule, TNF receptor superfamily member 5</i>
Cd53	<i>Cd53 molecule</i>
Cd69	<i>Cd69 molecule</i>
Cd80	<i>Cd80 molecule</i>
Cd86	<i>Cd86 molecule</i>
Cxcl (x)	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand (x)</i>
Cyp51	Cytochrom P450, Familie 51
Dhcr24	24-Dehydrocholesterol Reduktase
Dhcr7	7-Dehydrocholesterol Reduktase
F10	<i>coagulation factor X</i> ; Gerinnungsfaktor X
F13a1	<i>coagulation factor XIII, a1 polypeptide</i> ; Gerinnungsfaktor XIII
Fas	Fas Rezeptor; <i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6</i>
Fdps	Farnesyldiphosphat Synthetase
Hif1a	<i>hypoxia inducible factor 1, alpha subunit</i>
Hmgcr	β -Hydroxy-Methyl-Glutaryl-Coenzym A-Reduktase
Hpx	<i>hemopexin</i> , Hämopexin
Hsd17b7	Hydroxysteroid (17-Beta) Dehydrogenase 7
Icam1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
Ifi204	Ifi16; <i>interferon gamma-inducible protein 16</i>
Ifi205	Ifi16; <i>interferon gamma-inducible protein 16</i>
Ifi47	<i>interferon gamma-inducible protein 47</i>
Ifit (x)	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats (x)</i>
Ifng	<i>interferon, gamma</i>
Ikbke	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon</i>
Il (x)	Interleukin (x)
Il10ra	<i>interleukin 10 receptor, alpha</i>
Il1b	<i>interleukin 1, beta</i>
Il1r2	<i>interleukin 1 receptor, type II</i>

Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist
Il8rb	<i>interleukin 8 receptor, beta</i>
Irf (x)	<i>interferon regulatory factor (x)</i>
Jun	<i>jun oncogene</i>
Lbp	<i>lipopolysaccharide binding protein</i>
Lss	Lanosterol Synthase
Mvd	Mevalonat Decarboxylase
Mvk	Mevalonat Kinase
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
Nfkb	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
Nfkbib	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta</i>
Nfkbie	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon</i>
Nfkbiz	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta</i>
Nsdhl	<i>NAD(P)-dependent steroid dehydrogenase-like</i>
Pmvk	Phosphomevalonat Kinase
Ptx3	<i>pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta</i>
Rsad1	<i>radical S-adenosyl methionine domain containing 1, Viperin</i>
Saa1	<i>serum amyloid A1</i>
Saa3	<i>serum amyloid A3</i>
Sc4mol	<i>Sterol-C4-methyl-oxidase-like</i>
Sc5d	<i>Sterol-C5-desaturase(fungal ERG3, Delta-5-desaturase) homolog (S.cerevisiae)</i>
Selp	<i>selectin p, Selektin P</i>
Socs3	<i>suppressor in cytokine signaling3</i>
Sqle	Squalen Epoxidase
Srebf (x)	<i>sterol regulatory element binding transcription factor (x)</i>
Stat (x)	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tgfb1	<i>transforming growth factor, beta-induced, 68kDa</i>
Tlr (x)	<i>toll-like receptor, Toll-like Rezeptor</i>
Tm7sf2	<i>Transmembrane 7 superfamily member</i>
Tnf	<i>tumor necrosis factor</i>
Tnfrsf1a	<i>tumor necrosis factor superfamily receptor, member 1a</i>

Annotierungsstand Mai 2008

Zusammenfassung

Hintergrund Die Sepsis ist die führende Todesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen. Täglich sterben weltweit etwa 1.400 Menschen an den Folgen des septischen Schocks und nachfolgender Multiorgandysfunktion. Ein entscheidender Faktor, welcher wesentliche Fortschritte in der Therapie der Sepsis behindert, ist das lückenhafte Wissen über die Interaktionen der zahlreichen auslösenden Erreger mit dem Wirtsimmunsystem sowie der Organsysteme untereinander.

Fragestellung Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen der vorliegenden systembiologischen, Hypothesen generierenden Arbeit die Frage bearbeitet werden, in welchem Maße sich die Genexpressionsmuster von Lunge, Leber, Milz und des Blutes bei Sepsis unterschiedlicher Genese unterscheiden. Hierzu wurden in einer *Microarray* basierten Analyse die Expressionsprofile der Organe in einem *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie-Modell mit denen eines polymikrobiellen Peritonitis-Modells der Maus bezüglich Infektionsfokus und –art verglichen. Weiterhin sollte die Genexpression der Lunge als Ausgangsorgan der Sepsis bei Pneumonie sowie als Zielorgan der Sepsis bei Peritonitis genauer analysiert und mit der Genexpression der Leber in beiden Infektionsmodellen verglichen werden.

Methodik Weibliche C57/BL/6 Jackson Mäuse (Alter: acht Wochen) wurden auf folgende experimentelle Gruppen aufgeteilt: polymikrobielle Peritonitis durch intra-peritoneale Injektion von 200µl einer humanen Faeces-Suspension, pulmonale Infektion durch intratracheale Instillation von hochvirulentem Serotyp 2 *S. pneumoniae* (D39) sowie adäquate Kontrollgruppen. Die Organ- und Blutentnahme erfolgte nach jeweils 6 und 24 Stunden. Für die Genexpressionsanalysen wurden *Whole-Genome BeadChips* (Mouse WG-6 v2.0) der Firma Illumina[®] verwendet. Die Expressionsveränderungen von Leber, Lunge, Milz und Blut wurden zunächst auf Ähnlichkeit sowie auf signifikante Anreicherung von Transkripten für Proteine aus definierten Signal- oder Stoffwechselwegen der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) untersucht. Weiterhin wurden vergleichende Analysen regulierter Gene bei *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie sowie bei polymikrobieller Peritonitis für die Organe Lunge und Leber durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion Die gemeinsame Analyse beider Infektionsmodelle für alle untersuchten Organsysteme identifizierte signifikant koexprimierte Signal- und Stoffwechselwege. Hierbei zeigten sich wesentliche Komponenten der Immunantwort (Komplement- und Gerinnungssystem, Regulation des Aktinzytoskeletts) sowie des

Zellmetabolismus und Energiestoffwechsels (Zellzyklus, DNA-Replikation, Ribosom, Proteasom, oxidative Phosphorylierung) als maßgeblich an der pathophysiologischen Sequenz der Sepsis unterschiedlicher Ursache beteiligt.

In Leber, Milz und Blut zeigten sich deutlich unterschiedliche Transkriptionsmuster im Vergleich beider Infektionsmodelle. Auch innerhalb der experimentellen Gruppe der *S. pneumoniae*-induzierten **Pneumonie** ergaben sich jeweils abweichende Transkriptionsmuster für Leber, Milz und Blut. Hierbei könnte die im Verlauf der Pneumonie getriggerte systemische Entzündungsreaktion möglicherweise abhängig vom Mikromilieu der jeweiligen Organe unterschiedliche Transkriptionsmuster hervorgerufen haben. Diese könnten auch durch eine vom Mikromilieu der Organe beeinflusste, veränderte Expression von Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren der Erreger hervorgerufen worden sein. Für die **Peritonitis** konnte hingegen eine synchrone systemische Reaktion aller untersuchten Organsysteme auf Transkriptomebene nachgewiesen werden, wobei sich das Transkriptom zum jeweils frühen bzw. jeweils späten Zeitpunkt der Infektion in allen Organen sehr ähnlich verhielt. Hierbei könnte der polymikrobielle Charakter der Infektion zu einer Überlagerung der jeweiligen erregerspezifischen Wirtstranskriptome geführt haben.

Die **Lunge** nahm im Vergleich zu den übrigen untersuchten Organsystemen eine Sonderstellung ein, da sie keine infektionsspezifische Reaktion des Transkriptoms zeigte. Vielmehr fiel sie durch ein weitgehend robustes Reaktionsmuster im Sinne einer ausgeprägten *common host response* oder allgemeinen Alarmreaktion in beiden Infektionsmodellen auf. Hierbei schien neben weiteren klassischen Komponenten der angeborenen Immunantwort vor allem die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten sowie mononukleärer Zellen eine Rolle zu spielen. Der Nachweis einer spezifischen Induktion der Steroidbiosynthese auf Transkriptomebene im Organ Leber bei *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie könnte auf mögliche spezifische metabolische Reaktionsmuster der Leber im Rahmen der Immunantwort hinweisen.

Schlussfolgerungen Diese Ergebnisse geben neue Einblicke in die pathophysiologische Sequenz der Sepsis aus systembiologischer Sicht und heben zugleich die „Limitationen“ und „Potentiale“ der Organe Lunge und Leber im Verlauf der Sepsis unterschiedlicher Genese hervor. Hierdurch ergibt sich eine Vielzahl neuer Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen zur Organprotektion bei Sepsis.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
GENBEZEICHNUNGSVERZEICHNIS	III
ZUSAMMENFASSUNG	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 SEPSIS UND MULTIORGANVERSAGEN	1
1.2 DIE PATHOGENESE DER ORGANDYSFUNKTION BEI SEPSIS	2
1.3 DIE ANTWORT DER LEBER AUF SEPSIS	3
1.4 DIE IMMUNANTWORT DER LUNGE	7
1.5 PNEUMONIE UND PERITONITIS: HÄUFIGE AUSLÖSER SEPTISCHER ERKRANKUNGEN UND SEPTISCHER KOMPLIKATIONEN IM KLINISCHEN ALLTAG	9
1.5.1 Die <i>S. pneumoniae</i> -induzierte <i>Pneumonie</i>	9
1.5.2 Die <i>sekundäre Peritonitis</i>	13
1.6 DIE ANGEBORENE IMMUNANTWORT BEI INFEKTION UND SEPSIS	13
1.6.1 <i>Mustererkennungsrezeptoren</i>	13
1.6.2 <i>Inflammasom</i>	15
1.6.3 <i>Mechanische und chemische Barrieren</i>	16
1.6.4 <i>Zytokine</i>	16
1.6.5 <i>Das Komplementsystem</i>	17
1.6.6 <i>Leukozytenrekutierung, Transmigration und Phagozytose</i>	17
1.6.7 <i>Gerinnungssystem</i>	18
1.7 <i>COMMON HOST RESPONSE</i> UND ERREGERSPEZIFISCHE ANTWORT DES ANGEBORENEN IMMUNSYSTEMS	19
1.8 <i>SINGLE-GENE</i> HYPOTHESENGETRIEBENE VERSUS SYSTEMBIOLOGISCHE, HYPOTHESEN GENERIERENDE AUSWERTUNGSSTRATEGIEN <i>MICROARRAY</i> GENERierter DATENSÄTZE.....	20
2 ZIELE DER ARBEIT	22
3 MATERIAL UND METHODIK	23
3.1 STUDIENDESIGN.....	23
3.2 TIEREXPERIMENTE.....	25
3.2.1 <i>Versuchstiere</i>	25
3.2.2 <i>Anästhesie</i>	25
3.2.3 <i>Polymikrobielle Peritonitis</i>	26

3.2.4	<i>S. pneumoniae</i> -induzierte <i>Pneumonie</i>	26
3.2.5	<i>Blut- und Organentnahme</i>	26
3.2.6	<i>Zellzählung in der bronchoalveolären Lavage (BAL)</i>	27
3.2.7	<i>Keimzahlbestimmung in der Lunge</i>	28
3.3	EINGESETZTE BIOLOGISCHE MATERIALIEN.....	28
3.3.1	<i>Humane Faeces</i>	28
3.3.2	<i>S. pneumoniae Serotyp 2 (D39)</i>	29
3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODIK.....	29
3.4.1	<i>RNA-Isolation aus Gewebe</i>	29
3.4.2	<i>RNA-Isolation aus Vollblut</i>	30
3.4.3	<i>Globin-clear Prozedur</i>	32
3.4.4	<i>RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle</i>	33
3.4.5	<i>Charakteristik des eingesetzten Microarrays</i>	35
3.4.6	<i>RNA-Amplifikation und Labeling</i>	36
3.4.7	<i>Hybridisierung, Färben und Waschen der Microarrays</i>	40
3.5	STATISTISCHE ANALYSEN UND BIOINFORMATISCHE ANALYSEN	42
3.5.1	<i>Organ übergreifender Gesamtvergleich</i>	42
3.5.2	<i>Einzelorgananalyse</i>	44
4	ERGEBNISSE	46
4.1	TIEREXPERIMENTE.....	46
4.1.1	<i>Obduktionsergebnisse 24 Stunden nach Induktion der polymikrobiellen Peritonitis</i>	46
4.1.2	<i>Keimzahlbestimmung in der Lunge bei S. pneumoniae-induzierter Pneumonie</i>	46
4.1.3	<i>Zellzahlen in der bronchoalveolären Lavage bei Pneumonie</i>	47
4.2	QUALITÄTSKONTROLLE UND NORMALISIERUNG DER MICROARRAYS	48
4.2.1	<i>Interne Kontrollen</i>	48
4.2.2	<i>Externe Kontrollen</i>	48
4.3	ORGAN ÜBERGREIFENDE ANALYSEN	51
4.3.1	<i>Dendrogramm aller Organe, Infektionsarten und Infektionszeitpunkte</i>	51
4.3.2	<i>Die molekulare Signatur aller Organe und Konditionen anhand der GEDI-Merkmalkarten</i>	53
4.3.3	<i>Signifikant koexprimierte Signal- und Stoffwechselwege</i>	57
4.3.4	<i>KEGG-Kategorie der Steroidbiosynthese</i>	58

4.4	EINZELORGANANALYSE: TRANSKRIPTOM DER LUNGE ALS AUSGANGS- UND ZIELORGAN DER SEPSIS IM VERGLEICH ZUR LEBER.....	62
4.4.1	<i>Zuordnung der Schnittmengen und Mengen im Venn Diagramm</i>	63
4.4.2	<i>Venn Diagramme der Lunge</i>	64
4.4.3	<i>Venn Diagramme der Leber</i>	66
4.4.4	<i>Gene Set Enrichment Analyse der Schnittmengen</i>	67
5	DISKUSSION	72
5.1	WERTUNG DER METHODIK.....	73
5.1.1	<i>Tiermodelle</i>	73
5.1.2	<i>Auswertungsstrategien der Genexpressionsanalysen</i>	74
5.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	76
5.2.1	<i>Die molekulare Signatur der Organe bei Sepsis unterschiedlicher Genese ...</i>	76
5.2.2	<i>Aktiviert transkriptomische Programme bei Sepsis</i>	81
5.2.3	<i>Steroid- und Cholesterolbiosynthese bei Sepsis</i>	84
5.2.4	<i>Selektive protektive Wirtsantwort, Reprogrammierung oder Akut Phase Antwort</i>	89
5.2.5	<i>Sonderstatus der Lunge im Vergleich zur Leber</i>	91
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN	96
7	LITERATURVERZEICHNIS	98
8	ANHANG	118
9	DANKSAGUNG	121
10	LEBENS LAUF	122
11	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	126

1 Einleitung

1.1 Sepsis und Multiorganversagen

Die Sepsis repräsentiert die führende Todesursache auf nichtkardiologischen Intensivstationen in der Bundesrepublik Deutschland, wobei die Entwicklung eines Multi-Organ-Dysfunktionssyndroms (MODS) den Prognose bestimmenden Faktor darstellt (Moerer et al. 2002). Ein MODS ist die häufigste Ursache für Morbidität und Sterblichkeit auf Intensivstationen (Deitch 1992, Beal und Cerra 1994, Marshall et al. 1995, Vincent et al. 1998, Vincent et al. 2006). Es ist charakterisiert als eine progressive, potentiell reversible Dysfunktion in zwei oder mehr Organen oder Organsystemen, welche durch eine Reihe akuter Insulte, wie Sepsis und schwere Infektionen, Schock, Trauma, Verbrennungen und Pankreatitis entsteht (Wang und Ma 2008). Als infektiöse Auslöser sind häufig Pneumonien oder Peritonitiden zu finden (Marshall 2001). Laut epidemiologischen Studien in den USA und Europa sind Atemwegsinfektionen mit über 60%, gefolgt von intra-abdominellen Infektionen der häufigste Fokus bei Patienten mit schwerer Sepsis (Martin et al. 2003, Vincent et al. 2006, Engel et al. 2007). Eine aktuelle spanische Multicenterstudie bestätigte ebenfalls die Pneumonie mit 43% als häufigste Ursache schwerer Septitiden, gefolgt von intra-abdominellen Infektionen nicht chirurgischer Ursache (ca. 22%) (Blanco et al. 2008). Die Prognose bei Patienten mit septischem MODS ist trotz eines verbesserten maschinellen Organersatzes schlecht und erfordert erhebliche personelle und finanzielle Ressourcen (Marshall et al. 1995, Moerer et al. 2002). Ein technisch verbesserter Support konnte bislang auch bei septisch bedingten Einzelorganversagen noch nicht den entscheidenden Prognose verbessernden Durchbruch erzielen. Dies gilt insbesondere im Bereich des Leberorgansupports (Bauer et al. 2004). Die Prävalenzstudie des Kompetenznetzes Sepsis identifizierte zudem das septisch bedingte akute Nierenversagen (ANV) als einen signifikant unabhängigen Risikofaktor der Letalität. In dieser Studie wiesen Patienten mit schwerer Sepsis eine Gesamt-Krankenhaussterblichkeit von 55.2% auf. Bei Patienten mit ANV lag die Krankenhaussterblichkeit bei 67.5%. Patienten ohne ANV zeigten eine signifikant niedrigere Krankenhausletalität von 42.8% (Oppert et al. 2008). Obwohl die individuelle Sequenz der betroffenen Organe aufgrund jeweils vorbestehender Erkrankungen und des unterschiedlichen auslösenden Insultes variieren kann, so lässt sich doch eine vorherrschende Reihenfolge von einer Dysfunktion betroffener Organe erkennen. Hierbei

imponiert die Lunge als das am häufigsten betroffene Organ (Wickel et al. 1997). Gefolgt wird diese von Gerinnungssystem, Leber, Niere, Darmtrakt und Herz (Deitch 1992, Wickel et al. 1997). In mehreren Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass die Leber aufgrund ihrer hervorstechenden Rolle sowohl im Metabolismus als auch in der Erregerabwehr ein zentrales Organ bei der Initiierung eines MODS darstellt (Wang und Chaudry 1996, Ring und Stremmel 2000, Dhainaut et al. 2001, Marshall 2001). Dem Darmtrakt wird eine Rolle als „Motor der systemischen Inflammation“ zugeschrieben. Hierbei wird eine Störung der Darmbarrierefunktion kontrovers diskutiert. Uneinigkeit herrscht auch über die Art der Translokation intestinaler Komponenten. Während einige Autoren die direkte Translokation von Darmbakterien in die systemische Zirkulation favorisieren, gehen andere Autoren von der Translokation aus dem Darm stammender biologisch aktiver Substanzen über intestinale Lymphknoten aus (*gut-lymph hypothesis*) (Doig et al. 1998, Fink und Delude 2005, Deitch et al. 2006, Senthil et al. 2006).

1.2 Die Pathogenese der Organdysfunktion bei Sepsis

Während traditionelle Modelle der Wirt-Pathogen Interaktion die Morbidität bei Sepsis allein der direkten zytotoxischen Wirkung der Mikroorganismen auf Wirtszellen zuschrieben, gehen neuere Untersuchungen von einer durch überschießende Wirtsreaktionen entstehenden Organschädigung aus. In den 90er Jahren wurde die Hypothese des „Zytokinsturmes“ als Ursache der Sepsis aufgestellt. Hierbei wurde sowohl die rasche und überschießende Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren (z.B. TNF- α , IL-1, IL-6) (Cavaillon und Annane 2006) als auch die Freisetzung zahlreicher anti-inflammatorischer Mediatoren und Antagonisten pro-inflammatorischer Mediatoren (z.B. IL-10, IL-4, TGF- β , löslicher TNF-Rezeptor, IL-1 Rezeptor Antagonist) (Fischer et al. 1992, Girardin et al. 1992, Marchant et al. 1994, Marie et al. 1996) als pathogenetische Grundlage des MODS bewertet. Dieser Zustand wird auch als „immunologische Dissonanz“ der Reaktion auf einen schädigenden Stimulus erachtet (Bone et al. 1997, Kox et al. 1997). Cavaillon und Annane (2006) beschreiben zudem eine „Kompartimentalisierung“ der Immunantwort. Neutrophile Granulozyten verhalten sich mitunter verschieden in unterschiedlichen Organen. Es konnte gezeigt werden, dass sich der Immunstatus zirkulierender neutrophiler Granulozyten deutlich von dem am Infektionsfokus vorliegender neutrophiler Granulozyten unterscheidet (Cavaillon und Annane 2006). Insbesondere die Art der Schädigung, die zelluläre Zusammensetzung des betroffenen Kompartiments und das „*microenvironment*“ haben entscheidenden Einfluss

auf die lokale Entzündung und Gewebsschädigung (Shenkar und Abraham 1999, Abraham et al. 2001, Ayala et al. 2002, Coldren et al. 2006). Eine kompartimentalisierte „Stilllegung“ spezifischer pro-inflammatorischer Gene (McCall und Yoza 2007) resultiert nach Auffassung von Cavaillon et al. (2005) aus einer adaptierten Reprogrammierung von Leukozyten (*leukocyte reprogramming*) (Cavaillon et al. 2005).

Am Beispiel der „Lipopolysaccharid (LPS)-Toleranz“ konnte gezeigt werden, dass bestimmte „tolerierbare“ Gene (z.B. pro-inflammatorische Mediatoren) vorübergehend abgeschaltet werden können um eine überschießende Immunantwort zu verhindern, wohingegen wiederum andere so genannte „nicht-tolerierbare“ Gene (z.B. antimikrobielle Effektoren) induzierbar bleiben. (Foster et al. 2007). Hierbei ist die Induktion dieser Toleranz wiederum entscheidend von der Schwere der primären Schädigung abhängig (Takahashi et al. 2004). Für *S. pneumoniae* konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit des infizierten Organs unterschiedliche Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren exprimiert werden können (Orihuela et al. 2004) und dass diese wiederum eine spezifische Beeinflussung des Wirtstranskriptoms hervorrufen können, was auch als Reprogrammierung bezeichnet wird (Hossain et al. 2006).

Generell wird davon ausgegangen, dass die organschädigende Wirkung im Rahmen der Sepsis durch eine aus dem Gleichgewicht geratene Interaktion primär protektiver Wirtsmechanismen entsteht. Hier sind die Systemkomplexe des Gerinnungs- und Komplementsystems, des Gefäß- und neuro-endokrinen Systems, sowie des angeborenen und adaptiven Immunsystems zu nennen (Rittirsch et al. 2008). Diese werden durch Erregerkomponenten sowie deren Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren aktiviert und eine verstärkte Expression oder Suppression einzelner Bausteine des komplizierten Abwehrsystems führt zu unerwünschtem Kollateralschaden am Wirtsgewebe. Potenziert werden diese Effekte durch die direkte schädigende Wirkung einiger Pathogenitätsfaktoren, wie beispielsweise des Pneumolysins bei Infektionen mit *S. pneumoniae* (Jedrzejak 2001). Die Ausgewogenheit der jeweiligen Systeme spielt somit eine entscheidende Rolle hinsichtlich einer effektiven Erregerbekämpfung bei gleichzeitiger Minimierung des Kollateralschadens im Wirtsorganismus (Rittirsch et al. 2008).

1.3 Die Antwort der Leber auf Sepsis

Die Leber ist ein Schlüsselorgan bei Sepsis (Dhainaut et al. 2001) und spielt aufgrund ihrer Funktion als „Akteur“ und als „Opfer“ in der Inflammation eine duale Rolle. Die Leber

bezieht 25% des vom Herzen ausgeworfenen Blutvolumens, wobei der portale Blutfluss aus dem splanchniko-mesenterialen Gefäßbett eine wesentliche Rolle spielt. Die Splanchnikusregion ist besonders gefährdet für vasokonstriktionsbedingte Bakterientranslokationen im Rahmen der Sepsis.

Die Hauptzellarten der Leber sind Hepatozyten, Kupffer-Zellen sowie Sternzellen und endotheliale Sinusoidalzellen, welche alle in die Immun- und metabolischen Antworten bei Sepsis durch vielfältige interzelluläre Interaktion und Kommunikation eingebunden sind (Dhainaut et al. 2001, Kmiec 2001, Friedman 2008, Baratta et al. 2009). Als im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion agierendes Organ ist die Leber das Hauptorgan der Bakterien clearance, der Inaktivierung bakterieller Produkte sowie der Produktion aber auch Entfernung entzündlicher Mediatoren aus dem Blutstrom (Cerra 1987). Dieser Prozess findet über die Kupffer-Zellen der Leber statt, welche 70% der Gesamtmakrophagenpopulation des Körpers repräsentieren (Dhainaut et al. 2001). Sie stellen die primäre Verteidigungslinie gegen portale Bakteriämie und Endotoxinämie dar und hindern sowohl Bakterien (Katz et al. 1991) als auch Endotoxine (Mathison und Ulevitch 1979) am Übertritt in die systemische Zirkulation. Nach Aktivierung produzieren sie pro-inflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-6, G-CSF, IL-12, IL-18, GM-CSF) (Groopman et al. 1989, Freudenberg und Galanos 1991, Wakabayashi et al. 1991, Van Zee et al. 1991, Dhainaut et al. 2001), welche wiederum der Gegenregulation durch anti-inflammatorische Zytokine (löslicher TNF-Rezeptor, IL-1 Rezeptorantagonist, IL-4, IL-10 und TGF- β) unterliegen (Fischer et al. 1992, Girardin et al. 1992, Marchant et al. 1994, Marie et al. 1996, Dhainaut et al. 2001). Die von den Kupffer-Zellen produzierten und sezernierten Zytokine regulieren parakrin die Funktion der Hepatozyten, Endothelzellen sowie Sternzellen und gelangen in die systemische Zirkulation (Fong et al. 1990). Andererseits stellen Kupffer-Zellen wichtige Pfortner dar, welche einen Übertritt der aus der portalen Zirkulation stammenden Mediatoren, Zytokine und toxischen Produkte in die systemische Zirkulation limitieren. Hierdurch üben sie einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der systemischen Entzündungsreaktion aus (Andus et al. 1991). In diesem Zusammenhang ist wichtig zu erwähnen, dass die Serumkonzentrationen inflammatorischer Mediatoren in der Regel nicht zwingend die im jeweiligen Organ vorliegenden parakrin wirkenden Mediatorenspiegel wiedergeben (Fong et al. 1990, Ulich et al. 1992).

Hepatozyten spielen sowohl eine Rolle im Rahmen der Immunantwort als auch in der Anpassung des Leberzellstoffwechsels an die speziellen Gegebenheiten während der

Entzündungsreaktion. Sie tragen Rezeptoren für zahlreiche Mediatoren, wie beispielsweise TNF- α , IL-6 und IL-1 und können als Reaktion auf den entzündlichen Stimulus die vorherrschenden Stoffwechselwege modifizieren (Andus et al. 1991). So kommt es zu einer erhöhten Aminosäureaufnahme und Glukoneogenese sowie zu einer verstärkten Synthese und Freisetzung von anti-proteolytischen Akut-Phase Proteinen (z.B. C-reaktives Protein), ebenso wie Gerinnungs- und Komplementfaktoren im Rahmen der Entzündungsreaktion. Akut-Phase Proteine spielen eine wesentliche Rolle bei der Organprotektion, da sie u.a. die von rekrutierten Leukozyten im Übermaß sezernierten Elastasen und Proteasen neutralisieren können (Weiss 1989). Die Akut-Phase Reaktion trägt allerdings auch zur Entstehung eines pro-koagulatorischen Milieus bei. So wird unter anderem die Expression von *tissue factor*, dem initialen Aktivator der extrinsischen Gerinnungskaskade über die Wirkung von C-reaktivem Protein aktiviert (Vervloet et al. 1998). Zusätzlich kommt es zur Aktivierung der Komplementkaskade, worüber indirekt die pro-koagulatorische Wirkung verstärkt wird.

Aktivierte Sternzellen können durch Produktion von Chemokinen sowie Rekrutierung monozytärer Zellen und neutrophiler Granulozyten die Immunantwort verstärken (Paik et al. 2003). Sternzellen exprimieren unter anderem Toll-like Rezeptoren (TLR) (Paik et al. 2003) und können somit durch Pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMP), wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) oder Lipoteichonsäure und Peptidoglykane direkt aktiviert werden (Brun et al. 2005). Ebenso fungieren sie als Antigen präsentierende Zellen und stellen eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem dar (Unanue 2007).

Die Endothelzellen der Sinusoide tragen durch ihre IL-1 und IL-6 Produktion ebenfalls zur pro-koagulatorischen und pro-inflammatorischen Aktivität bei Sepsis bei. Ebenso kommt es im Rahmen der endothelialen Entzündungsreaktion zu einer vermehrten Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). Einerseits wird NO als der wesentliche Mediator der frühen Phase des septischen Schocks angesehen (Iskit und Guc 2003) und es werden ihm gewebsschädigende Einflüsse zugeschrieben (Li und Billiar 1999, Sakaguchi und Furusawa 2006). Andererseits werden NO zytoprotektive Effekte bei oxidativem Stress zugeschrieben. Hierbei scheint die Menge des produzierten NO eine wesentliche Rolle zu spielen: hohe Konzentrationen von NO führen zu zytotoxischen Effekten, wohingegen niedrige Konzentrationen eher protektive Effekte aufweisen (Li und Billiar 1999, Sakaguchi und Furusawa 2006).

Die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten aus der systemischen Zirkulation spielt ebenso eine Rolle bei der Erregerabwehr der Leber. Von einigen Autoren wird über einen wichtigen Beitrag neutrophiler Granulozyten zum septischen Leberschaden berichtet wird (Holman und Saba 1988, Malmros et al. 1994, Chen et al. 2000, Chen et al. 2006). Im Gegensatz hierzu konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass die Sepsis induzierte Hypoperfusion (Derikx et al. 2007) sowie direkte zytopathische Effekte inflammatorischer Mediatoren (Bohlinger et al. 1996) die größte Rolle im Rahmen der septischen Leberschädigung spielen und der Neutrophilenadhäsion keine wesentliche Bedeutung zukommt (Fukatsu et al. 1999). Beispielsweise konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine TNF- α vermittelte DNA-Fragmentierung nach LPS-Gabe stattfindet, welche zu direkter Zellnekrose führt (Bohlinger et al. 1996).

Es wird vermutet, dass die Leber eine wesentliche Rolle bei der Detoxifikation von LPS spielt (Ramakers et al. 2009). In einem Ratteninfektions-Modell konnte gezeigt werden, dass bereits 5 Minuten nach Injektion radioaktiv markierter *E. coli* Bakterien über die Schwanzvene eine Anreicherung von 77% der verabreichten Bakterien-Menge in der Leber stattfindet (Katz et al. 1991). Eine Anhäufung von Endotoxin in der Leber trägt auch wesentlich zur Unterhaltung des entzündlichen und zellschädigenden Milieus bei (Han 2002).

Die „Opferrolle“ der Leber resultiert einerseits aus der im Rahmen der Sepsis entstehenden Minderperfusion der Leber (primäre Dysfunktion) sowie andererseits aus den innerhepatisch pro-inflammatorisch aktiven Zellen und Mediatoren, welche im Zuge der Erregerabwehr einen erheblichen Kollateralschaden am Leberparenchym induzieren können. Im Rahmen einer solchen sekundären hepatischen Dysfunktion, welche teilweise schleichend vonstatten geht, kommt es zu einem „Überlaufen“ bakterieller sowie inflammatorischer Mediatoren in die systemische Zirkulation bei zunächst noch unauffälliger Leberrestfunktion (Cerra et al. 1979, Bankey und Cerra 1992, Dhainaut et al. 2001). Diese Schädigungen können jedoch die Entstehung einer Multiorgandysfunktion begünstigen oder weiter vorantreiben. Entscheidend hierfür ist insbesondere die Koinzidenz mit einer beeinträchtigten Splanchnikusperfusion (Deitch 1992, Doig et al. 1998). In diesem Zusammenhang wird sowohl eine resultierende bakterielle Translokation (Deitch et al. 1990, Deitch et al. 1991), welche über den portalen Kreislauf auf direktem Wege die Leber erreicht als auch die so genannte „Darm-Lymph-Hypothese“ (*gut-lymph hypothesis*) kontrovers diskutiert. Hierbei wird davon ausgegangen, dass aus dem Darm stammende biologisch aktive Faktoren über die intestinalen Lymphknoten in die

systemische Zirkulation gelangen und auf diesem Wege zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten führen sowie eine Permeabilitäts­erhöhung und Schädigung von Endothel hervorrufen (Deitch et al. 2006, Senthil et al. 2006).

1.4 Die Immunantwort der Lunge

Eine Schädigung der Lunge kann sowohl über die Atemluft (z.B. Partikel, Mikroorganismen, toxische Gase) als auch über die Blutzirkulation erfolgen. Als Organ des Gasaustausches nimmt sie das gesamte Auswurfvolumen des rechten Ventrikels auf und bietet durch das ausgedehnte Kapillarnetz eine große Kontaktfläche mit den im venösen Blut vorliegenden Substanzen (z.B. Zytokine, Chemokine) und Mikroorganismen (Mauderly 1984, Heppleston 1991, Katz et al. 1991, Quinlan et al. 1994).

Die Lunge weist neben ihrer Hauptfunktion des Gasaustausches auch metabolische Funktionen auf, wie beispielsweise die Produktion und Freisetzung von Angiotensin Converting Enzym (Kuba et al. 2006), welches über weitere Kaskaden vasokonstriktorische Effekte vermittelt und sekundär über die Generierung von Aldosteron an der Regulation des Wasserhaushaltes beteiligt ist. Zudem leistet die Lunge über die Regulation der Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Konzentration einen wesentlichen Beitrag zur Pufferfunktion des Blutes. Für nur wenige Zelltypen der Lunge ist eine aktive Beteiligung an der Biotransformation von Xenobiotika nachgewiesen (Castranova et al. 1988, Dahl und Lewis 1993)

Aufgrund der enormen Kontaktfläche zur Umwelt (ca. 120 m²) ist ein ausbalanciertes Verteidigungssystem gegenüber eindringenden Mikroorganismen und anderen Noxen essentiell. Dieses reicht vom Hustenreflex und der mukoziliären Clearance (Knowles und Boucher 2002) über anti-mikrobielle Eigenschaften der Mukosa­oberfläche (Ganz 2002, McCormack und Whitsett 2002) bis hin zu den Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Zur epithelialen Auskleidung der Alveolen tragen vor allem die Typ I Alveolarepithelzellen bei. Sie bedecken die Oberfläche der Alveolen zu 95%, obwohl sie lediglich vier bis fünf Prozent der Zellen der distalen Lungenabschnitte stellen (Castranova et al. 1988, Herzog et al. 2008). Ihr Zytosol ist Teil der Diffusionsstrecke des Gasaustausches, welcher von den Alveolen zu den Kapillaren des Blutgefäßsystems stattfindet. Sie besitzen keine eigenen Mitose- und Proliferationsmöglichkeiten sowie Reparaturmechanismen. Sie können aber durch Typ II Alveolarepithelzellen ersetzt werden, welche dann zu Typ I Alveolarepithelzellen differenzieren (Castranova et al. 1988). Der von den Typ II Alveolarepithelzellen sezernierte Surfactant verhindert

einerseits den Kollaps kleiner Alveolen und weist zum anderen immun-modulatorische Effekte auf (Simon und Paine 1995, Sorensen et al. 2007).

In der Lunge repräsentieren Alveolarmakrophagen 93% der gesamten pulmonalen Makrophagenpopulation (van oud Alblas und van Furth 1979, Marriott und Dockrell 2007). Als residente Phagozyten der Lunge stellen sie die frühen Effektoren der Immunantwort dar. Bei bekapselten Erregern wie *S. pneumoniae* ermöglicht die Opsonierung durch Komplementfaktoren, Immunglobuline oder andere pulmonale Opsonine die Phagozytose (Jonsson et al. 1985). Nach Internalisierung werden die Erreger abgetötet (Gordon et al. 2000), wobei diese Kompetenz der Makrophagen mit zunehmendem Bakterieninokulum überschritten wird. Pulmonale Epithelzellen stellen ebenfalls frühe Effektoren der angeborenen Immunantwort gegenüber eindringenden Erregern dar (Hippenstiel et al. 2006). So wird unter anderem über Mustererkennungsrezeptoren und nachgeschaltete Signalkaskaden die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. TNF- α) sowie von Chemokinen (z.B. *Macrophage inflammatory protein-1*) induziert (Wang et al. 2002, Hippenstiel et al. 2006). Zudem kommt es zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen sowie zu einer vermehrten Freisetzung von anti-mikrobiellen Peptiden durch aktivierte pulmonale Epithelzellen (Strieter et al. 2003, Bals und Hiemstra 2004, Chaudhuri et al. 2005). Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten stellt eine wesentliche Komponente der angeborenen Immunantwort dar. Im Basalzustand befinden sich nur wenige neutrophile Granulozyten im Alveolarraum (Cohen und Rossi 1983). Das Kapillarbett der Lunge beherbergt jedoch in der Regel 40% der Gesamtneutrophilenpopulation beim Menschen („marginated pool“) (Nelson et al. 1995). Bei pulmonaler Infektion werden diese u.a. in den Alveolarraum rekrutiert. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass bereits vier bis sechs Stunden nach intra-pulmonaler Bakterien- oder LPS-Applikation diese Zellpopulation 40-60% der Gesamtzellpopulation einer bronchoalveolären Lavage stellt (Nelson et al. 1989a, Nelson et al. 1989b, Zhang et al. 1997b, Zhang et al. 1997a, Zhang et al. 1999). Die rekrutierten Phagozyten werden über lokale pro-inflammatorische Zytokine funktionell aktiviert und tragen im Weiteren wesentlich zur Auflösung der Infektion bei (Zhang et al. 2000). Allerdings wird den lokal rekrutierten und aktivierten neutrophilen Granulozyten auch ein wesentlicher Beitrag an der entzündungsbedingten Gewebsschädigung zugeschrieben (Zhang et al. 2000). Eben geschilderte Sachverhalte haben nicht nur bei Pneumonien Gültigkeit.

Eine effektive angeborene Immunantwort ist wesentlich für das rechtzeitige Eindämmen und Auflösen der Infektion im distalen Lungenkompartiment. Für die *S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie konnte gezeigt werden, dass der Alveolarmakrophage die wesentliche Funktion eines „Wächter“- Phagozyten inne hat, da er sowohl eine rasche pro-inflammatorische Reaktion generieren kann (Gordon et al. 2000, Gordon und Read 2002) als auch wesentlich an der Phagozytose der Pneumokokken beteiligt ist (Dockrell et al. 2003, Marriott et al. 2004).

1.5 Pneumonie und Peritonitis: häufige Auslöser septischer Erkrankungen und septischer Komplikationen im klinischen Alltag

1.5.1 Die *S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie

Die Pneumonie ist weltweit die dritthäufigste Todesursache sowie die häufigste Todesursache durch Infektionskrankheiten in den Industrieländern, wobei das Gram-positive Bakterium *S. pneumoniae* der Hauptauslöser der ambulant erworbenen Pneumonie ist (Ortqvist et al. 2005). Die pneumogene schwere Sepsis ist eine häufige Komplikation bei Patienten zahlreicher medizinischer Fachrichtungen (Maus et al. 2004). Nach den Ergebnissen einer aktuellen Studie von Dremsizov et al. (2006) entwickeln etwa die Hälfte der Patienten mit einer schweren ambulant erworbenen Pneumonie eine pneumogene Sepsis. Bei Hospitalisierung entwickeln 39% der Patienten eine nicht-pulmonale Organdysfunktion sowie 19% Prozent eine Dysfunktion in mehr als einem Organ (Dremsizov et al. 2006). Die „*prevalence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units study*“ des Kompetenznetzes Sepsis (SepNet) konnte zeigen, dass Atemwegsinfektionen mit 62% die häufigste Ursache schwerer Septitiden darstellen (Engel et al. 2007). Die Letalitätsraten liegen zwischen 10-50% (Leroy et al. 1995, Moine et al. 1995, Angus et al. 2002, Ewig und Torres 2002, Kaplan et al. 2002). Auch für die Pneumonie gilt hierbei, dass sowohl durch die Folgen einer ausbleibenden oder abgeschwächten Immunantwort als auch durch eine unter Umständen überschießende Immunantwort bei immunkompetenten Patienten Gewebsschaden, Schock und Tod resultieren kann (Weiss 1989, Johnston 1991, Simon und Paine 1995, Tuomanen et al. 1995). Der Tod kann mitunter Tage nach Initiierung einer Antibiotikatherapie trotz steriler Gewebe und Rückgang der pneumonischen Infiltrate auftreten.

1.5.1.1 *S. pneumoniae*

S. pneumoniae (Pneumokokkus) ist ein Gram-positives α -hämolisierendes Bakterium und gehört zur kommensalen Begleitflora des Nasen-Rachen-Raumes (Pons et al. 1996). *S. pneumoniae* wurde 1881 von G. Sternberg (USA) und L. Pasteur (Frankreich) entdeckt. Pneumokokken bilden Ketten oder liegen als Diplokokken vor. Alle klinisch relevanten Pneumokokkenstämme besitzen eine Kapsel, wobei die Kapsel-Polysaccharide unterschiedliche antigene Eigenschaften besitzen. Auf dieser Grundlage erfolgte eine Einteilung nach Antigenähnlichkeit in 21 Serogruppen (dänische Einteilung) und 90 Serotypen (amerikanische Einteilung). Die 10 (30) häufigsten Serotypen sind weltweit für mindestens 61% (91%) der invasiven Erkrankungen verantwortlich (Kalin 1998). Hierbei ist neben Alters- sowie regionalen Unterschieden ein stetiger Wandel der vorherrschenden Serotypen zu erkennen (Kalin 1998, Peltola et al. 2004).

1.5.1.2 *Virulenz und Pathogenität*

Die molekularen Mechanismen, mit welchen der Erreger der Immunabwehr des Wirtes zu entgehen versucht, sind nur teilweise verstanden. Der Begriff Virulenz bezieht sich auf die intrinsischen Charakteristika des Pathogens und manifestiert sich als die Fähigkeit, den Abwehrmechanismen des Wirtsimmunsystems zu entkommen sowie sich im Wirt zu vermehren. Pathogenität hingegen bezieht sich auf die Fähigkeit des Erregers charakteristische Gewebsschädigungen, welche sekundär zur eigentlichen entzündlichen Wirtsreaktion auftreten, hervorzurufen. Diese werden durch die Freisetzung und Aktivierung zahlreicher pathogener Erregerkomponenten hervorgerufen. Im Falle von *S. pneumoniae* tragen zahlreiche Faktoren zu Virulenz und Pathogenität des Erregers bei (Moine und Abraham 2004). Dies sind u.a. die Polysaccharidkapsel, Zellwandbestandteile wie Lipoteichonsäure und Peptidoglykan sowie Hyaluronidase, Neuraminidase A und B, das Adhäsin cholinbindendes Protein A, Pneumokokken-Oberflächenantigen A, Pneumokokken-Oberflächenadhäsine A, Autolysin (LytA) auf der Zellwand und Pneumolysin im Zytoplasma (Jedrzejewski 2001). Hyaluronidasen erleichtern durch Zerstörung der extrazellulären Matrix die Invasion des Wirtsgewebes (Duran-Reynals 1933). Neuraminidasen ermöglichen die Adhäsion von Pneumokokken am Wirtsgewebe durch Freilegung potentieller Bindungsstellen für die Erregeradhäsine (Krivan et al. 1988).

1.5.1.3 Autolysine

Die Autolysine sind Bestandteile der Bakterienhülle und spielen bei zahlreichen physiologischen Vorgängen, zusammenhängend mit Zellwandwachstum und -umsatz sowie Zellteilung der Mikroorganismen eine Rolle (Jedrzejewski 2001). Die Hauptfunktion der Enzyme, die Degradierung der Bakterienzellwand, hat signifikante Auswirkungen, nämlich Zelllyse und Zelltod (Tomasz et al. 1970, Jedrzejewski 2001). Autolysine können allerdings auch unter besonderen Bedingungen, wie beispielsweise der stationären Phase *in vitro* sowie nach der Behandlung mit Antibiotika oder Detergentien die Lyse der Pneumokokken bewirken (Rubins und Janoff 1998). Eine Identifikationsmethode für Kolonien von *S. pneumoniae* in der Laboratoriumsmedizin ist die Autolysin abhängige Autolyse der Kolonien. Nach Zugabe einiger Tropfen 10%iger Deoxycholatlösung bei 37°C löst sich die gesamte Kultur innerhalb weniger Minuten auf. Die Fähigkeit von Deoxycholat, die Zellwand aufzulösen, ist von der Präsenz des Autolysins LytA abhängig. Dieses wird in der Regel von allen klinisch relevanten Stämmen produziert, es gibt jedoch auch Hinweise auf gallengangbesiedelnde Stämme von *S. pneumoniae* (Blenkharn und Blumgart 1986). Die genauen Details des Prozesses der Autolyse *in vivo* während der Infektion sind noch nicht abschließend untersucht.

1.5.1.4 Pneumolysin

Pneumolysin ist ein 53 kDa großes Protein und konnte in allen klinischen Pneumokokkenisolaten nachgewiesen werden (Paton et al. 1986, Paton et al. 1993, Jedrzejewski 2001). Es wird aus dem Zytoplasma nach Autolyse der Pneumokokken durch die Autolysine freigesetzt (Rubins und Janoff 1998) und eventuell auch aktiv sezerniert (Balachandran et al. 2001). Pneumolysin wirkt zytotoxisch auf zilienträgendes Bronchialepithel, verlangsamt den Zilienschlag und zerstört *tight junctions* und somit die Integrität des Bronchialepithels (Steinfort et al. 1989, Rayner et al. 1995). Durch Zerstörung der alveolo-kapillaren Begrenzung wird ein Alveolarödem hervorgerufen, welches wichtige Nährstoffe für das weitere Wachstum der Bakterien liefert und die Invasion sowie systemische Ausbreitung der Pneumokokken erleichtert (Rubins und Janoff 1998). Zudem verhindert Pneumolysin die Chemotaxis und bakterizide sowie immunpermissive Aktivität humaner neutrophiler Granulozyten und Monozyten (Rubins und Janoff 1998). Das Enzym gehört zur Gruppe der so genannten Cholesterol abhängigen Zytolysine (CDC, *cholesterol-dependent cytolytins*). Diese binden am Cholesterol der

Wirtszellmembran und bewirken über Bildung großer Transmembranporen die Lyse der Wirtszelle. Die Cholesterolkomponente der Wirtszellmembran ist unabdingbar für die zytotoxische Wirkung des Pneumolysins (Jedrzejewski 2001).

1.5.1.5 Pathophysiologische Sequenz der S. pneumoniae- induzierten Pneumonie

In einem murinen Infektionsmodell mit *S. pneumoniae* Serotyp 3 konnten Bergeron et al. (1998) fünf wesentliche pathogenetische Schritte von der Initiierung der Infektion bis hin zum Tod der Tiere identifizieren. Die ersten beiden Stadien entsprachen einer pulmonalen Infektion ohne Zeichen der Bakteriämie (< 24 Stunden). Im dritten Stadium zeigte sich der Übergang der lokalen zur systemischen Inflammation (> 24 Stunden) und die letzten beiden Stadien waren charakterisiert durch eine ausgeprägte systemische Entzündungsreaktion, welche zu schwerer Gewebsschädigung, hämatologischen und biochemischen Störungen und letztendlich zum Tod der Tiere führte (Bergeron et al. 1998). Die Studie zeigt, dass die Pneumokokken trotz Initiierung einer lokalen Immunreaktion weiter proliferierten und zusätzlich zur initialen pulmonalen Infektion eine Bakteriämie auslösten. Lokal produziertes TNF- α und IL-1 vermitteln eine ausgeprägte Epithelzelltoxizität und angelockte neutrophile Granulozyten führen zu einer infektionsassoziierten Gewebsschädigung (Worthen et al. 1987, Weiss 1989). In Zusammenwirken mit den bakteriellen Pathogenitätsfaktoren resultiert hieraus ein Membranschaden, welcher gemeinsam mit Alveolarödem und interstitiellem Ödem sowie Bakterienwachstum in den Alveolarzellen (Talbot et al. 1996) zu einem Übertritt der Erreger in den Blutstrom sowie ausgedehntem Gewebsschaden führt. Insgesamt dürfte die Kombination Pathogen und Wirts assoziierter Faktoren zu Letalität und Gewebsschädigung geführt haben.

1.5.1.6 Multiorgandysfunktion im Rahmen der S. pneumoniae-induzierten Pneumonie der Maus

Andonegui et al. (2008) konnten in einem murinen *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie-Modell sowohl eine Pneumonie als auch eine Multiorgandysfunktion erzeugen (Andonegui et al. 2008). Die Pneumonie zeigte sich in der Lunge durch eine zunehmende Neutrophilensequestration in der Histologie sowie durch erhöhte Konzentrationen an Myeloperoxidase. Zusätzlich konnte eine erhöhte Bakterienlast in der Lunge bei infektionsdosisabhängig geringer bis fehlender Bakteriämie nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich systemische Effekte unabhängig von einer Bakteriämie. In Darm, Niere und

Herz waren deutliche Funktionseinschränkungen erkennbar. Die Schädigung der Darmfunktion zeigte sich durch eine Störung der epithelialen Barrierefunktion mit Einstrom von wasserlöslichen Substanzen aus der systemischen Zirkulation in das Darmlumen. Die Nierenfunktion, gemessen durch Kreatininspiegel im Serum sowie die Herzfunktion, gemessen am isoliert perfundierten Herzen zeigten sich ebenfalls deutlich beeinträchtigt.

1.5.2 Die sekundäre Peritonitis

Die sekundäre Peritonitis bezeichnet die lokalisierte oder diffuse Peritonitis durch endogene Kontamination mit aeroben bzw. anaeroben Bakterien der Darmflora nach beispielsweise Perforation eines Hohlorgans, Darmnekrosen oder Anastomoseninsuffizienz (Farthmann und Schoffel 1998, van Till et al. 2007). Sie liegt in ca. 80 % der Fälle von Peritonitis vor. In der Regel handelt es sich hierbei um eine polymikrobielle Infektion (Brook 2008).

Sekundäre Peritonitiden verursachen immer noch hohe Erkrankungs- und Sterblichkeitszahlen. Die Letalitätssrate rangiert zwischen fünf und 90% in Abhängigkeit individueller Risikofaktoren, wobei die durchschnittliche Letalitätssrate bei 18% liegt (Koperna und Schulz 1996). Zudem ist die Peritonitis im klinischen Alltag eine führende Ursache der Organdysfunktion (McLauchlan et al. 1995, Merrell 1995, Barie et al. 1996, Engel et al. 2007), wobei die Lunge das am häufigsten betroffene Organ darstellt (Wickel et al. 1997, Engel et al. 2007). In einer prospektiven Kohortenstudie, welche 114 Intensivpatienten mit chirurgisch sanierter gastro-intestinaler Perforation einschloss, wiesen 73% der Patienten eine Organdysfunktion auf, wobei die Patienten mit tödlichem Ausgang der Erkrankung ausnahmslos an einer Organdysfunktion litten (Barie et al. 1996). Hierbei ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich des ursächlich perforierten Organs.

1.6 Die angeborene Immunantwort bei Infektion und Sepsis

1.6.1 Mustererkennungsrezeptoren

Im Rahmen der Erregererkennung und Initiierung der angeborenen Immunantwort spielen so genannte Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *Pattern Recognition Receptors*) eine wesentliche Rolle. Diese erkennen hoch konservierte pathogene Strukturen, wie beispielsweise Zellwandbestandteile Gram-positiver und Gram-negativer Erreger sowie Nukleinsäuren verschiedener Herkunft. Ebenso werden intrazelluläre Komponenten wirtseigener Zellen detektiert, welche auf eine Gewebsschädigung hinweisen. In diesem

Zusammenhang können so genannte *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), also sowohl Pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) als auch endogene Alarmine, welche als Folge traumatischer Schädigungen im Organismus freigesetzt werden erkannt werden und zur Aktivierung der angeborenen Immunantwort führen (Bianchi et al. 2006, Mollen et al. 2006).

Die bislang am Besten charakterisierte Gruppe der PRRs sind die so genannten Toll-like Rezeptoren (TLR) (Akira und Takeda 2004, Takeda und Akira 2004, Akira et al. 2006, Verstak et al. 2007). Hierbei handelt es sich um humane Homologe des in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* isolierten Toll-Rezeptors, dessen Aktivität mit der Erkennung fungaler Infektionen in Verbindung gebracht wurde (Lemaitre et al. 1996). Auf die Darstellung weiterer Vertreter der PRR soll im Rahmen der vorgelegten Arbeit verzichtet werden. Es sind derzeit 11 humane TLR bekannt (Medzhitov 2001, Liew et al. 2005). Die TLR 1, 2, 4, 5 und 6 werden auf der Zelloberfläche immunkompetenter Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten und B-Lymphozyten sowie auf mukosalen Epithelzellen und Endothelzellen exprimiert (Becker et al. 2000, Cario et al. 2000, Muzio et al. 2000, Faure et al. 2001, Visintin et al. 2001). TLR 2 erkennt als Heterodimer mit TLR 1 oder TLR 6 bakterielle Lipoproteine und Lipoteichonsäure. TLR 4 erkennt zusammen mit dem Protein *lymphocyte antigen 96* (MD-2) Lipopolysaccharide. Das zirkulierende LPS wird hierzu zunächst an das Oponin LPS-bindendes Protein (LBP) gebunden und dann in der Regel über einen CD-14 abhängigen Prozess an den TLR4/MD-2 Komplex herangeführt (Aderem und Ulevitch 2000, Jiang et al. 2005). TLR 5 erkennt bakterielles Flagellin (Akira und Takeda 2004), TLR 3, 7, 8 und 9 liegen intrazellulär und sind auf die Detektion viraler Bestandteile bzw. die Erkennung von Nukleinsäuren spezialisiert (Medzhitov 2001, Trinchieri und Sher 2007).

In Erweiterung zur ursprünglichen Vorstellung, dass ein spezieller TLR nur durch spezifische Liganden aktiviert werden kann, konnte mittlerweile gezeigt werden, dass viele der Rezeptoren auch durch andere Liganden aktiviert werden können (Trinchieri und Sher 2007). So aktivieren beispielsweise die Zellwandbestandteile von Hefen und Mykobakterien TLR 2. Zudem können TLR Homo- oder Heterodimere bilden und erweitern die Ligandenspezifität und ggf. auch die Signaldiversität (Ozinsky et al. 2000, Janeway und Medzhitov 2002).

1.6.1.1 Signaltransduktion der TLR

Die TLR der Säugetiere sind Typ I transmembranäre Rezeptoren mit einer aus mehreren Kopien eines Leucin-reichen Motifs bestehenden Ektodomäne sowie einer Toll/IL-1-Rezeptor (TIR) zytoplasmatischen Domäne. Die TIR-Domäne, welche auch bei anderen Vertretern der IL-1 Rezeptorfamilie vertreten ist, vermittelt homophile und heterophile Interaktionen zwischen TLR und *TIR-domain containing* Adaptermolekülen. Am Beispiel von TLR 4 lässt sich sagen, dass insgesamt 4 *TIR-domain containing* Adaptermoleküle über Interaktion mit der TIR-Domäne des Rezeptors in die Signaltransduktion involviert werden können (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM) (Akira und Takeda 2004, Hoebe et al. 2004). Fast alle TLR können über einen MyD88-abhängigen Signalweg zu einer *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) induzierten Expression von pro-inflammatorischen Mediatoren (z.B. IL-8, IL-6, TNF- α , pro-IL-1 β) führen. TLR 3 und TLR 4 vermögen zudem die Induktion von Typ I Interferonen (IFN) und IFN-abhängiger Gene (z.B. induzierbare Stickoxid-Synthase, iNOS) über die Aktivierung Interferon regulierender Transkriptionsfaktoren zu bewirken (Opitz et al. 2007).

1.6.1.2 TLR und endogene Alarmine

TLR können ebenso als Rezeptoren für endogene Gefahrensignale, resultierend aus z.B. nekrotischem Zelluntergang bei Gewebsminderperfusion oder Ischämie sowie traumatischer Ereignisse (z.B. thermische Traumen, chemische Insulte, radioaktive Strahlung) und infektiöser Geschehnisse fungieren. In diesem Zusammenhang wurden beispielsweise *high mobility group box-1* (HMGB-1), S100-Proteine, Hitzeschockproteine, Cathelicidine, Defensine und Galektine als endogene Alarmine identifiziert. Die Signaltransduktion durch Alarmine erfolgt hauptsächlich über TLR 4 (Mollen et al. 2006, Bianchi 2007). Dies führt zu einer vermehrten Expression von TLR und sensibilisiert das angeborene Immunsystem durch eine erhöhte TLR-Reaktivität (Paterson et al. 2003).

1.6.2 Inflammasom

Die durch TLR-Aktivierung induzierte Produktion von Vorstufen pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. pro-IL-1 β) führt zur Aktivierung so genannter Inflammasome. Dies sind Multiproteinkomplexe, welche im Wesentlichen durch Aktivierung von Caspase-1 die Prozessierung und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine bewirken (Ogura et al.

2006). Caspase-1 überführt die inaktive Proform in aktives IL-1 β . Weitere Funktionen des Inflammasoms sollen hier nicht näher beschrieben werden.

1.6.3 Mechanische und chemische Barrieren

Epithelzellen der Haut und Schleimhäute stellen neben ihrer Funktion als mechanische Barriere für Krankheitserreger auch eine Quelle für eine Vielzahl anti-mikrobieller Peptide dar (Ganz 2002, Oppenheim et al. 2003). Im Gegensatz zur bisherigen Annahme der alleinigen anti-mikrobiellen Wirkung weisen die meisten dieser Moleküle auch immunologische Wirkungen auf (Ganz 2002). Zu nennen wären hier beispielsweise die β -Defensine aus der Darmmukosa und der Mukosa der Atemwege (Ganz 2002, Oppenheim et al. 2003) sowie die von zahlreichen Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten produzierten Cathelicidine und das Lysozym (Palaniyar et al. 2002, Oppenheim et al. 2003, Steinstraesser et al. 2005).

1.6.4 Zytokine

Unter dem Begriff Zytokine wird eine heterogene Gruppe löslicher Polpeptide oder Glykoprotein-Mediatoren bestehend aus Interleukinen, Interferonen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen zusammengefasst. Sie sind zusammen mit den anderen Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems Teil des komplexen Netzwerkes, welches u.a. die Immunantwort bei Entzündung reguliert. Zahlreiche Immun- und Nicht-Immun-Zellen sind zugleich Quelle und Ziel von Zytokinen (Borish und Steinke 2003).

Über die Wirkung pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1, IL-6) wird beispielsweise die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und dem Endothel induziert. Durch die lokale Produktion von IL-8 werden neutrophile Granulozyten zum Ort der Infektion gelockt und aktiviert (Beutler und Cerami 1989, Cohen 2002). Über die Produktion von löslichem IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1RA) (Dinarello 1998, Arend und Guthridge 2000), IL-10, IL-4 und *transforming growth factor- β* (TGF- β) (Bone et al. 1997) sowie Faktoren wie *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) (Matsukawa 2007) wird die Proinflammation gegenreguliert. Diese Limitation der Immunantwort kann ihrerseits überschießend reguliert sein und zur Immunsuppression führen (Bone et al. 1997).

1.6.4.1 Chemokine

Chemokine sind zelluläre Aktivatoren, welche die gerichtete Zellmigration von Immun- und Entzündungszellen bewirken sowie diese über spezifische Rezeptoren aktivieren können (Rossi und Zlotnik 2000, Baggiolini 2001). Derzeit sind ca. 50 verschiedene Chemokine bekannt, welche aufgrund der Lokalisation von Zysteinresten in der Polypeptidkette in 4 Gruppen unterteilt werden. Die größte Familie stellen die so genannten CXC (oder α)- und CC (oder β)-Chemokine dar. Wichtige Vertreter dieser beiden Gruppen sind beispielsweise das IL-8 (CXCL8), das humane *growth-related oncogene α* (GRO- α , CXCL1) und dessen murines Homolog *macrophage-inflammatory protein-2* (MIP-2) und *growth-related oncogene β* (GRO- β , CXCL2) (Rossi und Zlotnik 2000, Scapini et al. 2000, Plijev 2008). Ebenso spielen die Gruppenmitglieder *monocyte-chemoattractant protein-1* (MCP-1, CCL2), *macrophage-inflammatory protein 1 α* (MIP-1 α) und MIP-1 β (CCL4) eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Makrophagen (Miyazaki et al. 2000, Rossi und Zlotnik 2000, Plijev 2008). Weitere Chemokingruppen sind CX₃CL-Chemokine sowie die C-Chemokine (Plijev 2008). So gut wie alle Immunzellen exprimieren Rezeptoren für ein oder mehrere Chemokine und die meisten entzündlich aktivierten und infiltrierten Gewebe produzieren eine Reihe von Zytokinen, welche jeweils spezifische Immunzellen rekrutieren (Glass et al. 2003, Plijev 2008).

1.6.5 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem besteht aus mindestens 30 Serum- oder Zelloberflächenproteinen, welche hauptsächlich in der Leber und zu einem geringen Grad auch von mononukleären Phagozyten gebildet werden. Die Komplementkaskade kann über 3 unterschiedliche Wege aktiviert werden: den klassischen Signalweg (Tosi 2005), den *mannose-binding lectin* (MBL)- Signalweg (Walport 2001) sowie den alternativen Signalweg. Diese bewirken über eine gemeinsame Endstrecke die Opsonierung, Phagozytenrekrutierung und Lyse eingedrungener Erreger (Joiner et al. 1984, Walport 2001)

1.6.6 Leukozytenrekrutierung, Transmigration und Phagozytose

Beim Menschen stellen neutrophile Granulozyten die größte Population intra-vaskulärer Phagozyten dar. Sie spielen eine wesentliche Rolle in der Abwehr zahlreicher Erreger (Lehrer et al. 1988, Sibille und Reynolds 1990). Bei einer lokalen Infektion übernehmen zirkulierende neutrophile Granulozyten drei wesentliche Funktionen: die Migration zum

Ort der Infektion, die Erkennung und Aufnahme der eingedrungenen Erreger sowie deren Abtötung und Verdauung. Die Leukozytenrekrutierung an den Ort des Geschehens erfolgt zunächst über die Sezernierung spezifischer Chemokine durch die Endothelzellen des geschädigten Gewebes sowie anderer Immunzellen und durch mikrobielle Produkte (Butcher 1991).

Im Weiteren können drei Phasen unterschieden werden: 1. die frühe adhäsive Phase (*slow rolling*), 2. die feste adhäsive Phase und 3. die Transmigration. Hierbei spielen unterschiedliche Adhäsionsmoleküle, welche u.a. von neutrophilen Granulozyten oder Endothelzellen exprimiert werden, eine Rolle. Zu nennen wären beispielsweise die Selektine in der frühen adhäsiven Phase (Butcher 1991, Ley 2003) und *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) (Butcher 1991, Ley 2002) sowie die β 2-Integrine *leucocyte function associated antigen* (LFA-1) und *macrophage antigen complex-1* (MAC-1) (Seo et al. 2001, Ley 2002) in der späten adhäsiven Phase. Während die neutrophilen Granulozyten in der frühen adhäsiven Phase durch die Interaktion mit dem Endothel im Blutstrom verlangsamt werden und i.d.R. langsam am Endothel entlang rollen (*slow rolling*) (Butcher 1991, Ley 2002), ist die späte adhäsive Phase wesentlich für die transendotheliale Migration der Neutrophilen (Seo et al. 2001, Ley 2002).

Ogleich die spezifischen Stimuli und beteiligten Adhäsionsmoleküle variieren können, gilt dieser Mechanismus in seinen Grundzügen für die Rekrutierung nahezu aller zirkulierenden Immunzellen zum Ort der Infektion (Glass et al. 2003, Kim 2004, Bisset und Schmid-Grendelmeier 2005). Die Erkennung und Aufnahme der Erreger durch die am Ort des Geschehens angelangten Phagozyten wird durch Opsonierung über Antikörperbindung und Komplementfaktoren deutlich erleichtert (Joiner et al. 1984, Hostetter 1986). Die Zerstörung der phagozytierten Mikroben erfolgt über so genannte sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Mechanismen.

1.6.7 Gerinnungssystem

Das Gerinnungssystem spielt eine wesentliche Rolle im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion (Levi und van der Poll 2004, Levi und Opal 2006). Im Normalzustand präsentiert sich das Gefäßendothel mit einer anti-koagulatorischen Oberfläche, um einen ungestörten Blutfluss zu ermöglichen (Weksler et al. 1977, Mertens et al. 1992, Esmon 1995, Iversen et al. 1996, Marcus et al. 1997a). Im Rahmen der Entzündungsreaktion verändert sich jedoch die Beschaffenheit des Endothels: es verliert seine anti-koagulatorischen zugunsten pro-koagulatorischer Eigenschaften. Über eine

lokale Gerinnungsaktivierung soll eine Eingrenzung der Infektion ermöglicht werden. Einige Erreger produzieren fibrinolytische Stoffe um diesem Mechanismus zu entgehen. Durch infektiös generierte Stimuli wie LPS, TNF- α und IL-1 verlieren Endothelzellen ihr oberflächlich exprimiertes Thrombomodulin und Heparansulfat (Moore et al. 1987, Moore et al. 1989, Ihrcke et al. 1993) und exprimieren stattdessen *tissue factor*, worüber der extrinsische Signalweg der Gerinnungskaskade aktiviert wird (Bevilacqua et al. 1984, Bevilacqua et al. 1986). Zusätzlich wird einige Stunden nach dem entzündlichen Stimulus die Fibrinolyse durch vermehrte Freisetzung von *plasminogen-activated inhibitor-1* gehemmt (Schleef et al. 1988, van der Poll et al. 1991).

1.7 Common host response und erregerspezifische Antwort des angeborenen Immunsystems

Die *Microarray*technologie ermöglicht es, eine Vielzahl biologischer Veränderungen auf Transkriptomebene gleichzeitig darzustellen. Es wurden bereits zahlreiche Untersuchungen zur Erreger-Wirts-Interaktion mit dieser Technik durchgeführt (Jenner und Young 2005). Jenner und Young (2005) konnten durch eine Analyse von 32 publizierten Studien mit 77 verschiedenen Pathogen-Wirts-Interaktionen eine so genannte „*common host-transcriptional response*“ (*common host response*) identifizieren, welche sich unabhängig von (untersuchter) Wirtszellart und Erreger zeigte. Diese beinhaltet sowohl Gene, welche die Entzündungsreaktion vermitteln und initiieren, wie beispielsweise pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine (Tnf- α , Il-6, Il-1, Il-8, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl3, Ccl3, Ccl4, Ccl20), Interferon stimulierte Gene (ISG), transkriptionelle Regulatoren und Adaptermoleküle der Immunantwort (Nfkb, Jun, Ap1, Myd88, Stat1, Stat4, Stat5, etc.) als auch Gene, welche die Immunantwort limitieren (Ikba und pro-apoptische Gene). Zudem gehören in die Kategorie *common host response* Gene, welche in Lymphozytenaktivierung (Cd86, Cd80, Cd40), Antigenpräsentation (*human leucocyte antigen*, Hla), Zelladhäsion (Galektin 9, Cd53, Icam1) und Gewebeinvasion (Matrixmetalloproteinasen, Mmp) involviert sind. Jenner und Young (2005) interpretieren diese *common host response* als ein robustes transkriptionelles Programm, zu welchem jede Zelle oder jedes Organ im Sinne einer generellen Alarmantwort, unabhängig von der detaillierten Funktion im Organismus befähigt ist. Hierüber wird die Wahrscheinlichkeit der Erkennung eindringender Pathogene durch den Wirtsorganismus maximiert. Parallel zur *common host response* existieren eine Vielzahl spezialisierter Reaktionsmuster der involvierten Wirtszellen, sowohl in Form einer zelltypspezifischen als auch einer

pathogenspezifischen Reaktion. Die pathogenspezifische Antwort wird größtenteils über die verschiedenen Komponenten des Toll-like Rezeptor Signalweges vermittelt (Beutler 2004, Jenner und Young 2005). Der Signalweg führt sowohl zur Induktion gemeinsamer Gene, wie z.B. dem inflammatorischen/chemotaktischen Cluster der *common host response* als auch zur Generierung pathogenspezifischer Expressionsmuster. So bewirkt die Aktivierung von TLR 3 und TLR 4 zudem eine Expression Interferon stimulierter Gene, wohingegen die Aktivierung von TLR 2 lediglich zur Aktivierung der gemeinsamen Antwort führt (Jenner und Young 2005). Über die Möglichkeit von Homo- und Heterodimerisierungen der Toll-like Rezeptoren entsteht eine Vielzahl möglicher Expressionsmuster nach Aktivierung der Signalkaskade (Hossain et al. 2006, Oda und Kitano 2006, Opitz et al. 2007).

1.8 *Single-Gene* hypothesengetriebene versus systembiologische, Hypothesen generierende Auswertungsstrategien *Microarray* generierter Datensätze

Die *Microarray*technologie erlaubt die gleichzeitige Darstellung der transkriptomischen Regulation aller ca. 45.000 Gene im Rahmen des in der vorgelegten Arbeit verwendeten *whole genome expression bead chips*. Die Vielfalt der anfallenden Datensätze bietet zahlreiche Möglichkeiten der Auswertung und Interpretation mit unterschiedlicher Aussagekraft. Hypothesen getriebene Ansätze geben wertvollen Aufschluss über potentielle diagnostische Marker sowie therapeutische Interventionsmöglichkeiten auf der Ebene einzelner Zielgene oder Moleküle (Chinnaiyan et al. 2001, Cobb et al. 2002, Feezor et al. 2003). Die in Kombination mit einer Einzelgen-Betrachtungsweise (univariate statistische Verfahren, z.B. t-Test) häufig durchgeführten Clusteranalysen führen je nach Verfahren eine „Vorbewertung“ der Daten durch Passung in eine bestimmte Anzahl von Clustern bzw. Gruppierungen ohne biologische Rationale durch (Eisen et al. 1998, Tamayo et al. 1999). Gene sind allerdings Bestandteile eines komplexen regulatorischen Netzwerkes, welches als integrierte dynamische Einheit funktioniert (Huang 2001, Calvano et al. 2005). Die Existenz solcher Netzwerke zeigt auf, dass hochdimensionale Genexpressionsprofile globale Muster beherbergen, welche eine höhere Ordnung phänotypischer Eigenschaften anzeigen. Entsprechend erscheint eine „holistische“ Betrachtung des Transkriptoms besser geeignet, die systemweiten Muster darzustellen, welche sich im Einzelgen-Ansatz als unsichtbar erweisen (Huang et al. 2005, Guo et al. 2006). Dies ist insbesondere dann von Interesse, wenn man die einer Erkrankung zugrunde

liegenden Pathomechanismen im System der einzelnen Zelle oder des einzelnen Organs und die durch eine Erkrankung hervorgerufenen pathobiologischen Veränderungen an Zell-oder Organsystemen respektive im gesamten Organismus darstellen möchte.

Die medizinischen Fachrichtungen der Pathologie und Radiologie verdeutlichen anschaulich, dass die in komplexen Bildern, wie beispielsweise in histologischen Präparaten und Röntgenbildern enthaltenen Informationen nicht ohne Informationsverlust auf numerische Variablen reduziert werden können (Guo et al. 2006). In einer Fallstudie zu humanen Lungenkrebsarten konnte mithilfe der Software *Gene Expression Dynamics Inspector* (GEDI) gezeigt werden, dass insbesondere bei Ermangelung von sowie Verzicht auf Hypothesen eine Betrachtung mit „niedriger Auflösung“ wesentliche Zusammenhänge aufdecken kann (Guo et al. 2006). Die Autoren konnten globale qualitative Zusammenhänge zwischen Plattenepithelcarcinomen, kleinzelligen Carcinomen und Carcinoiden visuell und faktisch darstellen. Trotz der „niedrigen Auflösung“ der Analyse gingen keine Detailinformationen für nachfolgende Analysen auf Signifikanzniveau verloren. Eine Hypothesen generierende Vorgehensweise auf Grundlage *Microarray* generierter Datensätze birgt zudem den Vorteil einer weiteren Hypothesen getriebenen Nacharbeitung des Datensatzes auf Signifikanzniveau sofern die Hypothese vom Versuchsaufbau abgedeckt ist.

2 Ziele der Arbeit

Die Entwicklung einer oder mehrerer Organdysfunktionen stellt den Prognose bestimmenden Faktor bei der Sepsis dar. Im klinischen Alltag imponieren die polymikrobielle Peritonitis sowie die *S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie als häufige Auslöser septischer Erkrankungen und Komplikationen. Die dargestellten Literaturbefunde lassen den Schluss zu, dass sowohl die Art infektiöser Stimuli als auch die daraus resultierenden (Immun)Reaktionen der Organsysteme entscheidend zur Pathogenese der septischen Organschädigung beitragen. Experimentelle Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass sich die pathogenetischen Mechanismen auf molekularer Ebene bei Gram-negativen und Gram-positiven Erregern fundamental unterscheiden, obgleich anhand klinischer Parameter keine Unterscheidung zu treffen ist. Zudem ist nicht abschließend geklärt, ob sich das Transkriptom eines Organs als Ausgangsorgan der Sepsis vom Transkriptom des gleichen Organs als Zielorgan der Sepsis unterscheidet. Ebenso ist von bedeutendem Interesse, wie sich hierbei einzelne Organe in Ihrer Genexpression unterscheiden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die systembiologischen Zusammenhänge der pathogenetischen Sequenz der Sepsis unterschiedlicher Genese sowie der septischen Organdysfunktion zu untersuchen. Im Rahmen einer *Microarray* basierten, Hypothesen generierenden Untersuchung sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

Organ übergreifender Gesamtvergleich:

- 1. Gibt es wesentliche Unterschiede im Transkriptom der Organe Leber, Lunge, Milz und Blut bei den Infektionsmodellen der polymikrobiellen Peritonitis sowie der S. pneumoniae-induzierten-Pneumonie?*
- 2. Welche Pathomechanismen und Stoffwechselwege sind im Rahmen der Sepsis unterschiedlicher Ursache generell betroffen?*

Die Lunge als Ausgangs- und Zielorgan der Sepsis

- 3. Unterscheidet sich das Transkriptom der Lunge als Ausgangsorgan der Sepsis bei Pneumonie vom Transkriptom der Lunge als Zielorgan (infektionsortfernes Organ) der Sepsis bei Peritonitis?*
- 4. Wie unterscheidet sich das Transkriptom der Lunge als infektionsortnahes und infektionsortfernes Organ von dem der Leber in diesem Vergleich?*

3 Material und Methodik

3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine tierexperimentelle randomisierte Studie. Es bestanden zwei gewichtsadaptierte experimentelle Gruppen:

1. *Pulmonale Infektion mit S. pneumoniae Serotyp 2 (D39 / hohe Virulenz) durch intra-tracheale Instillation von 10^5 KBE pro Maus.*

2. *Polymikrobielle, gemischt Gram-positive und Gram-negative Peritonitis nach intra-peritonealer Injektion einer humanen Faeces-Suspension von $5,5 \times 10^6$ KBE pro Maus.*

Eine weitere Unterteilung der Gruppen erfolgte aufgrund der Organ-Entnahmezeitpunkte bei Abtötung der Tiere 6h und 24h nach Infektion. In die Analyse gingen die Organe Lunge, Leber, Milz und Blut ein. Des Weiteren wurde für jede der beiden experimentellen Prozeduren (intra-tracheale Instillation von *S. pneumoniae*, intra-peritoneale Injektion von humanen Faeces) eine Shamgruppe sowie eine unbehandelte Gruppe mitgeführt. Die Shamtiere wurden prinzipiell den gleichen experimentelle Prozeduren unterzogen wie die Tiere der Infektionsgruppen. Sie bekamen jedoch anstelle der jeweiligen Bakteriensuspension nur die Trägersubstanz (physiologische Kochsalzlösung oder *Todd Hewitt Broth*) alleine injiziert. Dies diente der Erkennung und Abgrenzung rein Prozedur bedingter Effekte von Infektionseffekten. Die unbehandelten Kontrollgruppen dienten der Erkennung eventueller „Stalleffekte“, da die Tiere aus zwei verschiedenen Tierlaboratorien stammten. Von den Shamtieren und unbehandelten Kontrolltieren gingen ebenfalls die Organe Lunge, Leber, Milz und Blut in die Analyse ein. Das experimentelle Design ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Experimentelle Gruppen sowie Anzahl der jeweils in die *Microarray*experimente eingegangenen Tiere.

Experimentelle Gruppen und Prozeduren	Zeitintervall	Ort der Versuchs- Durchführung	Tierzahl
Polymikrobielle Peritonitis Intra-peritoneale Injektion: humane Faeces 5,5 x 10 ⁶ KBE in 0.9% NaCl-Lösung (Gesamtvolumen 200µl)	6h	Jena	4
Polymikrobielle Peritonitis Intra-peritoneale Injektion: humane Faeces 5,5 x 10 ⁶ KBE in 0.9% NaCl-Lösung (Gesamtvolumen 200µl)	24h	Jena	4
Sham für Peritonitis Intra-peritoneale Injektion: 0.9% NaCl-Lösung (200µl)	6h	Jena	3
Pneumokokken-Pneumonie Intra-tracheale Instillation: <i>S. pneumoniae</i> Serotyp 2 (D39) 10 ⁵ KBE in 50 µl <i>Todd-Hewitt Broth</i>	6h	Hannover	4
Pneumokokken-Pneumonie Intratracheale Instillation: <i>S. pneumoniae</i> Serotyp 2 (D39) 10 ⁵ KBE in 50 µl <i>Todd-Hewitt Broth</i>	24h	Hannover	4
Sham für Pneumonie Intra-tracheale Instillation: 50 µl <i>Todd-Hewitt Broth</i>	6h	Hannover	3
Unbehandelte Tiere	-	Jena	2
Unbehandelte Tiere	-	Hannover	2
Gesamttierzahl			26

0.9% NaCl: sterile physiologische Kochsalzlösung. Infektionsdosisangabe in Kolonie bildenden Einheiten (KBE) pro Maus. Todd Hewitt Broth: Kulturmedium. Zeitintervall nach experimenteller Prozedur bis zur Organentnahme in h. Tierzahlen: nach experimenteller Prozedur in die *Microarray*analyse eingegangene Tiere (1Array/Tier/Organ = 112 Arrays inklusive Kontroll RNA). Die Ausgangstierzahlen sind nicht angegeben, da im Rahmen des Gesamtkonzeptes der Studie größere Tierzahlen für eine spätere Validierung der *Microarray*experimente mittels Realtime-PCR und proteomischen Analysemethoden eingesetzt wurden. Diese gingen nicht in die vorgelegte Untersuchung ein, sondern werden Bestandteil weiterführender Analysen sein.

3.2 Tierexperimente

Die Induktion der Pneumokokken-Pneumonie (Abschnitt 3.2.4) mit nachfolgender Organentnahme, die Keimzahlbestimmungen in der Lunge (Abschnitt 3.2.7) sowie die bronchoalveoläre Lavage mit Bestimmung der Leukozytensubpopulationen (Abschnitt 3.2.6) wurden im Labor der Experimentellen Pneumologie der Medizinischen Hochschule Hannover (PD Dr. Ulrich Maus) durchgeführt. Die Induktion der polymikrobiellen Peritonitis (Abschnitt 3.2.3) mit nachfolgender Organentnahme erfolgte in den Experimentierräumen des Forschungszentrums Beutenberg in Jena.

3.2.1 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden nach Genehmigung durch die lokalen Tierschutzbehörden (*Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Abteilung gesundheitlicher Verbraucherschutz, Veterinärwesen, Pharmazie und dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*) durchgeführt. Für alle Experimente wurden weibliche, 8 Wochen alte C57BL/6 Wildtyp Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere für die Versuche zur fäkalen Peritonitis wurden bei Raumtemperaturen von 20-24°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% sowie einem festen Tag-Nachtzyklus von je 12h in einer separaten Einheit des Infektionstierhauses (Forschungszentrum Beutenberg, Jena) gehalten. Die Tiere zur Induktion der Pneumonie wurden in soeben beschriebener Form im zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover gehalten. Alle Tiere hatten freien Zugang zu autoklaviertem angesäuertem Wasser (pH 2,5-3,0) und autoklavierter pelletierter Standardnahrung. Aufnahme in die Tierversuche fanden nur Tiere, die ein normales Fress- und Putzverhalten aufwiesen.

3.2.2 Anästhesie

Zur intra-trachealen Instillation von *S. pneumoniae* Serotyp 2 (D39) wurden die Tiere mittels intramuskulärer Injektion von Rompun (Xylazinhydrochlorid, Bayer Vita GmbH, Köln, Deutschland) und Ketamin (Ketavet, Pfizer Tiergesundheit, Berlin, Deutschland) anästhesiert und wie unter 3.2.4. beschrieben intubiert. Zur intra-peritonealen Injektion der humanen Faeces-Suspension wurde keine Anästhesie benötigt. Die Euthanasie der Tiere und Organ- sowie Blutentnahme erfolgte nach einer letalen Ketamindosis (fäkalen Peritonitis) oder Isofluranüberdosierung (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) bei der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie.

3.2.3 Polymikrobielle Peritonitis

Nach lokaler Sprühdesinfektion wurde die intra-peritoneale Injektion von 200µl (Omnifix-F 1ml, Braun, Melsungen, Deutschland) einer humanen Faeces-Suspension in den linken unteren Quadranten des Abdomens mit einer 20G Kanüle (Sterican 100, Braun, Meldungen, Deutschland) durchgeführt. Die Injektionsdosis wurde zuvor durch einen Dosisfindungsversuch ermittelt. In Anlehnung an die erhobenen Daten, welche nicht Gegenstand der vorgelegten Untersuchung sind, erfolgte die Verdünnung (1+3) von 50µl der Ausgangs-Faeces (Tabelle 2) mit 150µl steriler physiologischer Kochsalzlösung (Fresenius, Bad Homburg v.d.H., Deutschland). Entsprechend ergab sich eine Infektionsdosis von $5,5 \times 10^6$ KBE in 200µl. Die Letalität des Modells lag bei durchschnittlich 70% pro 24h. Die Organ- und Blutentnahme bei den überlebenden Tieren erfolgte nach 6h bzw. 24h. Ebenfalls wurde eine Inspektion des Peritonealraumes zur optischen Überprüfung der Diagnose Peritonitis durchgeführt.

3.2.4 *S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie

Nach Narkoseeinleitung mittels Ketamin (Ketavet, Pfizer Tiergesundheit, Berlin, Deutschland) und Rompun (Xylazinhydrochlorid, Bayer Vita GmbH, Köln, Deutschland) wurden die Tiere mit ihren oberen Schneidezähnen an einer Intubationshilfe (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland) angehängt und mithilfe eines Intubationsbestecks wurde unter visueller Kontrolle ein Tubus (26G Abbocath, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) in die Trachea vorgeschoben. Für eine gute visuelle Darstellung des Oropharynx wurde die ventrale Halsregion der Tiere mit einer Schwanenhals-Kaltlichtlampe (KL 1500 LCD, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) ausgeleuchtet. Anschließend wurde die endo-tracheale Instillation von *S. pneumoniae* Serotyp 2 (D39) (10^5 KBE/Maus) bzw. eines äquivalenten Volumens (50µl) des Kulturmediums *Todd-Hewitt Broth* (THB, Difco Laboratories, Augsburg, Deutschland) bei den Tieren der Shamgruppe durchgeführt. Die Tiere wurden nach Erwachen aus der Narkose weiter bei freiem Zugang zu Wasser und Futter versorgt bis zur Euthanasie nach 6h respektive 24h durch Isofluranüberdosierung, worauf die Blut- und Organentnahme erfolgte.

3.2.5 Blut- und Organentnahme

Nach Ketaminüberdosierung (fäkale Peritonitis) oder Isofluranüberdosierung (*S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie) und Überprüfung der Narkosetiefe der Tiere erfolgte

die Laparotomie und Eröffnung des Peritonealraumes. Durch seitliche Verlagerung des Darmpaketes wurde die *Vena cava caudalis* freigelegt und unter sanftem Gegenzug mittels einer 24G Kanüle (Sterican 100, Braun, Melsungen, Deutschland) punktiert. Es erfolgte die Entnahme des kompletten asservierbaren Blutvolumens in eine Omnifix-F 1ml Spritze (Braun, Melsungen, Deutschland). Hierdurch kam es unter Narkose zum schmerzlosen Ausbluten der Tiere. Das Blutvolumen wurde mit der dreifachen Menge PAXgene Reagenz (PreAnalytix, Qiagen, Hilden, Deutschland) zur RNA-Stabilisierung für weitere Analysen versetzt, gemischt und bei -80°C tiefgefroren. Im Weiteren erfolgte die sterile Entnahme von Milz, Leber, Nieren, Herz und Lunge. Nach Teilung der Organe wurde jeweils ein Teil in 2ml Kryoröhrchen im flüssigen Stickstoff Schock gefroren und anschließend bei -80°C zur späteren RNA-Isolation sowie proteomischen Analysen gelagert. Der zweite Teil wurde in 4%iger Paraformaldehydlösung für 24h zur weiteren histologischen Aufarbeitung fixiert. Die Analysen der Organe Nieren und Herz sowie die histologischen und proteomischen Untersuchungen sind Gegenstand weiterer Untersuchungen und werden nicht im Rahmen dieser Arbeit diskutiert.

3.2.6 Zellzählung in der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Die Mäuse (n = 5) wurden bis zum Atemstillstand Isofluran exponiert und anschließend sofort lavagiert. Dazu wurde die Trachea operativ freigelegt und quer inzidiert und anschließend ein 20G Tubus (Pastenkanüle, transcoject, Neumünster, Deutschland) eingeführt. Der Tubus wurde in seiner Position in der Trachea durch Umschlingen mit einem Vicrylfaden (4/0, MARLIN; Catgut GmbH, Markneukirchen, Deutschland) fixiert. Zur Gewinnung von residenten sowie inflammatorisch invadierten Entzündungszellen wurde die Lunge mit eiskaltem PBS/EDTA mittels einer 1ml Spritze (Omnifix-F, Braun, Melsungen, Deutschland) bis zu einem Gesamtvolumen von 6ml ausgespült. Die so erhaltene BAL-Flüssigkeit wurde anschließend 9min bei 1400rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1ml RPMI Medium (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) mit 10% FCS aufgenommen. Die Zellzahl in der BAL-Flüssigkeit wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen nach Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten mittels Cytospin Zytozentrifuge (Cytospin 4, SHANDON, Thermoscientific, Waltham, MA, USA) und entsprechender Färbung mikroskopisch differenziert (DM 1000, Leica Microsysteme, Wetzlar, Deutschland).

3.2.7 Keimzahlbestimmung in der Lunge

Nach der BAL wurde der Brustkorb der Mäuse eröffnet und die Lunge steril entnommen sowie in ein steriles Polypropylen Tube (14ml, greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Die Lungen wurden homogenisiert (Ultra-Turrax, IKA, Staufen, Deutschland), in 2ml HBSS (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) aufgenommen und durch einen sterilen Zellstrainer (100 µm, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) in ein 50ml Tube (Sarstedt AG & Co, Numbrecht, Deutschland) gegeben. Die Bestimmung der Pneumokokken-Last in der Lunge erfolgte nach Ausstrich serieller Verdünnungsstufen des Lungenhomogenates in THB auf Columbia-Agarplatten mit 5% Schafblut (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) mit anschließender Kultivierung der Platten bei 37°C und 5% CO₂ für 18h zur Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten.

3.3 Eingesetzte biologische Materialien

3.3.1 Humane Faeces

Tabelle 2. Bakterielle Zusammensetzung der humanen Faeces

A: Bakteriengenus/Bakterienspezies	Keimzahl (KBE/ml)
<i>Escherichia coli</i>	4,8 x 10 ⁵
<i>G Streptokokken</i>	2 x 10 ⁵
<i>Enterokokken</i>	5 x 10 ⁵
<i>Klebsielle oxytoca</i>	5 x 10 ⁴
<i>Peptostreptokokken</i>	3,6 x 10 ⁷
<i>Veillonella</i>	3,2 x 10 ⁷
<i>Bacteroides</i>	4,1 x 10 ⁷
<i>Pervotella</i>	1 x 10 ⁶
Gesamtkeimzahl	1,11 x 10⁸

B: Übergeordnete Gruppen	Keimzahl (KBE/ml)
Aerobier	1,23 x 10 ⁶
Anaerobier	1,1 x 10 ⁸
Gram-positiv	3,67 x 10 ⁷
Gram-negativ	7,45 x 10 ⁷

Bakterielle Zusammensetzung der gepoolten humanen Faeces fünf gesunder Nicht-Vegetarier. **A)** Einteilung nach Bakteriengenus oder Bakterienspezies. **B)** Einteilung nach übergeordneten Bakteriengruppen. Keimzahlen in Kolonie bildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml).

3.3.2 *S. pneumoniae* Serotyp 2 (D39)

Die Anzucht der Bakterien zur Induktion der Pneumokokken-Pneumonie erfolgte im Labor der Experimentellen Pneumologie der Medizinischen Hochschule Hannover (PD Dr. Ulrich Maus). Pneumolysin produzierende Isolate von *S. pneumoniae* Serotyp 2 (D39) wurden in *Todd Hewitt Broth* (Difco Laboratories, Augsburg, Deutschland) mit 0,1% Hefeextrakt bei 37°C und 5% CO₂ angezüchtet (Mid-log Phase) und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Quantifizierung der Pneumokokken erfolgte nach Ausstrich serieller Verdünnungsstufen der Bakteriensuspension auf Schafblutagarplatten (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) sowie Inkubation der Platten bei 37°C und 5% CO₂ für 18h mit nachfolgender Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten (KBE).

3.4 Molekularbiologische Methodik

3.4.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Die RNA-Aufarbeitung wurde in den Räumlichkeiten des Forschungszentrums Beutenberg, Jena von mir durchgeführt. Die Isolation der zellulären RNA aus Gewebe wurde für die hier dargestellte Fragestellung aus den Organen Lunge, Leber und Milz durchgeführt. Hierzu wurden 30mg des Schock gefrorenen Gewebes nach dem Protokoll des *RNeasy Mini Kits* der Firma Qiagen[®] (Hilden, Deutschland) in je 800µl RLT-Puffer versetzt mit 10µl Beta-Mercaptoethanol(β-ME)/ml RLT-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe einer 5mm Stahlkugel der Firma Retsch[®] (Haan, Deutschland) und Verschluss des 2,2ml Rundbodensafelock Reaktionsgefäßes der Firma Eppendorf[®] (Hamburg, Deutschland) erfolgte die sofortige mechanische Lyse des Gewebes in einer Kugelmühle (Tissue Lyser Qiagen[®], produziert von Retsch, Haan, Deutschland) mit einer Frequenz von 30Hz für 4min. Durch Aufnahme des Gewebes in der Stabilisierungslösung (RLT-Puffer/β-ME) und sofortigen mechanischen Aufschluss des Gewebes wurde die Degradierung der RNA durch zelluläre und ubiquitäre RNasen verhindert, so dass artifizielle Veränderungen des Genexpressionsmuster nahezu ausgeschlossen werden können. Im Anschluss wurde das Homogenisat in ein 2,2ml Spitzboden Reaktionsgefäß der Firma Eppendorf[®] überführt und bei 16.000xg (Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland) für 3min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues 2,2ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 800µl 70% Ethanol, welcher die Bedingungen zur selektiven Bindung der RNA an die Silikatmatrix der Säule optimiert und Resuspension der Lösung erfolgte die etappenweise Auftragung von 700µl der Suspension auf die Säule sowie Zentrifugation für 30sec bei 16.000xg. Dieser Vorgang wurde nach

jeweiliger Verwerfung des Säulendurchflusses so lange wiederholt bis die komplette Probe auf der Säule aufgetragen war. Vor Elution der an der Säule gebundenen RNA erfolgten noch 2 Waschschriffe mit RW1-Puffer (700µl) und RPE-Puffer (500µl) und jeweils einer Zentrifugation für 30sec bei 16.000xg mit jeweiligem Verwerfen des Eluats. Nach einem zusätzlichen Waschschriff mit RPE-Puffer (500µl) und Zentrifugation für 2min bei 16.000xg wurde der Durchfluss mitsamt Auffanggefäß verworfen um Verschleppungen von Ethanol zu vermeiden. Die Säule mit der gebundenen RNA wurde in einem neuen Reaktionsgefäß aufgenommen. Die nachfolgende trockene Zentrifugation für 1min bei 16.000xg mit anschließendem Verwerfen des Auffanggefäßes sollte ebenfalls einer möglichen Verschleppung der eingesetzten Substanzen entgegenwirken, welche sich ggf. störend auf weitere Reaktionsschritte und Analysen auswirken könnten. Zur Elution der an der Silicatmatrix der Säule gebundenen RNA wurde die Säule zunächst auf ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden dann 30µl 70°C warmen RNase freien Wassers auf das Zentrum der Säulenmembran gegeben. Durch das vorgeheizte Nuklease-freie Wasser mit geringer Ionenstärke wurde eine Konformationsänderung der RNA mit Entfaltung und somit besserer Ablösung von der Membran erzielt. Nach einer Zentrifugation für 1min bei 16.000xg befand sich die eluierte RNA im 1,5ml Reaktionsgefäß. Dieses wurde vor der weiteren Vermessung direkt auf Eis gelagert bzw. bei -80°C tiefgefroren.

3.4.2 RNA-Isolation aus Vollblut

Die RNA-Isolation aus Vollblut wurde nach dem Handbuch und Standardprotokoll des *PAXgene Blood RNA Kit* der Firma PreAnalytix® (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Dieses Protokoll ist für die RNA-Isolation aus humanen Vollblutproben etabliert. Zur Isolation von RNA aus Mausvollblut wurde das Mischungsverhältnis von PAXgene Reagenz zu Blutvolumen, wie unter Abschnitt 2.4.4. beschrieben, beibehalten. Das entnommene und mit PAXgene Reagenz versetzte Vollblut wurde in 4ml Kryoröhrchen der Firma Brand (Wertheim, Deutschland) bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren. Nach Auftauen wurden die Proben zur vollständigen Hämolyse über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Protokoll.

Zunächst erfolgte die Zentrifugation der Proben für 10min bei 4000xg in einem Ausschwingrotor (T6000D, Sorvall, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig dekantiert. Nach Zugabe von 4ml RNase-freiem Wasser sowie Resuspension erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10min bei 4000xg im

Ausschwingrotor. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig und vollständig dekantiert und 350µl Resuspendierungs-Puffer zugegeben. Nach vollständiger Resuspension und Vortexen wurde die Probe in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurden im Folgenden 300µl Bindungspuffer sowie 40µl Proteinase K gegeben. Nach 5-sec. Vortexen wurde der Ansatz bei 55°C im Schüttelinkubator (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei einer Geschwindigkeit von 1200rpm inkubiert. Anschließend wurde das Lysat direkt auf eine PAXgene Homogenisier-Spinsäule, welche zuvor auf einem 2ml-Processing-Tube platziert wurde gegeben. Nach einer Zentrifugation bei 16.000xg für 3min (Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland) wurde der Überstand vorsichtig ohne Aufwirbeln des Pellets in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Im Weiteren wurden 350µl 96% Ethanol p.a. hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Durch eine kurze Zentrifugation (max. 1-2sec.) bei niedriger Drehzahl (500-1000xg) wurde die Probenflüssigkeit am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt, um etwaige Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Weiter wurden 700µl der Probe auf eine PAXgene RNA Spinsäule, welche zuvor auf einem 2ml-Processing-Tube platziert wurde überführt und bei 16.000xg für 1min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Spinsäule auf ein neues Processing-Tube überführt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis die komplette Probe über die Säule gelaufen war. Für die folgenden Schritte wurde nach jedem Zentrifugationsschritt ein neues Processing-Tube verwendet. Es wurden 350µl Waschpuffer 1 auf die Säule gegeben und bei 16.000xg für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde frisch angesetzte DNase-I-Inkubationsmischung (10µl DNase-Stammlösung und 70µl DNA-Verdaupuffer, *RNase-free DNase Set*, Qiagen, Hilden, Deutschland) direkt auf die Membran der Spinsäule gegeben, so dass die komplette Membran benetzt war. Es erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 15min. Nach Zugabe von 350µl Waschpuffer 1 wurde ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 16.000xg für 1min angeschlossen. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit je 500µl ethanolhaltigem Waschpuffer 2, wobei die Zentrifugationen bei 16.000xg für 1min respektive 3min erfolgten. Die anschließende trockene Zentrifugation bei 16.000xg für 1min sollte die Verschleppung an der Säule haftender Reagenzien verhindern. Im Anschluss wurde die Säule auf ein 1ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 40µl Elutionspuffer mit kompletter Benetzung der Säulenmembran erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt bei 16.000xg für 1min. Die eluierte RNA wurde direkt auf Eis gestellt und nach Konzentrationsmessung am *NanoDrop*[®] *ND-1000* der Firma

NanoDrop Technologies Inc. (Wilmington, USA) (siehe Abschnitt 3.4.6.7) bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.4.3 Globinclear Prozedur

Bei der RNA-Isolation aus Vollblutproben entstehen durch den hohen Gehalt (70%) von α - und β -Globin mRNA an der total-RNA spezifische Probleme bei der Weiterverarbeitung mittels *Microarray*technologie. Durch Verdünnung der weniger abundanten Nicht-Globin mRNA, welche im eigentlichen Fokus der Genexpressionsanalyse steht, kommt es zu einer wesentlichen Reduktion der Sensitivität und Aussagekraft der angewandten *Microarray*technologie.

Die Entfernung der Globin-RNA aus der mittels des PAXgene Protokolls gewonnenen RNA aus Vollblut wurde nach dem Protokoll des *GLOBINclearTM Mouse/Rat Kit* der Firma Ambion[®] (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Zum Einsatz kamen jeweils 1-10 μ g total-RNA, wobei eine Mindestkonzentration von 70ng/ μ l bzw. ein maximales Volumen von 14 μ l eingesetzt werden konnte. Gemäß Protokoll erfolgte zunächst eine Hybridisierung der Globin mRNA mit Biotin markierten *Capture Oligonukleotiden*, welche in einem weiteren Schritt an Streptavidin markierte magnetische *Beads* gebunden wurden. Die derart über einen Magneten entfernte Globin-mRNA wurde mitsamt der *Beads* verworfen und die verbleibende mRNA mit einer weiteren magnetischen *Bead* Prozedur aufgereinigt.

Nach protokollgemäßer Vorbereitung der Reagenzien, der *Streptavidin Magnetic Beads* (SMB) sowie des *RNA Bead Resuspension Mixes* (BRM) erfolgte die Hybridisierung der Globin-mRNA an *Globin Capture Oligonukleotide*. Hierzu wurde das konzentrationsabhängige Volumen der eingesetzten total-RNA (i.d.R. 14 μ l) in einem 1,5ml Reaktionsgefäß sofern notwendig mit RNase-freiem Wasser auf 14 μ l aufgefüllt, sowie 1 μ l *Capture Oligo Mix* zugegeben. Weiter wurden 15 μ l vorgeheizter (55°C) zweifach Hybridisierungs-Puffer zugegeben und der Ansatz durch Vortexen gemischt. Nach einer kurzen Zentrifugation (< 2sec; < 1000xg, Fresco Biofuge, Heraeus, Hanau, Deutschland) erfolgte die Hybridisierung im Inkubator (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 50°C für 15min. Anschließend wurden je 30 μ l der vorbereiteten SMB (50°C) zugegeben. Nach Vortexen und kurzer Zentrifugation wurde der Ansatz im Schüttelinkubator (500rpm, Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 50°C für 30min inkubiert. Nach Vortexen sowie kurzer Zentrifugation wurden die Reaktionsgefäße mit geöffnetem Deckel in einen Magnetständer (Promega

GmbH, Mannheim, Deutschland) verbracht und mit einem fusselfreien Tuch abgedeckt. Während der 5-minütigen Wartezeit wurden die SMB vom Magneten angezogen, so dass der Überstand mit der von Globin-RNA befreiten RNA vorsichtig in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Dieses wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Die nächsten Reaktionsschritte dienten der Aufreinigung der von Globin-RNA befreiten RNA. Hierzu wurden je 100µl RNA-Bindungspuffer sowie je 20µl des BRM je Probe zugegeben. Nach 10-sec. Vortexen und einer kurzen Zentrifugation wurden die Proben wieder in den Magnetständer verbracht. Nach einer 5-min. Wartezeit wurde der Überstand möglichst vollständig entfernt und verworfen. Die Reaktionsgefäße wurden wieder aus dem Magnetständer entfernt und zu den verbliebenen RNA-*Beads* wurde 200µl RNA Waschlösung zugegeben, gut resuspendiert und für 10Sekunden gevortext. Dieser Schritt diente der Reinigung der *Beads*, welche die aufgereinigte RNA enthielten. Nach einer kurzen Zentrifugation erfolgte nochmals eine 5-min. Inkubation im Magnetständer. Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und die Inkubation im Magnetständer wiederholt, um die restliche Flüssigkeit entfernen zu können. Nach Abheben dieser mit einer dünnen Pipette wurden die Reaktionsgefäße außerhalb des Magnetständers mit geöffnetem Deckel für 5min trocknen gelassen.

Es schloss sich die Elution der an den magnetischen *Beads* gebundenen aufgereinigten RNA an. Hierzu wurden, abhängig von der eingesetzten Konzentration der total-RNA zwischen 10 und 20µl Elutionspuffer (58°C) zugegeben und die *Beads* gut resuspendiert sowie 10sec gevortext und kurz abzentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5min im Inkubator bei 58°C. Nach Vortexen (10sec) und kurzer Zentrifugation wurden die Proben in den Magnetständer verbracht und dort 5min belassen. Der Überstand mit der aufgereinigten eluierten RNA wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.4.4 RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle

Die RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle ebenso wie die folgenden Schritte inklusive der *Microarray*experimente wurden in den Räumlichkeiten der Firma SIRS-Lab GmbH, Beutenberg, Jena nach Anleitung durch Frau Dr. Elke Grunow von mir durchgeführt.

Die Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA-Proben erfolgte mithilfe der *Lab-on-Chip Technologie* des Agilent 2100 Bioanalyser der Firma Agilent

Technologies[®] (Böblingen, Deutschland). Die Analysen wurden mittels des *Agilent 2100 Bioanalyzer* der Firma Agilent Technologies[®] durchgeführt. In einem einzigen Analyseschritt werden hierbei unter dem Einsatz einer nur geringen Probenmenge durch Kapillargelelektrophorese die Menge und die Integrität von Gesamt- und Boten-RNA (mRNA) bestimmt. Hierbei werden die RNA Proben nach Auftragen auf einen Gel tragenden *Chip* mithilfe eines Spannungsfeldes ihrer Größe nach getrennt und mittels eines Lasers können die einzelnen RNA Fragmente, welche mit einem interkalierenden Farbstoff markiert wurden, detektiert werden. Die Ergebnisse werden als Histogramm und als Bandendarstellung ausgegeben. Die so genannte RNA-Integritätsnummer (RIN) stellt dabei ein Qualitätslabel dar, das von Agilent Technologies und Quantiom Bioinformatics entwickelt wurde. Bei diesem System wird der RNA-Qualität ein Zahlenwert, der RIN-Wert, zugeordnet. Auf Basis der ribosomalen Untereinheiten 28S- zu 18S-rRNA und deren Verhältnis sowie degradierten Abbauprodukten wird von der Software ein RIN-Wert auf einer Skala von 1 bis 10 ermittelt. Dabei entspricht 1 einer vollständig degradierten RNA und 10 einer völlig intakten RNA. Die RIN-Skala repräsentiert einen weltweiten RNA-Qualitätsstandard, wobei RIN-Werte von 7 bis 10 einer guten bis sehr guten, Werte von 4 bis 6 einer mittelmäßigen und Werte kleiner 4 einer schlechten RNA-Integrität entsprechen. Die in der vorgelegten Arbeit erhobenen Werte lagen im Mittel bei 7.5 sowie die Einzelwerte jeweils über einem RIN-Wert von 6 und konnten somit in die weitere Analyse eingeschlossen werden.

Die Durchführung der Analyse erfolgte nach dem *RNA 6000 Nano Assay* Protokoll und mithilfe der Komponenten des *RNA 6000 Nano LabChip[®] Kits* der Firma Agilent Technologies[®]. Die Gelmatrix wurde vor jedem Analysendurchlauf frisch mit Farbstoffkonzentrat versetzt, zentrifugiert und auf den *Chip* aufgetragen. Hierzu wurden 550µl der RNA 6000 Nano Gel Matrix in ein Filterzentrifugenröhrchen pipettiert und für 10min bei 1500xg (Minispin Plus Zentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. 65µl des zentrifugierten Gels wurde mit 1µl RNA 6000 Nano Farbstoffkonzentrat versetzt. Das Farbstoffkonzentrat wurde zuvor 30min auf Raumtemperatur gebracht und kurz gemischt. Der Gel-Farbstoff-Mix wurde für 10min bei 13.000xg zentrifugiert und diente anschließend zur Beladung des *Chips*. Diese erfolgte mithilfe eines Spritzen-Stempel-Systemes unter standardisiertem Druck. Weiterhin wurden 5µl RNA 6000 Nano Marker in jedes der 12 Probenwells sowie in das Well für den Größenmarker pipettiert. Jeweils 2µl der RNA-Proben und des Größenmarkers wurden auf 70 °C für 2min erhitzt und danach sofort auf Eis abgekühlt. Je 1µl der denaturierten RNA

und des Markers wurden in die entsprechenden Wells pipettiert und der *Chip* für 1min bei 2400rpm (IKA Vortex Mixer, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) geschüttelt. Danach erfolgte die sofortige Analyse des *Chips* im Bioanalyser mithilfe der *2100 Expert Software*.

3.4.4.1 Aliquotierung der RNA für die Amplifikation

Im Anschluss an die Konzentrationsbestimmung und Qualitätsanalyse der RNA wurden für die RNA-Amplifikation jeweils 500ng RNA ad 11µl mit RNase freiem Wasser in 0,5ml Eppendorf® Reaktionsgefäßen aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.4.5 Charakteristik des eingesetzten Microarrays

Bei den in der vorgelegten Arbeit verwendeten *Microarrays* handelt es sich um „*Whole-Genome Expression BeadChips*“ der Firma Illumina® (Mouse WG-6 v2.0). Dieser *Bead Chip* besteht aus jeweils 6 Arrays, so dass 6 Proben auf einem *Chip* aufgetragen werden können. Bei dem verwendeten *Bead Chip* werden vom Hersteller 3µm große *Beads*, welche mit DNA Oligonukleotiden bestückt sind über eine geätzte Array Matrix (fiberoptische Bündel) rollen gelassen. Nach dem Zufallsprinzip sucht sich dabei jeder *Bead* eine Vertiefung und verhaftet dort. Hierbei ist jeder *Bead*-Typ und somit jedes Oligonukleotid, welches generell aus 50 Basen besteht, im Mittel über 30mal jedoch wenigstens 5mal vertreten. Da auf jedem Array die Verteilung der *Beads* individuell ist, gibt es zu jedem *Chip*, bestehend aus 6 Arrays eine Dechiffrierungs-CD. Zu deren Erstellung verfügt jeder *Bead* zusätzlich zum entsprechenden 50 Basen-Oligonukleotid über eine 29 Basen-Adressierungssequenz, worüber von der Software die Lokalisation des jeweiligen *Beads* auf dem *Array* erkannt werden kann. Bereits vor der Auslieferung werden die *Chips* mehrfach hybridisiert und gescannt, um die Lage der einzelnen *Bead*-Typen zu bestimmen, hierzu wird die Adressierungssequenz genutzt. Somit können die gemessenen Fluoreszenzsignale dem entsprechenden Oligonukleotid zugeordnet werden. Insgesamt können über 45.200 Transkripte detektiert werden. Während der Hybridisierung bindet die amplifizierte biotinylierte cRNA am komplementären *Bead*-gebundenen Oligonukleotid und wird im anschließenden Färbeschritt mittels Streptavidin-Cy3 markiert. Ungebundene Fluoreszenz wird bei den folgenden Waschschrritten entfernt.

3.4.6 RNA-Amplifikation und Labeling

Für die Amplifikation und Biotinylierung der total-RNA wurde nach dem Protokoll des *Illumina*[®] *TotalPrep RNA Amplifikation Kit* der Firma Ambion (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verfahren. RNA Amplifikation ist die Standardmethode zur Probenvorbereitung für die *Arrayanalyse* (Kacharina et al. 1999, Pabon et al. 2001). Im Rahmen dieser Prozedur erfolgt zunächst eine reverse Transkription mit einem oligo(dT) Primer, welcher einen T7 Promotor trägt. Als reverse Transkriptase wird hierbei das Enzym *Array Script*[™] eingesetzt. Dieses produziert eine entsprechende einzelsträngige cDNA, welche in einem weiteren Schritt in doppelsträngige cDNA umgewandelt wird. Nach Aufreinigung dieser cDNA erfolgt die *in-vitro* Transkription mit der T7 RNA Polymerase. Durch Einsatz von Biotin UTP werden Hunderte bis Tausende biotinylierte *antisense* RNA Kopien (cRNA) der jeweiligen mRNA-Probe produziert. Diese biotinylierte cRNA kann nach Aufreinigung direkt in die Hybridisierung der *Arrays* eingesetzt werden. Im Detail wurde bei der soeben beschriebenen Prozedur folgendermaßen vorgegangen:

3.4.6.1 Reverse Transkription der RNA zur Synthese der einsträngigen cDNA

Für die cDNA-Erststrangsynthese wurde die unter 3.4.4.1 beschriebene aliquotierte Probe mit 9µl des vorab angesetzten, vorsichtig gevortexten sowie kurz abzentrifugierten *Reverse Transkriptions Master Mix* versetzt. Nach 3-4maligem Auf- und Abpipettieren wurde der Reaktionsansatz für 5sec abzentrifugiert (Minispin Plus Zentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), so dass er sich auf dem Boden des Reaktionsgefäßes sammelte. Es schloss sich eine Inkubation für 2h bei 42°C im vorgeheizten Eppendorf[®] Mastercycler (Hamburg, Deutschland) an. Nach der Inkubation erfolgte wieder eine kurze Zentrifugation des Reaktionsansatzes für 5sec sowie die Lagerung der Proben auf Eis.

REVERSE TRANSKRIPTIONS MASTER MIX:	
1µl	T7 Oligo(dT) Primer
2µl	10 x Erststrangsynthese Puffer
4µl	dNTP Mix
1µl	RNase Inhibitor
1µl	<i>Array Script</i>

3.4.6.2 *Zweitstrang cDNA Synthese*

Nach Vorbereitung des eisgekühlten Zweitstrang Master Mixes wird dieser ebenfalls vorsichtig gevortext und kurz (5sec) abzentrifugiert. Im Anschluss wurden jeweils 80µl dieses Mixes zu jeder Probe gegeben. Nach 3-4maligem Auf- und Abpipettieren wurde der Reaktionsansatz wiederum für 5sec abzentrifugiert, so dass er sich auf dem Boden des Reaktionsgefäßes sammelte. Es erfolgte die direkte Inkubation der Reaktionsansätze in dem auf 16°C vorgekühlten Eppendorf® Mastercycler (Deckelheizung ausgeschaltet) für 2h. Anschließend wurden die Proben direkt auf Eis gelagert.

ZWEITSTRANG MASTER MIX:	
63µl	Nuklease-freies Wasser
10µl	10 x Zweitstrangsynthese Puffer
4µl	dNTP Mix
2µl	DNA-Polymerase
1µl	RNase H

3.4.6.3 *cDNA-Aufreinigung*

Zur Aufreinigung der doppelsträngigen cDNA wurden zunächst 250µl cDNA Bindungs-Puffer zu jeder Probe gegeben und der Ansatz durch 2-3maliges Auf- und Abpipettieren sowie kurzes Anschneiden des Reaktionsgefäßes gemischt. Durch kurze Zentrifugation (5sec, Minispin Plus Zentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde der Reaktionsansatz auf dem Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt und direkt im Anschluss auf den cDNA Filter überpipettiert. Es folgte eine Zentrifugation für 1min bei 10.000xg, wobei die cDNA im Filter gebunden wurde. Das Eluat wurde verworfen und anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 500µl des ethanolhaltigen Waschpuffers sowie erneuter Zentrifugation bei 10.000xg für 1min. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde eine trockene Zentrifugation des cDNA Filters für 1min bei 10.000x g durchgeführt und der cDNA Filter dann auf ein cDNA-Auffanggefäß überführt. Zur Elution der am Filter gebundenen cDNA fand zunächst die Zugabe von 10µl Nuklease-freiem Wasser (55°C) mit möglichst kompletter Benetzung Filters statt. Nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch Zentrifugation bei 10.000xg für 90 Sekunden die cDNA ins Auffanggefäß eluiert. Dieser Vorgang wurde ohne erneute Inkubation mit 9µl Nuklease-freiem Wasser (55°C) wiederholt und das Eluat mit der doppelsträngigen cDNA im gleichen Auffanggefäß gesammelt.

3.4.6.4 *In vitro* Transkription zur cRNA-Synthese

Die Vorbereitung des *in vitro* Transkriptions Master Mixes erfolgte bei Raumtemperatur. Nach vorsichtigem Vortexen und kurzer Zentrifugation (5sec) wurden 7,5µl des Master Mixes zu jeder cDNA Probe gegeben. Durch vorsichtiges 3-4maliges Auf- und Abpipettieren sowie kurzes Anschneiden des Reaktionsgefäßes wurde der Ansatz gemischt und durch anschließende kurze Zentrifugation (5sec) auf dem Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Darauf folgend wurden die Proben im gut verschlossenen Reaktionsgefäß in den auf 37°C vortemperierten Hybridisierungsöfen der Firma Illumina® (San Diego, CA, USA) überführt und für 14h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion direkt mit 75µl Nuklease-freiem Wasser abgestoppt, so dass ein Endvolumen von 100µl resultierte. Es wurde direkt mit der Aufreinigung der cRNA fortgefahren.

IN VITRO TRANSKRIPTIONS MASTER MIX:	
2.5µl	T7 10X Reaktions Puffer
2.5µl	T7 Enzyme Mix
2.5µl	Biotin-NTP Mix

3.4.6.5 *cRNA-Aufreinigung*

Während der Aufreinigung der biotinylierten cRNA werden Enzyme, Salze und überschüssige Nukleotide aus der Probe entfernt. Nach Zugabe von 350µl cRNA Bindungspuffer erfolgte die direkte Zugabe von 250µl 100% Ethanol p.a. zu jeder Probe. Durch diese Behandlung wird die cRNA in einen semi-präzipitierten Zustand überführt, weshalb hier besonders zügiges Arbeiten zur Vermeidung ausgedehnter cRNA Verluste angezeigt ist. Nach kurzem 3maligem Auf- und Abpipettieren wurde der Reaktionsansatz direkt auf den cRNA Filter überpipettiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 10.000xg (Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 1min. Die biotinylierte cRNA befand sich nun im cRNA-Filter und das Eluat wurde verworfen. Nach dem anschließenden Waschschrift mit 650µl Waschpuffer und Zentrifugation für 1min bei 10.000xg wurde ebenfalls der Durchfluss verworfen und eine trockene Zentrifugation (1min, 10.000xg) durchgeführt. Im Weiteren wurde der cRNA-Filter auf das cRNA Auffanggefäß überführt. Zur Elution der cRNA wurden 100µl Nuklease-freies Wasser (55°C) auf den Filter pipettiert und bei Raumtemperatur für 2min inkubiert. Nach folgender Zentrifugation bei 10.000xg für 90sec befand sich die biotinylierte aufgereinigte cRNA im Auffanggefäß. Dieses wurde sofort auf Eis platziert. Direkt im Anschluss wurde

die Konzentrationsbestimmung durch optische Dichtemessung am Spektrophotometer durchgeführt.

3.4.6.6 Kontroll RNA (Universal-RNA)

Um am Genexpressionsmuster hervorgerufene Veränderungen, welche durch methodische und technische Fehler entstehen können, zu identifizieren, wurden bei jedem Amplifikationslauf jeweils 500ng einer universalen Maus-Referenz RNA als Kontrolle amplifiziert. Diese diente sowohl der Kontrolle der jeweiligen Amplifikation als auch der Hybridisierungskontrolle. Insgesamt wurden 8 Ansätze derselben Referenz-RNA amplifiziert und hybridisiert. Es kam die *Universal Mouse Reference RNA* der Firma Stratagene® (La Jolla, CA, USA) zum Einsatz, welche sich aus gepoolter DNase-behandelter total-RNA verschiedener Maus-Zelllinien zusammensetzt.

3.4.6.7 cRNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der cRNA wurde mittels UV/Vis-Spektrophotometrie mithilfe des *NanoDrop*® *ND-1000* der Firma NanoDrop Technologies Inc. (Wilmington, USA) bei einer Wellenlänge von 260nm durchgeführt. Die Probe wird aufgrund der Oberflächenspannung eines 1µl Tropfens frei aufgespannt wird und somit entfällt die Küvettenmessung. Hierbei wird die Probe auf das Ende eines fiberoptischen Kabels (Empfängerfaser) aufpipettiert. Eine zweite Faser, die Quellenfaser wird dann in Kontakt mit der flüssigen Probe gebracht, so dass die Probe aufgrund Ihrer Oberflächenspannung eine Brücke zwischen den beiden fiberoptischen Faserenden bildet. Mittels eines gepulsten Xenonlasers wird die Probe bestrahlt und der Lichtdurchtritt durch die Probe vom Spectrometer gemessen. Mithilfe einen spezialisierten Software erfolgt die Auswertung. Neben der Konzentration der Nukleinsäure (260nm, Angabe in ng/µl) erhält man noch folgende Parameter:

Quotient 260/280: Quotient der Probenabsorption bei 260nm und 280 nm. Dieser Quotient gibt Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäureprobe. Bei einem Quotient um 2.0 ist die Probe allgemein als „rein“ für RNA akzeptiert. Niedrigere Werte deuten auf die Anwesenheit von Protein, Phenol oder anderen im Bereich 280nm stark absorbierenden Kontaminanten hin. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben wiesen durchschnittliche Werte über 2,0 auf.

Quotient 260/230: Quotient der Probenabsorption bei 260nm und 230nm. Dieser stellt ein zweites Qualitätsmerkmal für die Reinheit der Nukleinsäureprobe dar und der Wert liegt in

der Regel zwischen 1.8 und 2.2. Hierbei werden niedermolekulare Verunreinigungen wie Puffersubstanzen, Detergentien und Phenol erfasst. Ein niedrigerer Wert deutet auf das Vorhandensein mit aufgereinigter Kontaminanten hin.

3.4.7 Hybridisierung, Färben und Waschen der *Microarrays*

Das Hybridisieren, Färben und Waschen der *Microarrays* erfolgte nach dem *Whole-Genome Gene Expression with IntelliHyb™ Seal* Protokoll (Revision B) der Firma Illumina® (San Diego, CA, USA). Für die Hybridisierung auf *Mouse WG-6 v2.0 Beadchips* (Illumina, San Diego, CA, USA) wurden 1.5µg biotinylierte cRNA eingesetzt. Die Hybridisierung fand unter vorsichtigem Wippen für 18h bei 55°C im Hybridisierungssofen der Firma Illumina® statt. Nach Wegwaschen ungebundener cRNA bindet in der anschließenden Färbung der an Streptavidin gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Cy3 über Streptavidin am Biotin der hybridisierten cRNA. Nach einem erneuten Waschschrift werden die *Bead Chips* getrocknet und das Fluoreszenzsignal über den *BeadArray Reader 500 X* (Illumina, San Diego, CA, USA) gescannt. Bei der Durchführung wurde im Einzelnen wie folgt verfahren:

3.4.7.1 Hybridisierung der *Microarrays*

Zunächst wurden 1,5µg der biotinylierten Proben-cRNA mit Nuklease-freiem Wasser auf 10µl aufgefüllt (bereits voraliquotiert). Dann wurden 20µl HYB Hybridisierungspuffers zu jeder Probe pipettiert, das Gemisch gevortext und dieser Ansatz bei 65°C für 5min im Thermomixer comfort der Firma Eppendorf® zur maximalen Entfaltung der cRNA inkubiert. Währenddessen wurden die Hybridisierungskammern vorbereitet durch Einlegen der *Chip*-Halterungen sowie Zugabe von jeweils 100µl des HCB-Befeuchtungspuffers in die vorgesehenen Befeuchtungskammern. Nach Inkubation der Proben erfolgte erneut kurzes Vortexen und eine kurze Zentrifugation sowie nach Abkühlung auf Raumtemperatur die Befüllung der jeweiligen *Arraytasche* mit 30µl der vorbereiteten Probe. Es wurden jeweils 6 Proben in einem Durchgang bearbeitet und nach Beladung aller *Arrays* die Hybridisierungskammer dicht und sicher verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 55°C für 18h unter gleichmäßigem Wippen auf mittlerer Geschwindigkeitsstufe (Stufe 5) im Hybridisierungssofen der Firma Illumina (San Diego, CA, USA).

3.4.7.2 Waschen, Färben und Trocknen der hybridisierten Microarrays

Die *Chips* wurden einzeln aus der Hybridisierungskammer entnommen und in einer Küvette, welche mit 250ml E1BC Waschpuffer befüllt wurde, mit der Arrayoberfläche nach oben untergetaucht. Anschließend wurde beim vollständig untergetauchten *Chip* die Folie abgezogen und der *Chip* in eine ebenfalls mit 250ml E1BC Puffer befüllte Färbeküvette überführt. Durch mehrmaliges Auf-und Abbewegen der *Chiphalterung* wurde die ungebundene Probe abgespült. Dieser Vorgang wurde für alle *Chips* einer Hybridisierungskammer wiederholt. Es folgte zunächst eine Inkubation für 10min 55°C vorgeheizten *High-Temperature Wash Buffer* im *SciGene HybexTM Microsample Incubator* (SciGene, Sunnyvale, CA, USA). Anschließend fand ein Waschvorgang in 250ml frischem E1BC-Puffer auf dem Kreisschüttler (Polymax 1040, Heidolph Instrumente GmbH, Schwabach, Deutschland) bei höchster Geschwindigkeitsstufe statt. Zur Präzipitation noch ungebundener Nukleinsäuren erfolgte ein Waschschrift in 250ml 100% Ethanol für 10 min auf dem Kreisschüttler, welcher von einem letzten E1BC-Waschschrift mit 2-min. Inkubation auf dem Kreisschüttler gefolgt wurde. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wurde vor der Fluoreszenzfärbung ein Blockschrift durchgeführt. Hierzu wurden die *Chips* einzeln mit der *Arrayoberfläche* nach oben gerichtet zusammen mit dem Blockpuffer E1 in kleine Plastikschälchen gegeben und auf dem Schüttler (Skyline Shaker DRS-12, ELMI, Rose Scientific Ltd., Cincinnati, Ohio, USA) bei mittlerer Stufe für 10min hin- und her gewippt. Dabei bedeckte der Puffer immer die *Arrayoberfläche*. Im nachfolgenden Färbeschrift wurden die *Chips* in gleicher Weise einzeln in neue Plastikschälchen, welche mit 2,5ml Blockpuffer E1 und 2,5µl Streptavidin Cy3 befüllt waren überführt. Die zum Schutz vor Lichteinstrahlung abgedeckten Schälchen wurden für 5min auf dem Schüttler bei mittlerer Stufe hin- und her gewippt. Nach diesem Färbeschrift wurde ungebundenes Streptavidin-Cy3 während eines erneuten gemeinsamen Waschschriftes in 250ml E1BC Waschpuffer für 5min auf dem Kreisschüttler weggespült. Das Trocknen der *Arrays* erfolgte während einer Zentrifugation bei 280xg für 4min. Anschließend wurden die *Chips* bis zur weiteren Auswertung im Dunkeln gelagert und zügig (innerhalb 6h) ausgelesen.

3.4.7.3 Scannen der Microarrays an der Illumina Bead Station

Nach dem Färben, Waschen und Trocknen wurden die *Arrays* mit einem *Beadarray Reader 500X* (Illumina, San Diego, CA, USA) gescannt und die Rohdaten wurden mittels

Bead Studio-Software extrahiert (Illumina Systems and Software 2005. *BeadStudio* Users Guide. Data Analysis Software for Use with Illumina Gene Expression Products. Doc. #11179632 Rev.B).

3.5 Statistische Analysen und bioinformatische Analysen

Die statistischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Matthias Kohl am Lehrstuhl für Stochastik der Universität Bayreuth durchgeführt. Die bioinformatischen Analysen wurden in enger Abstimmung mit und unter Anleitung von Dipl. Bioinf. Sandro Lambeck, einem Doktoranden der Abteilung für Bioinformatik des Hans-Knöll-Institutes in Jena durchgeführt. Die Analyse der Daten sowie die Erstellung der Illustrationen erfolgte mittels der *Software R* (www.R-project.org) und dessen Erweiterung *Bioconductor* (Gentleman et al. 2004).

3.5.1 Organ übergreifender Gesamtvergleich

3.5.1.1 Hierarchische Clusteranalyse

Für die Berechnung des Dendrogramms wurde die *average linkage* Methode mit Pearson's Korrelationsmaß genutzt (Eisen et al. 1998). Der *overview plot* zeigt in der Dendrogramm-Darstellung (oben) einen Indikator, der angibt wie fremd sich die Gruppen sind. Hohe Werte stehen für große Unterschiede. Zur Erstellung des Dendrogramms wurden alle detektierten Gene ohne weitere statistische Filterung verwendet.

3.5.1.2 Gene Expression Dynamics Inspector (GEDI)-Mapping

GEDI ist eine für akademische Nutzer frei verfügbare Software (<http://www.childrenshospital.org/research/ingber/GEDI/gedihome.htm>). Die Software benutzt selbst organisierende Karten, so genannte SOMs (*self-organizing maps*) (Kohonen 2000) um die hochdimensionalen Expressionsprofile von Zeitverläufen oder Probenklassierungen aus *Microarray* Experimenten in kohärente und robuste Mosaikbilder zu transferieren (Eichler et al. 2003, Guo et al. 2006). Hierbei werden koexprimierte Gene in so genannten Miniclustern zusammengefasst, welche dann innerhalb der Karte als ein Bildpunkt (Pixel) dargestellt werden. Dieser Pixel ist durch den Mittelwert des jeweiligen Clusters als \log_2FC charakterisiert. So können Muster molekularer Aktivität über Gen-, Zeit- und Probengrenzen hinweg visualisiert werden. Derart können Kandidatengene über die Software innerhalb der Minicluster identifiziert und betrachtet werden. Die Expressionsveränderungen (\log_2FC) wurden bezogen auf die modellspezifische

Shamgruppe anhand der Mediane logarithmierter Signale biologischer Replikate ermittelt und in die Software eingelesen.

3.5.1.3 *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)*

KEGG ist eine frei verfügbare Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg/>) biologischer Systeme bestehend aus genetischen Bausteinen (KEGG Gene), chemischen Bausteinen endogener und exogener Substanzen (KEGG Liganden), molekularer Netzwerke (KEGG Signalwege) sowie Hierarchien und Beziehungen biologischer Objekte (KEGG Brite) (Kanehisa 2002, Aoki und Kanehisa 2005, Kanehisa et al. 2006). Diese und andere Referenzdatenbanken ermöglichen die Verbindung zu den Lebensfunktionen über Kartierung von Signalwegen. Auf diese Weise können genomische, transkriptomische und proteomische Informationen aus Genen auf Referenzsignalwegen abgebildet werden. Wissensunterstützt können hiermit Rückschlüsse auf das systemische Verhalten der Zelle und des Organismus gezogen werden.

3.5.1.4 *Gene Set Enrichment Analyse (GSEA)*

Zum Finden überrepräsentierter KEGG Kategorien bzw. Signalwege (Kanehisa 2002, Kanehisa et al. 2006) wurden die \log_2FC mit einer *Gene Set Enrichment Analyse* abgebildet. Die verwendete Daten- und wissensintegrative Methode beruht auf einem hypergeometrischen Test über die erwartete Anzahl der Treffer der koexprimierten Gene, die zufällig erzielt werden könnte, die in Relation zu der beobachteten Anzahl gesetzt wird. Vergleichbar mit der "*Gene shaving*" Methode (Hastie et al. 2000) werden dabei koexprimierte Gene aus nahe beieinander liegenden Clustern (im 2x2 Gitter der GEDI-Merkmalkarte) auf überrepräsentierte *Pathways* getestet. Die Ergebnisse wurden nach Signifikanz der Anreicherung (*Enrichment*) der jeweiligen Kategorie geordnet. Des Weiteren wurde eine Darstellung entwickelt, die es erlaubt die Lokalisierung der Bestandteile der Pathways übersichtlich zu erfassen. Dies wurde mit einer den GEDI-Merkmalkarten transparent aufgelegten *balloonplot*-Schablone (<http://addictedtor.free.fr/-graphiques/RGraphGallery.php?graph=60>) erzielt. Im Gegensatz zu eindimensional angeordneten Clustern anderer Verfahren wird die zweidimensionale Ausgabeschicht der selbst organisierenden Merkmalkarten benutzt, um die Ergebnisse der Gruppierung zu verfeinern.

3.5.1.5 Erstellung der Heatmap

Mithilfe so genannter *Heatmaps* kann die Regulation der Genexpression veranschaulicht werden. Hierzu werden die in logarithmisierten Werten dargestellten Änderungen der Genexpression farbcodiert aufgetragen. So werden negativ regulierte Gene blau und positiv regulierte Gene rot dargestellt. Der Farbcode wird im Allgemeinen so gewählt, dass eine unveränderte Genexpression mittels einer neutralen Farbe (weiß/hellgelb) dargestellt ist.

3.5.2 Einzelorgananalyse

3.5.2.1 Venn Diagramme

Die so genannten Venn Diagramme wurden 1880 von John Venn (1834-1923) eingeführt. Das Diagramm besteht aus einem „Rahmen“ der das „Universum“ darstellt und darin befindet sich ein beliebiges geschlossenes Gebilde (z.B. ein Kreis) für jedes auftretende Objekt. Die „Kreise“ sind darüber hinaus so angeordnet, dass sich alle denkbaren Schnittflächen ergeben in denen die Anzahl der Übereinstimmungen angegeben wird. Zur Erstellung der Venn Diagramme wurden jeweils je Organ die Mittelwerte der logarithmierten Expressionsveränderungen zur Basis 2 (\log_2FC) der biologischen Replikate je Transkript verwendet.

3.5.2.2 Gene Set Enrichment Analyse der Schnittmengen (GSEA) aus den Venn Diagrammen

Die Analyse der Schnittmengen der Genexpression beider Infektionsmodelle aus den Venn Diagrammen erfolgte mithilfe des „*DAVID bioinformatics resources tools*“ (Huang da et al. 2009). Hierbei handelt es sich um eine frei verfügbare, integrierte biologische Wissensdatenbank, welche im Sinne eines analytischen Werkzeuges genutzt (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/content.jsp?file=/knowledgebase/DAVIDknowledgebase.htm>) werden kann. Mithilfe des Werkzeuges können biologische Informationen aus ausgedehnten Gen- oder Proteinlisten extrahiert werden. In der hier vorgelegten Arbeit wurde eine *Gene Set Enrichment Analyse* über den Schnittmengen der Venn Diagramme vollzogen. Hierbei werden die unter aufgeführten Datenbanken von DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov/helps/knowledgebase/DAVID_coverage.jpg) als Wissensgrundlage für die Überprüfung einer signifikanten Anreicherung von Komponenten bestimmter Stoffwechsel- und Signalwege überprüft. Die Software evaluiert u.a. einen

„*Fold Enrichment*“-Wert sowie den post hoc korrigierten p-wert (in der vorgelegten Arbeit wurde ein stringentes Vorgehen mit *Bonferroni* gewählt) für die jeweilige Kategorie aus. Hierbei zeigt der „*Fold-Enrichment*“-Wert an, wie stark die detektierten Elemente (Gene) der Kategorie im untersuchten Datensatz im Vergleich zum normalen Genom der untersuchten Spezies angereichert sind. Hierbei gilt ein Wert über 1.5 als interessant. Die Darstellung der untersuchten Kategorien erfolgt in funktionellen Gruppen geordnet nach im Datensatz gefundener Signifikanz der Anreicherung. Für unsere Auswertung erachteten wir einen nach *Bonferroni* korrigierten p-Wert ≤ 0.05 als signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Tierexperimente

4.1.1 Obduktionsergebnisse 24 Stunden nach Induktion der polymikrobiellen Peritonitis

In der Infektionsgruppe zeigten alle Tiere deutliche Anzeichen einer Peritonitis mit weißlich grauen Belägen, welche sich augenscheinlich als Fibrinablagerungen präsentierten und deutlicher Gefäßinjektion der Darmschlingen sowie eitrig-seröser Sekretion im Peritonealraum (Abbildung 1A). In der Shamgruppe ergaben sich keine Hinweise auf das Vorliegen einer Peritonitis (Abbildung 1B).

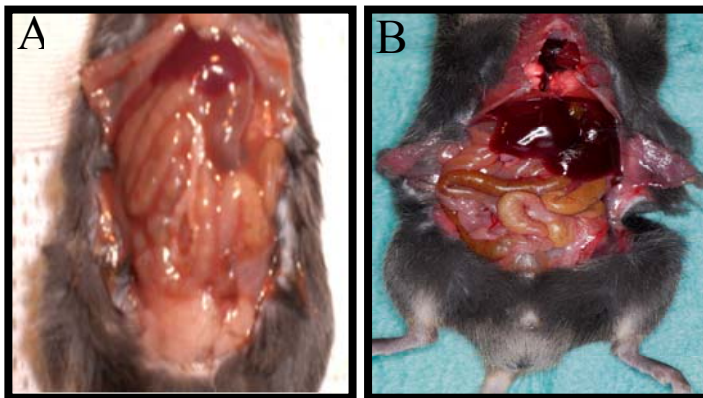


Abbildung 1. Obduktionsergebnisse der Peritonealhöhle 24h nach Induktion der fäkalen Peritonitis (2A) sowie nach einer Shaminjektion von physiologischer Kochsalzlösung. (2B). A) Deutliche Zeichen der Peritonitis: weißlich graue Beläge der intra-peritoneal gelegenen Organe, deutliche Gefäßinjektion der Darmschlingen, eitrig-seröse Sekretion. B) Keine Zeichen der Peritonitis.

4.1.2 Keimzahlbestimmung in der Lunge bei *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse der Keimlastbestimmung in den Lungen *S. pneumoniae*-infizierter Mäuse. Es ergab sich eine Reduktion der Keimlast an Tag 2 nach Infektion um ca. 2 log-Stufen im Vergleich zu Tag 1 nach Infektion.

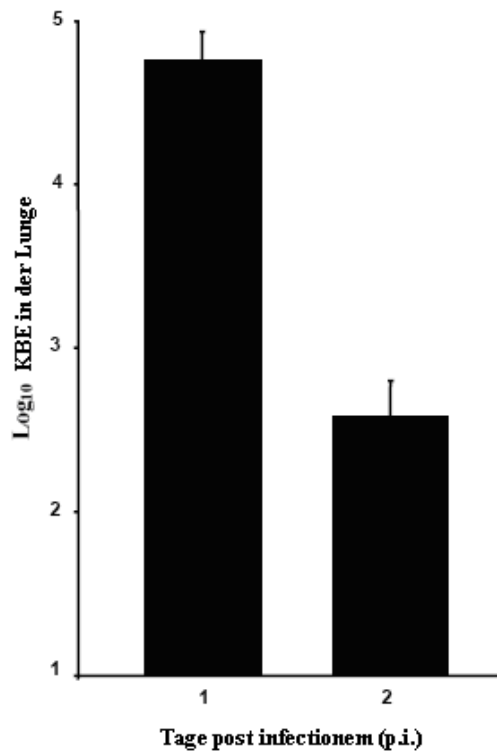


Abbildung 2. Keimzahlen von *S. pneumoniae* Serotyp 2 (D39) in der Lunge von Mäusen an Tag 1 und 2 nach Infektion. Y-Achse: Keimzahl von *S. pneumoniae* in der Lunge als zur Basis 10 logarithmierte Kolonie bildende Einheiten. X-Achse: Zeitachse, Tage nach Induktion einer Pneumonie durch intra-tracheale Instillation von *S. pneumoniae* Serotyp 2 (D39). Tierzahlen: n = 5 pro Tag.

4.1.3 Zellzahlen in der bronchoalveolären Lavage bei Pneumonie

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der Leukozytensubpopulationen in der bronchoalveolären Lavage. Es ergab sich eine dreifach gesteigerte Gesamtzellzahl einen Tag nach Induktion einer Pneumonie mit *S. pneumoniae* im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren sowie eine Zunahme der Gesamtzellzahl um das 1,5-fache von Tag 1 p.i. auf Tag 2 p.i. Außerdem zeigte sich ein massiver Anstieg der neutrophilen Granulozyten sowie eine deutliche Zunahme von Monozyten und Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage an Tag 1 p.i. im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Die Alveolarmakrophagen zeigten eher sinkende Tendenzen an Tag 1 p.i. verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren. Die Gesamtzahl neutrophiler Granulozyten zeigte von Tag 1 auf Tag 2 der Infektion eine sinkende Tendenz, wohingegen die Zellzahlen von Alveolarmakrophagen, Monozyten und Lymphozyten von Tag 1 auf Tag 2 deutlich anstiegen: die Lymphozytenzahlen nahmen um das 11-fache, die Monozyten um das 6-fache und die Alveolarmakrophagen um das 1.7-fache zu.

Tabelle 3. Zellzahlen der Leukozytensubpopulationen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) bei *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie sowie bei unbehandelten Kontrolltieren

BAL-Zelldifferenzierung						
		Alveolarmakro- phagen	Monozyten	Neutrophile	Lympho- zyten	Gesamt- zellzahl
unbehandelte Kontrollen	Mittelwert	449.793	3.940	667	2.267	456.667
	SEM	31.068	1.343	666	1.021	31.436
Tag 1 p.i.	Mittelwert	310.000	45.000	1.120.000	37.800	1.515.000
	SEM	58.200	13.900	184.500	5.900	159.000
Tag2 p.i.	Mittelwert	536.800	291.200	956.000	413.100	2.200.000
	SEM	69.469	3.004	1.491	2.284	77.003

Absolute Zellzahlen der Leukozytensubpopulationen in der bronchoalveolären Lavage von unbehandelten Kontrolltieren (n = 6) sowie von Tieren mit *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie an Tag 1 (n = 5) sowie an Tag 2 nach Infektion (n = 5) als Mittelwerte und Standardfehler (SEM). P.i. = *post infectionem*.

4.2 Qualitätskontrolle und Normalisierung der Microarrays

Die Qualitätskontrolle und Normalisierung der *Microarrays* wurde in enger Zusammenarbeit mit Dr. Matthias Kohl am Lehrstuhl für Stochastik der Universität Bayreuth durchgeführt. Die Qualitätskontrolle und Normalisierung der Daten erfolgte jeweils organweise.

4.2.1 Interne Kontrollen

Die internen Qualitätskontrollen der *Microarrays* (probenabhängige und probenunabhängige Kontrollen) wurden mithilfe der Software *Bead Studio* (v.3.23.) nach Herstellerangaben durchgeführt (Illumina Systems and Software 2005. *BeadStudio* Users Guide. Data Analysis Software for Use with Illumina Gene Expression Products. Doc. #11179632 Rev.B.). Hierbei zeigte sich durchweg eine gute bis sehr gute Qualität des Probenmaterials, der Hybridisierung und der Vorverarbeitung.

4.2.2 Externe Kontrollen

4.2.2.1 Anzahl der Beads pro Beadtyp

Zur Kontrolle der Qualität der *Bead Chips* kann die Anzahl der *Beads* pro *Beadtyp* herangezogen werden. Die Qualität ist gewährleistet, wenn pro Replikat mindestens fünf *Beads* vorhanden sind. Die Ergebnisse (Blut ≥ 9 , Leber ≥ 11 , Lunge ≥ 11 , Milz ≥ 8) sprachen für eine gute Qualität der *Bead Chips*, da in jedem Fall mehr als acht *Beads* pro *Beadtyp* vorlagen und auch der Median in allen Fällen deutlich größer als 30 war.

4.2.2.2 Ähnlichkeitsanalyse und Normalisierung

In einem zweiten Schritt wurde die Ähnlichkeit der *BeadArrays* unter Verwendung so genannter Ähnlichkeitsmatrizen (*Similarity Matrices*) betrachtet. Diese Analyse diente dazu, eventuelle *Batch*-Effekte, also Effekte die aufgrund der Probenaufbereitung entstanden sein könnten innerhalb des Experiments aufzudecken. Für die Normalisierung wurden zunächst alle *Bead*typen verwendet und die Expressionwerte (Signalintensitäten) zur Basis 2 logarithmiert. Für die Berechnung der Ähnlichkeit kam die Korrelation, welche mithilfe des *minimum covariance determinant* (MCD) Schätzers berechnet wurde, zum Einsatz. Es handelt sich dabei um einen sehr robusten Schätzer, der somit von einzelnen Ausreißern nicht beeinflusst wird (Rousseeuw und Leroy 2003). Die Daten wurden unter Verwendung der Varianz stabilisierenden Normalisierung nach Huber et al. organweise prozessiert (Huber et al. 2002, Huber et al. 2003).

Die Ähnlichkeitsanalyse der *BeadArrays* zeigte eine robuste Korrelation (Rousseeuw und Leroy 2003) der zur Qualitätskontrolle eingesetzten Universal-RNA mit Werten im Bereich von 0,978 bis 0.994 und deutete auf eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Experimente hin (Tabelle 4). Die Analyse wurde nach Entfernung der Universal-RNAs aus dem Datensatz wiederholt, wobei die *BeadArrays* nun nach den experimentellen Gruppen sortiert wurden. Die Peritonitis zum Zeitpunkt 6h wich erwartungsgemäß jeweils auffällig von den anderen Gruppen ab. Dies spiegelte die deutlichen biologischen Effekte in dieser experimentellen Gruppe wider. Nach der Gruppenanalyse stellte sich zudem jeweils dieselbe Probe als Ausreißer in Leber und Lunge dar. Die eben beschriebene Analyse wurde für alle experimentellen Prozeduren wiederholt. Hierbei wurden die experimentellen Prozeduren (RNA-Isolation, Amplifikation, Hybridisierung) nach Datum sortiert. Bezüglich dieser experimentellen Schritte ließen sich keinerlei *Batch-Effekte*, welche auf systematische Fehler durch die eingesetzten Materialien oder die Probenaufbereitung hindeuten würden, feststellen. Da nach der organweisen Normalisierung der Daten (Huber et al. 2002, Huber et al. 2003) die Ausreißer im Fall von Leber und Lunge weiterhin deutlich von den anderen Proben abwichen, wurden diese entfernt, um eine Verzerrung (*Bias*) bei den statistischen Analysen zu verhindern. Die Normalisierung erhöhte die Homogenität der Daten im Hinblick auf deren Verteilung sowie deren Varianz. Als detektierte *Bead*typen wurden jene identifiziert und folglich für die statistischen Analysen ausgewählt, welche bei mindestens zwei *BeadArrays* einen Detektions p -Wert < 0.01 aufwiesen und somit definitionsgemäß über dem

Hintergrundrauschen lagen (Tabelle 5). Die Ähnlichkeitsanalyse wurde für die normalisierten Daten wiederholt.

Tabelle 4. Korrelation der Universal-RNA der organweisen Hybridisierungen

Korrelation der Universal-RNA der einzelnen Hybridisierungen (organweise)	
Lunge	0,993
Leber	0,994
Milz	0,978
Blut	0,980

Je Hybridisierung wurden die 26 Proben eines Organs zusammen mit jeweils 2 Proben der bereits bei der Amplifikation mitgeführten Universal-RNA eingesetzt. Vor Normalisierung der Daten wurde jeweils die Korrelation der beiden pro Hybridisierung eingesetzten Universal-RNA Proben bestimmt, um systematische Fehler bei der Aufarbeitung der Proben erkennen zu können. Hierbei ergaben sich sehr gute Korrelationen für alle Hybridisierungen.

Tabelle 5. Anzahl der detektierten *Bead*typen pro Organ

Anzahl der detektierten Transkripte/ <i>Bead</i> typen pro Organ	
Lunge	26 387
Leber	22 015
Milz	25 837
Blut	21 791

Nach Normalisierung der Daten wurden die detektierten *Bead*typen (Transkripte) bestimmt. Als detektierte *Bead*typen wurden jene identifiziert und folglich für die statistischen Analysen ausgewählt, welche bei mindestens zwei *BeadArrays* einen Detektions-p-Wert < 0.01 aufwiesen und somit definitionsgemäß über dem Hintergrundrauschen lagen.

4.3 Organ übergreifende Analysen

4.3.1 Dendrogramm aller Organe, Infektionsarten und Infektionszeitpunkte

Beim Vergleich aller Organe und Konditionen (Infektionsart, Infektionszeitpunkt) mittels *average linkage Clustering* unter Verwendung der Pearson's Korrelation als Ähnlichkeitsmaß ergab sich das in Abbildung 3 dargestellte Dendrogramm. Hierbei werden die Expressionsmuster anhand ihrer Ähnlichkeit hierarchisch gruppiert, so dass sich ein „Baum“ ergibt. Die Höhe der „Äste“ bis zur nächsten „Verzweigung“ gibt an, wie fremd oder ähnlich sich die Gruppen sind.

Es konnten prinzipielle Unterschiede der transkriptomischen Signaturen der beiden Infektionsmodelle gefunden werden (dicke rote und blaue Umrandung). Die Lunge nahm hierbei eine Sonderstellung ein (rote und blaue Pfeile). Innerhalb der Infektionsarten ergab sich für die Peritonitis eine überwiegend zeitspezifische Gruppierung über alle Organe. D.h. jeweils die 6h-Zeitpunkte bzw. 24h-Zeitpunkte aller Organe gruppierten sich zusammen (rote Umrandung). Für die Pneumonie ergab sich eine überwiegend organspezifische Gruppierung (blaue Umrandung). Beim Organ Blut überwog bei beiden Infektionsmodellen der Organeffekt den Effekt des Infektionszeitpunktes. Die Lunge zeigte keine infektionsspezifische Gruppierung, sondern wies ein eher robustes Verhalten im Expressionsmuster in beiden Infektionsmodellen auf (rote und blaue Pfeile).

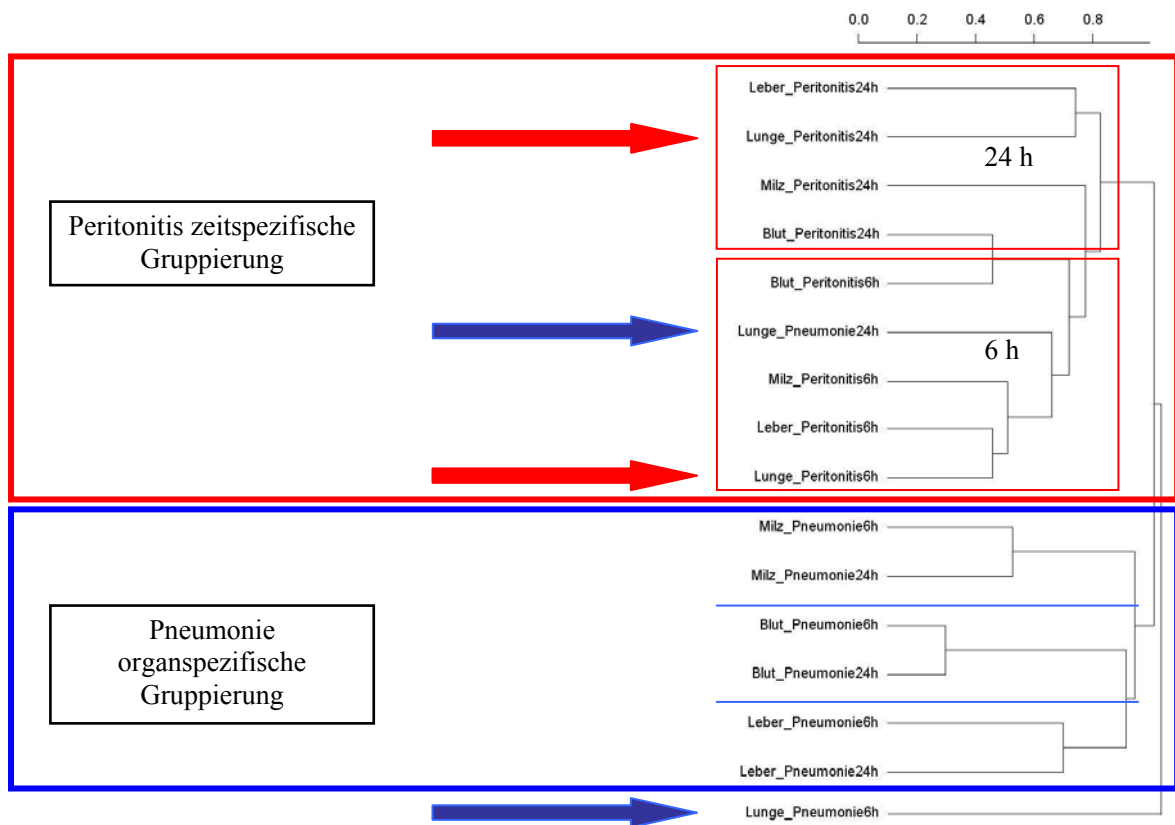


Abbildung 3. Dendrogramm aller Organe, Infektionsarten und Infektionszeitpunkte über Pearson-Korrelation mit *average linkage* geclustert. Die Expressionsmuster aller Organe beider Infektionsarten wurden anhand von Ähnlichkeit über Pearson Korrelation mit *average linkage clustering* gruppiert. Die Benennung der einzelnen Konditionen erfolgte jeweils als „Organ_Infektionsmodell Zeitpunkt der Organentnahme“, z.B. „Lunge_Peritonitis6h“ steht für das Expressionsmuster der Lunge 6h nach Induktion der fäkalen Peritonitis. Je ähnlicher sich die Expressionsmuster der jeweiligen Kondition sind, desto höher ist die Pearsson Korrelation. Diese kann anhand des oberhalb des Dendrogramms angegebenen **Indikators (Skalierung)** berechnet werden. Die Höhe („Height“) des Dendrogrammastes bis zur nächsten Verzweigung gibt an, wie fremd sich die Gruppen sind. Dieser Wert ergibt von 1 subtrahiert die Korrelation der beiden Konditionen. Z.B. beträgt die Korrelation zwischen Blut_Pneumonie6h und Blut_Pneumonie24h : $1 - 0.3 = 0.7$; die Korrelation zwischen Lunge_Pneumonie6h und allen anderen Konditionen beträgt ca. $1 - 0.9 = 0.1$. Insgesamt gruppierten sich die einzelnen Konditionen infektionsspezifisch (**dicke rote und blaue Umrandungen**). Innerhalb der **blauen Umrandung** (*S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie) ergibt sich eine organspezifische Gruppierung der jeweiligen 6h- und 24h-Zeitpunkte der Organe Leber, Milz und Blut. Die einzelnen Organe sind hierbei durch die **waagrechten blauen Linien** zur besseren Veranschaulichung getrennt. Die **dicke rote Umrandung** markiert die zeitspezifische Gruppierung der Organe Lunge, Leber, Milz und des Blutes bei der fäkalen Peritonitis. Hierbei sind die jeweiligen 6h- und 24h-Zeitpunkte zusammen gruppiert, was durch die **dünnen roten Markierungen** veranschaulicht wird. Die roten und blauen Pfeile verdeutlichen die Sonderstellung der Lunge im Vergleich zu Leber, Milz und Blut. Im Infektionsmodell der fäkalen Peritonitis zeigt die Lunge ein den anderen Organen vergleichbares Verhalten (**rote Pfeile**), im Infektionsmodell der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie zeigte sie ein deutlich verschiedenes Expressionsmuster als die anderen Organe in diesem Modell (**blaue Pfeile**).

4.3.2 Die molekulare Signatur aller Organe und Konditionen anhand der GEDI-Merkmalsskizzen

Aufgrund der Komplexität der Analyse soll im Folgenden zunächst noch einmal die Charakteristik der verwendeten Software sowie der Datenaufarbeitung erklärt werden. Ebenso wie bei unter 4.3.1 dargestelltem Dendrogramm wurden die detektierten Gene ohne weitere statistische Filterung mithilfe der Software *Gene Expression Dynamics Inspector* (GEDI) v2.1 dargestellt. Die Expressionsveränderungen wurden bezogen auf die modellspezifische Shamgruppe ermittelt und als logarithmierte Veränderungen der Signalintensität zur Basis zwei (\log_2FC) dargestellt. Nach Ermittlung der Mediane der logarithmierten Signale (\log_2FC) biologischer Replikate pro Gen bzw. Probe-ID wurden diese in die Software eingelesen. Hierbei wurden die Werte für alle Organe und alle Konditionen (Infektionsart und Zeitpunkt) gleichzeitig eingelesen und hierdurch die SOM (selbst organisierende Karte, *self organizing map*) trainiert. Hierbei geschieht ein so genanntes „unüberwachtes Lernen“. Koexprimierte Gene werden über zweidimensional arrangierte Minicluster abgebildet, wobei mehrere koexprimierte Gene innerhalb eines Miniclusters zusammengefasst werden. Auch benachbarte Minicluster verfügen über Ähnlichkeiten im Expressionsverhalten. Insgesamt ist die Anordnung der Minicluster und somit auch der darin enthaltenen Gene innerhalb der Mosaikkarte immer gleich. So können die Karten für die einzelnen Konditionen jeweils direkt optisch miteinander verglichen werden. Über die Software können zudem einzelne Cluster angeklickt werden und die darin enthaltenen Gene angezeigt werden. Die Farbcodierung der Karte ist in Abbildung 4 dargestellt. Sie vergibt für positive Expressionsveränderungen (\log_2FC) bezogen auf die Shamgruppe rote Farbgraduierungen und für negative Expressionsveränderungen (\log_2FC) bezogen auf die Shamgruppe blaue Farbgraduierungen.

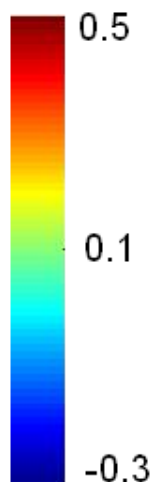


Abbildung 4. Farbskalierung der GEDI-Merkmalkarten.

Die dargestellte Farbskalierung gilt für die in Abbildung 5 bis 8 folgenden GEDI-Merkmalkarten der einzelnen Organe. Die Skalierung ist in logarithmierten Veränderungen der Signalintensität zur Basis zwei (\log_2FC) bezogen auf die zugehörige Shamgruppe angegeben. Hierbei entspricht ein \log_2FC von 0.5 beispielsweise einer 1.4fach gesteigerten Signalintensität im Vergleich zur Shamgruppe. Eine rote Farbgraduierung entspricht einer gesteigerten Genexpression im Vergleich zur Shamgruppe, eine blaue Farbgraduierung entspricht einer verminderten Genexpression im Vergleich zur Shamgruppe. Da die Werte aller detektierten Gene ohne statistische Filterung über eine minimal geforderte Expressionsveränderung (Fold Change Kriterium) und/oder ein Signifikanzniveau (p-Wert) in die Software eingelesen wurden, sind die Enden der Skala mit Werten von 0.5 und -0.3 nicht den tatsächlichen Maximalwerten gleichzusetzen. Bei einer Gesamtzahl von, je nach Organ 20.000 bis 26.000 detektierten Genen befindet sich jedoch die Mehrzahl der detektierten Gene in diesem Bereich. Höhere Expressionsveränderungen sind in tiefroten und tiefblauen Farben dargestellt.

In der hier durchgeführten Analyse wurde bewusst auf eine statistische Filterung der detektierten Gene über eine minimal geforderte Expressionsveränderung (Fold Change Kriterium) und/oder ein Signifikanzniveau (p-Wert) verzichtet. Entsprechend werden keine differentiell exprimierten Gene im engeren Sinne, sondern die globalen Expressionsveränderungen der untersuchten Organe im Sinne einer „holistischen“ Betrachtungsweise dargestellt. Durch diese Analyse mit „niedriger Auflösung“ kann eine bessere Einbettung einzelner Veränderungen auf Genexpressionsebene in die molekularen Zusammenhänge auf der Ebene der gesamten Zelle untersuchter Organe erfolgen. Durch Betrachtung mehrerer Organe können Rückschlüsse auf die Folgen der Veränderungen auf Einzelorganebene auf den ganzen Organismus angestrebt werden. Dies soll insbesondere durch Generierung entsprechender Hypothesen geschehen.

4.3.2.1 Die molekulare Signatur des Blutes

Abbildung 5 zeigt die molekulare Signatur des Blutes. Es ergaben sich deutliche Unterschiede in der molekularen Signatur für die beiden Infektionsmodelle Peritonitis und Pneumonie, wobei sich innerhalb der jeweiligen Infektionsmodelle die Signatur zu frühem und spätem Zeitpunkt sehr ähnelte.

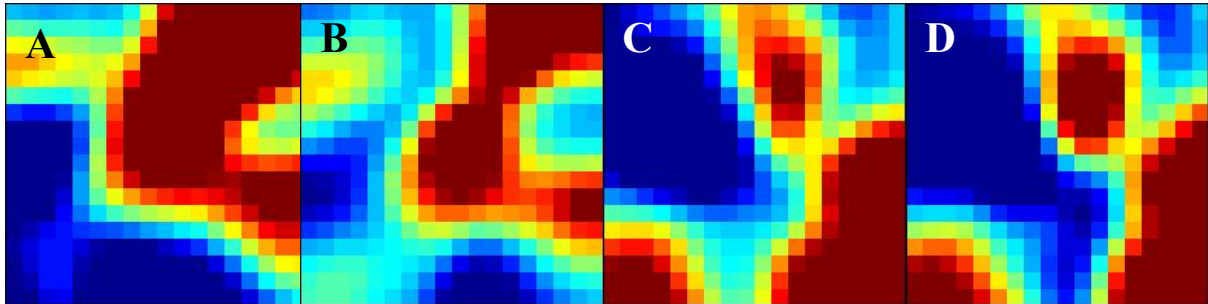


Abbildung 5A-D. Die molekulare Signatur des Blutes als GEDI-Merkmalsskizze. GEDI-Merkmalsskizzen für Blut 6h (A) und 24h (B) nach Induktion einer fäkalen Peritonitis sowie 6h (C) und 24h (D) nach Induktion einer Pneumonie mit *S. pneumoniae*. Mithilfe der Merkmalskarten sind die Koexpressionsmuster der jeweiligen Kondition (Infektionsart und Zeitpunkt) dargestellt. Ein Bildpunkt (Minicluster) der Mosaikkarte enthält in den Abbildungen 5 bis 8 (A-D) jeweils identische Gene. Ein direkter visueller Vergleich der Karten ist somit möglich. Die Farbskalierung ist in Abbildung 4 aufgeführt.

4.3.2.2 Die molekulare Signatur der Milz

Abbildung 6 zeigt die molekulare Signatur der Milz. Das lymphatische Organ Milz zeigt deutliche Reaktionen der Genexpression im Modell der Peritonitis, wobei zum 6h-Zeitpunkt die bezüglich einer positiven Genexpressionsveränderung stärkste Reaktion hervorgerufen wird, welche für einige Gene bis zum 24h-Zeitpunkt anhält. Im Modell der Pneumonie fällt die Reaktion im Transkriptom eher moderat und verzögert aus. Die bei Pneumonie zum späten Zeitpunkt hochregulierten Gene scheinen größtenteils eine Teilmenge der bei Peritonitis zum Zeitpunkt 6h hochregulierten Gene darzustellen.

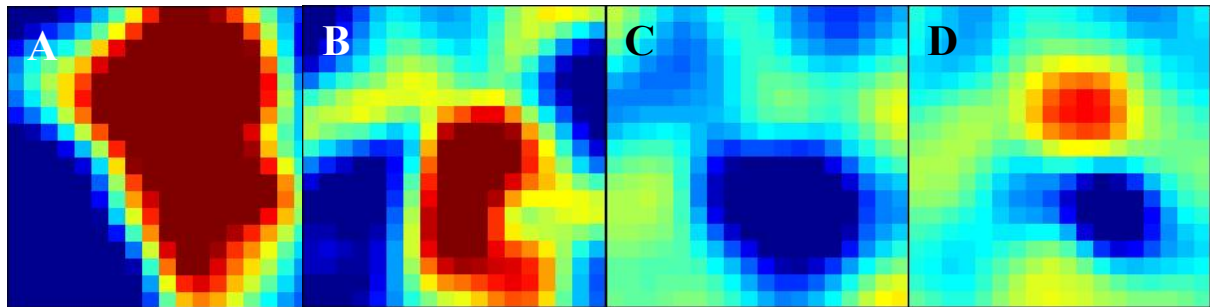


Abbildung 6A-D. Die molekulare Signatur der Milz als GEDI-Merkmalkarte. GEDI-Merkmalkarten für das Organ Milz 6h (A) und 24h (B) nach Induktion einer fäkalen Peritonitis sowie 6h (C) und 24h (D) nach Induktion einer Pneumonie mit *S. pneumoniae*. Mithilfe der Merkmalkarten sind die Koexpressionsmuster der jeweiligen Kondition (Infektionsart und Zeitpunkt) dargestellt. Ein Bildpunkt (Minicluster) der Mosaikkarte enthält in den Abbildungen 5 bis 8 (A-D) jeweils identische Gene. Ein direkter visueller Vergleich der Karten ist somit möglich. Die Farbskalierung ist in Abbildung 4 aufgeführt.

4.3.2.3 Die molekulare Signatur der Leber

Abbildung 7 zeigt die molekulare Signatur der Leber. Es ergaben sich deutliche Unterschiede für beide Infektionsmodelle. Bezüglich einer positiven Expressionsveränderung erscheinen der 6h-Zeitpunkt für die Peritonitis sowie der 24h Zeitpunkt für die Pneumonie prominent. Neben deutlichen Unterschieden erscheinen auch hier überlappende Regionen bezüglich der Genexpression in beiden Infektionsmodellen.

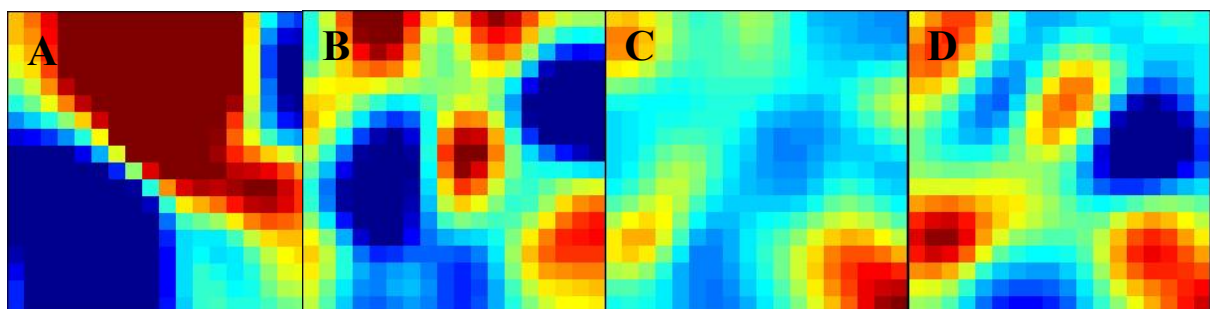


Abbildung 7A-D. Die molekulare Signatur der Leber als GEDI-Merkmalkarte. GEDI-Merkmalkarten für das Organ Leber 6h (A) und 24h (B) nach Induktion einer fäkalen Peritonitis sowie 6h (C) und 24h (D) nach Induktion einer Pneumonie mit *S. pneumoniae*. Mithilfe der Merkmalkarten sind die Koexpressionsmuster der jeweiligen Kondition (Infektionsart und Zeitpunkt) dargestellt. Ein Bildpunkt (Minicluster) der Mosaikkarte enthält in den Abbildungen 5 bis 8 (A-D) jeweils identische Gene. Ein direkter visueller Vergleich der Karten ist somit möglich. Die Farbskalierung ist in Abbildung 4 aufgeführt.

4.3.2.4 Die molekulare Signatur der Lunge

Abbildung 8 zeigt die molekulare Signatur der Lunge. Sie weist eine starke positive Expressionsveränderung bei der Peritonitis zum 6h-Zeitpunkt auf, welche für einige Gene bis zum 24h-Zeitpunkt anhält. Eine vermehrte positive Genexpression bei Pneumonie wird verzögert erst zum 24h-Zeitpunkt deutlich und imponiert im Wesentlichen als Teilmenge der induzierten Gene bei Peritonitis.

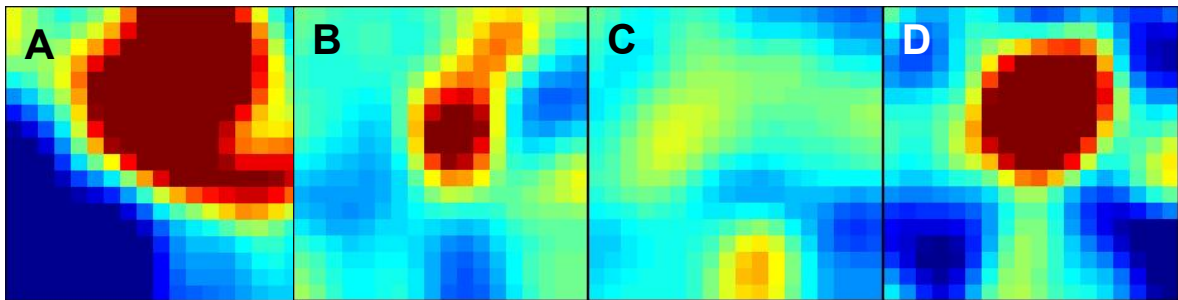


Abbildung 8A-D. Die molekulare Signatur der Lunge als GEDI-Merkmalsskizze. GEDI-Merkmalsskizzen für das Organ Lunge 6h (A) und 24h (B) nach Induktion einer fäkalen Peritonitis sowie 6h (C) und 24h (D) nach Induktion einer Pneumonie mit *S. pneumoniae*. Mithilfe der Merkmalskizzen sind die Koexpressionsmuster der jeweiligen Kondition (Infektionsart und Zeitpunkt) dargestellt. Ein Bildpunkt (Minicluster) der Mosaikkarte enthält in den Abbildungen 5 bis 8 (A-D) jeweils identische Gene. Ein direkter visueller Vergleich der Karten ist somit möglich. Die Farbskalierung ist in Abbildung 4 aufgeführt.

4.3.3 Signifikant koexprimierte Signal- und Stoffwechselwege

Im folgenden Abschnitt soll die Darstellung der signifikant koexprimierten Signal- und Stoffwechselwege in beiden Infektionsmodellen über alle Organe (Milz, Leber, Lunge und Blut) erfolgen. Aufgrund der Komplexität der Analyse soll nochmals eine kurze Erklärung des statistischen Vorgehens gegeben werden. Auf der Grundlage der GEDI-Merkmalsskizzen wurde eine *Gene Set Enrichment Analyse* (GSEA) durchgeführt. Hierbei wurde der Datensatz auf signifikant koexprimierte Gene/Transkripte, welche für Elemente bekannter Signal- und Stoffwechselwege kodieren untersucht. Wissensgrundlage stellte hierbei die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) dar. Nach hypergeometrischem Test und p-Wert Korrektur nach *Holm* konnten die in Tabelle 6 aufgeführten KEGG-Kategorien als signifikant koexprimiert ($p < 0.05$) identifiziert werden.

Die beschriebene Analyse identifiziert die signifikant koexprimierten Stoffwechsel- und Signalwege unabhängig davon, in welche Richtung die Koexpression erfolgt. Es wird also keine Aussage darüber getroffen, ob die dargestellten Kategorien oder die gefundenen

Elemente (Gene/Transkripte) in der jeweiligen Kondition vermehrt oder vermindert exprimiert werden. Eine derartige Darstellung gibt somit generellen Aufschluss über diejenigen Signal- und Stoffwechselwege, welche wesentlich an der Pathogenese der Sepsis und systemischen Entzündungsreaktion beteiligt sind unabhängig von Infektionsfokus, Infektionsart und Organ.

Tabelle 6. Signifikant koexprimierte Signal- und Stoffwechselwege über alle Konditionen und alle Organe auf Grundlage der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)

Name (KEGG-Kategorie)	Elemente per Definition	Detektierte Elemente	Adjustierter p-Wert (Holm-Korrektur)
Komplement- und Gerinnungskaskade	73	15	$1,91 \times 10^{-9}$
Ribosom	92	12	$2,48 \times 10^{-7}$
Proteasom	31	8	$1,13 \times 10^{-5}$
Zellzyklus	119	11	$1,36 \times 10^{-4}$
DNA-Replikation	36	8	$2,92 \times 10^{-4}$
Oxidative Phosphorylierung	130	14	$1,37 \times 10^{-2}$
Regulation des Aktinzytoskeletts	207	11	$1,83 \times 10^{-2}$
Biosynthese der Steroide	23	6	$3,84 \times 10^{-2}$

In der ersten Spalte der Tabelle ist der Name der signifikant koexprimierten KEGG-Kategorie notiert, in der zweiten Spalte die Anzahl der darin per Definition enthaltenen Elemente (Proteine, Enzyme bzw. dafür kodierende Gene) des Signal- oder Stoffwechselweges. In der dritten Spalte ist die Anzahl, der im untersuchten Datensatz als innerhalb eines 2x2 Clusters (2x2 Minicluster) koexprimiert identifizierten Elemente der Kategorie angegeben. Die letzte Spalte zeigt den adjustierten p-Wert für die jeweilige Kategorie nach statistischer Analyse (hypergeometrischer Test) und *Holm* Korrektur ($p\text{-Wert} \leq 0.05$). Der Wert besagt, mit welcher Wahrscheinlichkeit die gefundenen Elemente der jeweiligen Kategorie per Zufall in dem untersuchten 2x2 Cluster koexprimiert gefunden werden könnten.

4.3.4 KEGG-Kategorie der Steroidbiosynthese

Im Folgenden soll beispielhaft für die Kategorie der Steroidbiosynthese die Abbildung der als koexprimiert identifizierten Elemente der Kategorie auf der GEDI-Merkmalkarte erfolgen. Hierzu wurde die GEDI-Merkmalkarte für das Organ Leber bei *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie zum Zeitpunkt 24h ausgewählt, da sich hierfür eine spezifische Hochregulation dieser Kategorie zeigte. Diese ist in Abbildung 9 dargestellt. Für die anderen Konditionen (Infektionsarten und Zeitpunkte) im Organ Leber zeigte sich ebenso wie für alle Konditionen der restlichen untersuchten Organe keine Hochregulation dieser

Kategorie. Auf die Darstellung der übrigen Abbildungen zur Kategorie der Steroidbiosynthese sowie weiterer Kategorien aus Tabelle 6 soll verzichtet werden.

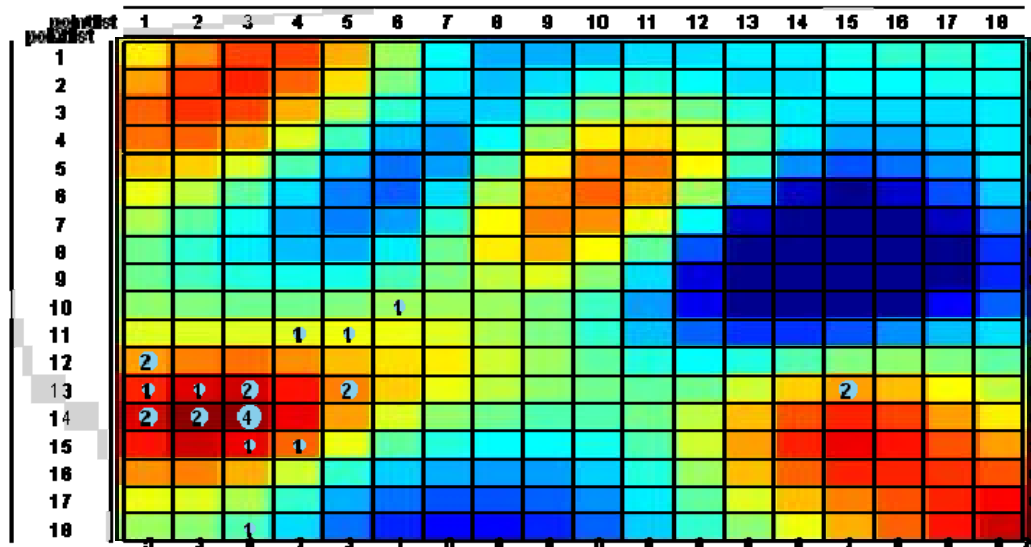


Abbildung 9. GEDI-Merkmalkarte der Leber 24h nach Induktion einer Pneumonie mit *S. pneumoniae* mit Markierung der signifikant koexprimierten Elemente der KEGG-Kategorie der Steroidbiosynthese bezogen auf die jeweiligen Minicluster. Auf Grundlage der GEDI-Merkmalkarten wurde unter 3.5.1.4. beschriebene GSEA durchgeführt. Anhand dieser Analyse konnten Gitterschablonen (*balloon plots*) passend zur Aufteilung der GEDI-Merkmalkarten in einzelne Minicluster generiert werden. Innerhalb dieser Gitterschablone ist jeweils aufgeführt, wie viele Elemente der untersuchten Kategorie innerhalb eines Miniclusters zu finden sind. Verschiedene Probe-IDs für dasselbe Gen (z.B. bei Vorliegen von Splicingvarianten oder technischen Replikaten im Allgemeinen) sind einzeln aufgeführt, so dass für 1 Gen mehrere *Bead*typen vorliegen können. Die Mosaikkarte ist in Form eines so genannten 18 x 18 *Grids* generiert. Das bedeutet, dass innerhalb der zweidimensionalen Anordnung der Karte jeweils 18 Unterteilungen der X und Y Achse erfolgen und somit 18 x 18 Minicluster entstehen. Dies entspricht auch der ursprünglichen Anordnung der per SOM durch die Software GEDI generierten Mosaikkarte. Die Abbildung zeigt dieses Vorgehen exemplarisch anhand der Kondition Pneumonie zum 24h-Zeitpunkt im Organ Leber und veranschaulicht die pneumoniespezifische Hochregulation der Kategorie der Steroidbiosynthese im Organ Leber.

Eine detaillierte Darstellung der KEGG-Kategorie der Steroidbiosynthese findet sich unter (http://www.genome.jp/dbgetbin/get_pathway?org_name=mmu&mapno=00100). Auf die Darstellung der anderen signifikant koexprimierten Kategorien wurde im Rahmen der vorgelegten Arbeit verzichtet, da diese nicht detailliert besprochen werden. Weitere Informationen zu den Kategorien sind ebenfalls unter <http://www.genome.jp/kegg/> zu finden.

4.3.4.1 Heatmap der im Datensatz detektierten Enzyme der Cholesterolsynthese und vorgeschaltete Transkriptionsfaktoren im Organ Leber

Um die Regulation der Enzyme und Transkriptionsfaktoren aus der Kategorie der Steroidbiosynthese und hier im Besonderen der Cholesterolsynthese im Organ Leber zu veranschaulichen, wurde in Abbildung 10 dargestellte *Heatmap* angefertigt. Hierbei wurden die Infektionsmodelle der fäkalen Peritonitis sowie der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie gegenübergestellt. Die Expressionsveränderungen (\log_2FC) wurden bezogen auf die modellspezifische Shamgruppe anhand der Mediane logarithmierter Signale biologischer Replikate ermittelt. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Hochregulation (rote Farbkodierung) der meisten aufgeführten Gene für die Kondition Pneumonie 24h stattfand, wohingegen für die Peritonitis 6h eher eine Herabregulation (blaue Farbkodierung) bzw. keine wesentliche Expressionsänderung (rosa Farbkodierung) zu erkennen ist. Eine Koexpression von Genen deutet immer auch auf eine mögliche Koregulation durch vorgeschaltete Transkriptionsfaktoren hin. Anhand der dargestellten *Heatmap* ist deutlich zu erkennen, dass im vorliegenden Datensatz die Transkriptionsfaktoren *sterol regulatory element binding factor* (Sreb) 1 und 2 bei der Pneumonie in der Leber auf Transkriptomebene ebenfalls hochreguliert erscheinen.

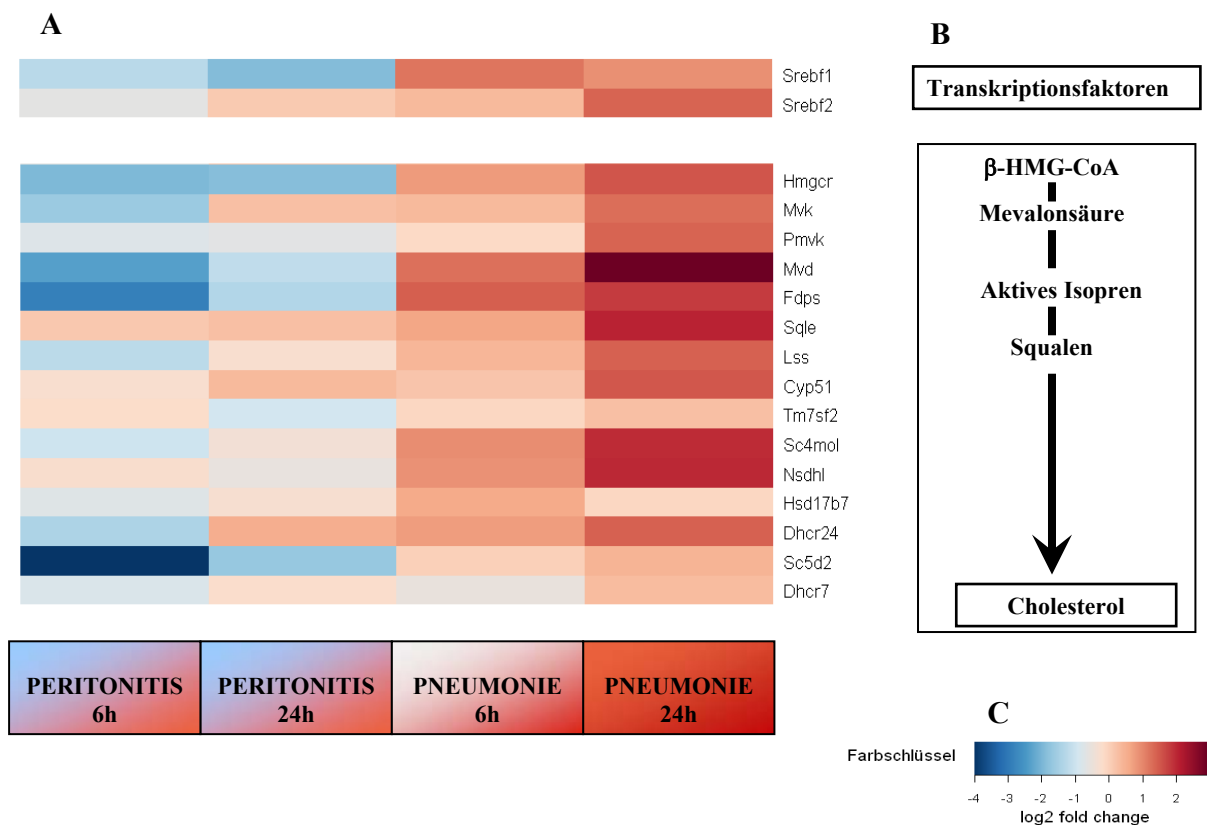


Abbildung 10. Heatmap der wesentlichen Gene für Enzyme und Transkriptionsfaktoren der Cholesterolsynthese im Organ Leber bei polymikrobieller Peritonitis sowie *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie. A) Heatmap für die im Datensatz detektierten Gene der Steroidbiosynthese, welche im Wesentlichen Genen der Cholesterolsynthese entsprechen. In der Heatmap entspricht jede Zeile einem Gen, dessen Bezeichnung am rechten Rand der Heatmap vermerkt ist. Die genauen Gen-Namen können im Genbezeichnungsverzeichnis der Arbeit nachgeschlagen werden. Jede Spalte der Heatmap entspricht einer Kondition (Infektionsart und Zeitpunkt), welche unterhalb der Heatmap bezeichnet ist. B) skizzenhafte Darstellung der Cholesterolsynthese auf Molekülniveau. Hierbei erfolgte eine Beschränkung auf wesentliche Zwischenprodukte ausgehend von β -HMG-CoA (Beta-Hydroxy-Methyl-Glutaryl-Coenzym A), welches im geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der Cholesterolsynthese vom Enzym Hmgcr (β -HMG-CoA-Reduktase) umgesetzt wird. Die weitere Darstellung der Zwischenprodukte der Cholesterolsynthese im rechten Teil der Abbildung erfolgt jeweils ungefähr auf der Höhe der entsprechenden enzymatischen Reaktionen, welche durch die Gensymbole der Heatmap dargestellt werden. Die Transkriptionsfaktoren Srebf (*sterol regulatory element binding factor*) 1 und 2 sind der enzymatischen Kaskade vorangestellt. C) Farbschlüssel der Heatmap. Die Skalierung erfolgt anhand logarithmierter Veränderungen der Signalintensität zur Basis zwei (\log_2FC). Die Expressionsveränderungen wurden jeweils zur modellspezifischen Shamgruppe ermittelt. Positive Expressionsveränderungen werden entsprechend als rote Farbgraduierungen und negative Expressionsveränderungen als blaue Farbgraduierungen dargestellt.

4.4 Einzelorgananalyse: Transkriptom der Lunge als Ausgangs- und Zielorgan der Sepsis im Vergleich zur Leber

Die Darstellungen zur Einzelorgananalyse erfolgten mit Hilfe von Venn Diagrammen (Abbildung 11). Zur Erstellung der Venn Diagramme wurden jeweils je Organ die Mittelwerte der logarithmierten Expressionsveränderungen zur Basis 2 (\log_2FC) der biologischen Replikate je Transkript verwendet. Im Gegensatz zu den Analysen mittels GEDI (Abschnitt 4.3.2) und der hierarchischen Clusteranalyse (Abschnitt 4.3.1) erfolgte eine Filterung der detektierten Gene über ein \log_2FC -Kriterium ($|\log_2FC| \geq 1$). Das bedeutet, dass nur diejenigen Gene/Transkripte in die weitere Darstellung mittels Venn Diagramm eingingen, welche eine mindestens zweifache Expressionsveränderung bezogen auf die modellspezifische Shamgruppe aufwiesen. Hierüber konnte der Datensatz auf ein überschaubares Maß eingegrenzt werden, ohne jedoch stringente statistische Analysen anwenden zu müssen, was die „Auflösung“ der Analyse zu stark erhöhen würde. Im Sinne der initialen Fragestellung soll eine „holistische“ Darstellung der Genexpressionsveränderung mit „niedriger Auflösung“ erfolgen, um globale pathophysiologische Zusammenhänge bei Sepsis auf molekularer Ebene darstellen zu können. Die Analyse und Filterung der Daten ($|\log_2FC| \geq 1$) sowie die Erstellung der Venn Diagramme erfolgte mittels der *Software R* und deren Erweiterung *Bioconductor* (Abschnitt 3.5.).

4.4.1 Zuordnung der Schnittmengen und Mengen im Venn Diagramm

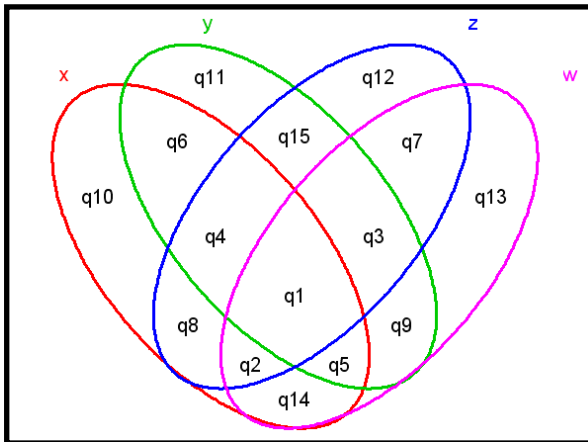


Abbildung 11. Venn Diagramm der Schnittmengen und Mengen mit Zuordnungen. Mithilfe von Venn Diagrammen können Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu vergleichender Datensätze in Form von Mengen und Schnittmengen dargestellt werden. Die übergeordneten Mengen der Konditionen werden als x , y , z und w bezeichnet. Durch Vergleich dieser übergeordneten Mengen entstehen überlappende Teilmengen (Schnittmengen) und nicht überlappende Teilmengen. Die Teilmengen werden mit **q1 bis q15** bezeichnet. Die Zuordnung der soeben genannten Bezeichnungen gilt für die Abbildungen 12 und 13 sowie die Abbildungen 15 bis 18 im Datenanhang der Arbeit.

4.4.2 Venn Diagramme der Lunge

4.4.2.1 Gene mit mehr als zweifacher Regulation bezogen auf die jeweilige Shamgruppe ($|\log_2FC| \geq 1$)

In der Lunge waren für beide Infektionsmodelle insgesamt 1461 Gene mehr als zweifach hochreguliert ($\log_2FC \geq 1$) sowie 974 Gene mehr als zweifach herabreguliert ($\log_2FC \leq -1$) bezogen auf die zugehörige Shamgruppe. Insbesondere 6h nach Induktion der Peritonitis zeigten sich starke Änderungen der Genexpression im Lungenparenchym (1103 Gene hochreguliert und 594 Gene herabreguliert), während nach 24h lediglich 258 Gene induziert sowie 100 Gene herabreguliert waren. Für die Pneumonie stellte sich der 24h-Zeitpunkt als der prominente Zeitpunkt dar. Hier waren 708 Gene induziert sowie 384 Gene herabreguliert. Zum 6h-Zeitpunkt waren 32 Gene induziert und 72 Gene herabreguliert. Insgesamt 412 Gene zeigten sich sowohl für Peritonitis nach 6h als auch für Pneumonie nach 24h induziert. Für die Pneumonie zeigten sich 268 Gene ohne Schnittmengenbildung mit der Kondition Peritonitis nach 24h induziert. Für die Peritonitis waren 681 Gene ohne Schnittmengenbildung mit der Kondition Pneumonie nach 6h induziert.

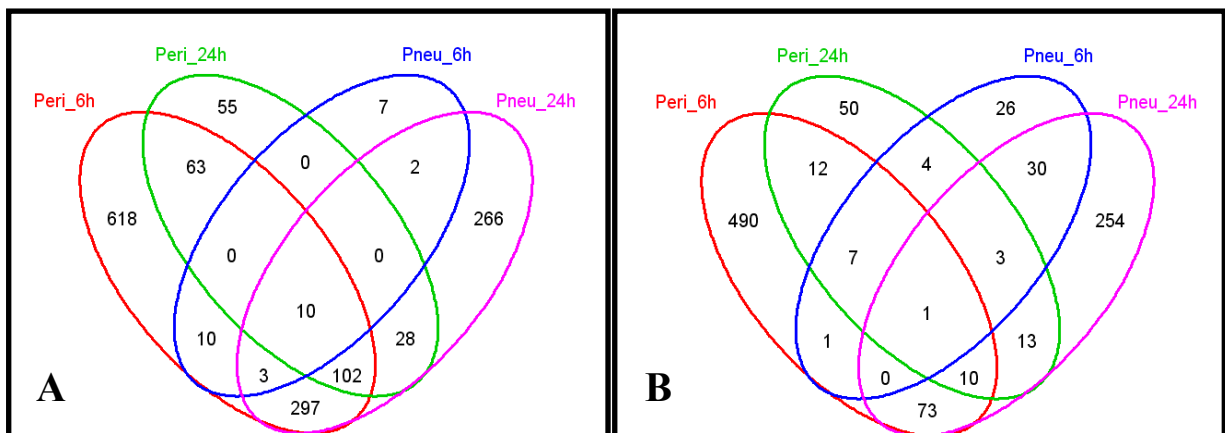


Abbildung 12. Venn Diagramme der Lunge. **A)** Venn Diagramm der mehr als zweifach hochregulierten Gene bezogen auf die zugehörige Shamgruppe. **B)** Venn Diagramm der mehr als zweifach herabregulierten Gene bezogen auf die jeweilige Shamgruppe. Peri_6h = Genexpression 6h nach Induktion der fäkalen Peritonitis (**rot**), Pneu_6h = Genexpression 6h nach intra-trachealer Instillation von *S. pneumoniae* Serotyp 2 (D39) (**blau**); Analoges gilt für die jeweiligen 24h Zeitpunkte: Peri_24h (**grün**) und Pneu_24h (**lila**). Menge der definitionsgemäß hochregulierten Gene **A)**: Alle Konditionen = 1461, Peri_6h = 1103, Peri_24h = 258, Pneu_6h = 32, Pneu_24h = 708; Menge der definitionsgemäß herabregulierten Gene **B)**: Alle Konditionen = 974, Peri_6h = 594, Peri_24h = 100, Pneu_6h = 72, Pneu_24h = 384.

4.4.2.2 Schnittmenge beider Infektionsmodelle für die hochregulierten Gene (*q1, q2, q5, q14*)

In der Schnittmenge der hochregulierten Gene beider Infektionsmodelle (Abbildung 12 A) fanden sich beispielsweise Vertreter der Chemokine (Cxcl1, Cxcl2, Cxcl9, Cxcl10, Cxcl13, Cxcl14, Ccl2, Ccl3, Ccl4, Ccl5, Ccl7, Ccl19), Chemokinrezeptoren (Ccr5, Ccr12, Il8rb), pro-inflammatorische Zytokine (Il1b, Ifng, Tnf), Zytokinrezeptoren und anti-inflammatorische Zytokine (Il1rn, Tgfbi, Il1r2, Il10ra), costimulatorische Moleküle (Cd40, Cd86), Lymphozytenaktivierungsmarker (Cd69), Akut-Phase Proteine (Saa1, Saa3, Ptx3, Hpx), Adhäsionsmoleküle (Selp), Elemente des TLR-Signalweges (Tlr2, Tlr6, Tlr7, Tlr13, Myd88), Interferon stimulierte Gene (Ifi205, Ifi47, Ifi204, Ifit2, Ifit3, Irf1, Irf9, Irf7), Bestandteile der NF-kB-Signalkaskade (Nfkbie, Nfkbib, Ikbke), negative Regulatoren der Immunantwort (Socs3), Gerinnungsfaktoren (F10, F13a1) sowie das bei der Abwehr viraler Infektionen aktive Viperin (Rsad1).

4.4.3 Venn Diagramme der Leber

4.4.3.1 Gene mit mehr als zweifacher Regulation bezogen auf die jeweilige Shamgruppe ($|\log_2FC| \geq 1$)

In der Leber waren für beide Infektionsmodelle insgesamt 2337 Gene mehr als zweifach hochreguliert ($\log_2FC \geq 1$) sowie 2294 Gene mehr als zweifach herabreguliert ($\log_2FC \leq -1$) bezogen auf die zugehörige Shamgruppe. Insbesondere 6h nach Peritonitisinduktion zeigten sich starke Änderungen der Genexpression im Leberparenchym (1576 Gene induziert und 1729 Gene herabreguliert), während nach 24h lediglich 607 Gene induziert, sowie 682 Gene herabreguliert waren. Für die Pneumonie stellte sich der 24h-Zeitpunkt als der prominente Zeitpunkt dar. Hier waren 414 Gene induziert sowie 217 Gene herabreguliert. Zum 6h-Zeitpunkt waren 274 Gene hochreguliert und 26 Gene herabreguliert. Insgesamt 119 Gene zeigten sich sowohl für die Peritonitis nach 6h als auch für die Pneumonie 24h induziert. Für die Pneumonie zeigten sich 250 Gene ohne Schnittmengenbildung mit der Kondition Peritonitis nach 24h induziert. Für die Peritonitis waren 1430 Gene ohne Schnittmengenbildung mit der Kondition Pneumonie nach 6h induziert.

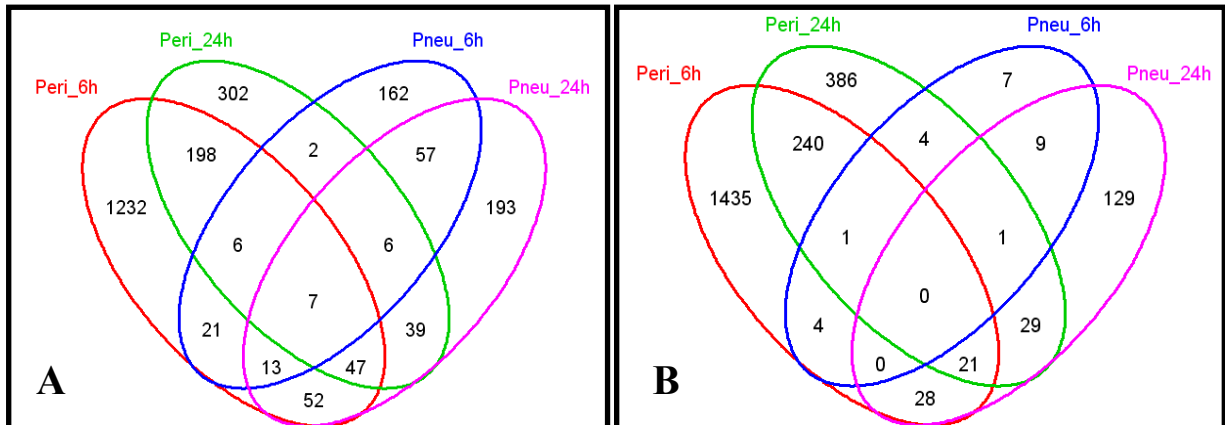


Abbildung 13. Venn Diagramme der Leber. A) Venn Diagramm der mehr als zweifach hochregulierten Gene bezogen auf die zugehörige Shamgruppe. B) Venn Diagramm der mehr als zweifach herabregulierten Gene bezogen auf die jeweilige Shamgruppe. Peri_6h = Genexpression 6h nach Induktion der fäkalen Peritonitis (**rot**), Pneu_6h = Genexpression 6h nach intra-trachealer Instillation von *S. pneumoniae* Serotyp 2 (D39) (**blau**); Analoges gilt für die jeweiligen 24h-Zeitpunkte: Peri_24h (**grün**) und Pneu_24h (**lila**). Menge der definitionsgemäß hochregulierten Gene **A**): Alle Konditionen = 2337, Peri_6h = 1576, Peri_24h = 607, Pneu_6h = 274, Pneu_24h = 414; Menge der definitionsgemäß herabregulierten Gene **B**): Alle Konditionen = 2294, Peri_6h = 1729, Peri_24h = 682, Pneu_6h = 26, Pneu_24h = 217.

4.4.3.2 Schnittmenge beider Infektionsmodelle für die hochregulierten Gene (q1, q2, q5, q14)

In der Schnittmenge der hochregulierten Gene beider Infektionsmodelle (Abbildung 13 A) fanden sich beispielsweise Vertreter der Chemokine (Cxcl1, Ccl2, Ccl7), Akut-Phase Proteine (Saa1, Saa2, Saa3), Adhäsionsmoleküle (Icam1), Elemente des TLR-Signalweges (Tlr2, Lbp), Interferonstimulierte Gene (Ifit3, Irf7), Bestandteile der NFkB-Signalkaskade (Nfkbiz), negative Regulatoren der Immunantwort (Socs3), Apoptosemarker (Fas, Tnfrsf1a), Bestandteile des Cytoskeletts (Actb) sowie Hypoxie induzierte Gene (Hif1a).

4.4.3.3 Hochregulation der Gene der Sterolbiosynthese in der Pneumonie (q13, q7)

Die wesentlichen Enzyme der Cholesterolbiosynthese finden sich ausschließlich für die Kondition Pneumonie in der Leber reguliert. In q13 der Abbildung 13 A (Zuordnung (Abbildung 11) befinden sich: Srebf2 (der regulierende Transkriptionsfaktor der Cholesterolbiosynthese), Hmgcr, Pmvk, Lss, Cyp51, Nsdhl, Dhcr24. In q7 liegen Mvd und Fdps.

4.4.4 Gene Set Enrichment Analyse der Schnittmengen

Um genauere Analysen einer qualitativ identischen Genregulation in einem Organ für beide Infektionsmodelle zu erhalten, wurden die Schnittmengen der Venn Diagramme (q1, q2, q5, q14, siehe Abbildung 11) von Leber und von Lunge mithilfe des „*DAVID bioinformatics resources tools*“ wie unter 3.5.2.2 beschrieben untersucht. Hierbei werden die unter (http://david.abcc.ncifcrf.gov/helps/knowledgebase/DAVID_coverage.jpg) aufgeführten Datenbanken von DAVID als Wissensgrundlage für die Überprüfung einer signifikanten Anreicherung von Komponenten bestimmter Stoffwechsel- und Signalwege überprüft (Huang da et al. 2009). Bei der hier gewählten Darstellung wurde eine Beschränkung auf die 9 funktionellen Gruppen mit den niedrigsten adjustierten p-Werten vorgenommen.

4.4.4.1 Lunge

In der Lunge zeigten sich insbesondere funktionelle Gruppen betreffend die Entzündungsreaktion (1), die Chemokinaktivität (2), Chemotaxis (3) und Zytokinaktivität (4) als hoch signifikant angereichert. Die einzelnen Kategorien sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7. GSEA der Genexpression aus den Schnittmengen der hochregulierten Gene (q1, q2, q5, q14) beider Infektionsmodelle für das Venn Diagramm der Lunge.

Funktionelle Gruppe	Kategorie	Name	Gefundene Elemente	Fold Enrichment	p-Wert Bonferoni
1	GOTERM_BP_ALL	GO:0006954~inflammatory response	29	10,51	8×10^{-17}
	GOTERM_BP_ALL	GO:0009605~response to external stimulus	37	6,14	10×10^{-15}
	GOTERM_BP_ALL	GO:0009611~response to wounding	30	7,76	7×10^{-14}
	GOTERM_BP_ALL	GO:0006950~response to stress	36	3,53	5×10^{-7}
2	INTERPRO	IPR001811:Small chemokine, interleukin-8-like	10	20,89	4×10^{-6}
	GOTERM_MF_ALL	GO:0008009~chemokine activity	10	20,69	2×10^{-6}
	GOTERM_MF_ALL	GO:0042379~chemokine receptor binding	10	20,17	3×10^{-6}
	SMART	SM00199:SCY	10	17,87	2×10^{-6}
	GOTERM_MF_ALL	GO:0001664~G-protein-coupled receptor binding	10	12,61	2×10^{-4}
3	GOTERM_BP_ALL	GO:0042330~taxis	15	10,92	4×10^{-7}
	GOTERM_BP_ALL	GO:0006935~chemotaxis	15	10,92	4×10^{-7}
	GOTERM_BP_ALL	GO:0007626~locomotory behavior	15	5,64	2×10^{-3}
	GOTERM_BP_ALL	GO:0007610~behavior	16	3,90	8×10^{-2}
4	GOTERM_BP_ALL	GO:0001816~cytokine production	12	8,44	9×10^{-4}
	GOTERM_BP_ALL	GO:0042089~cytokine biosynthetic process	10	10,55	2×10^{-3}
	GOTERM_BP_ALL	GO:0042107~cytokine metabolic process	10	10,42	2×10^{-3}
5	GOTERM_BP_ALL	GO:0051707~response to other organism	15	6,93	2×10^{-4}
	GOTERM_BP_ALL	GO:0009607~response to biotic stimulus	16	5,03	4×10^{-3}
	GOTERM_BP_ALL	GO:0051704~multi-organism process	15	4,82	0,01
6	SP_PIR_KEYWORDS	cytokine	14	6,54	2×10^{-4}
	GOTERM_MF_ALL	GO:0005125~cytokine activity	14	4,89	0,02
	GOTERM_MF_ALL	GO:0005102~receptor binding	16	1,91	1
7	GOTERM_BP_ALL	GO:0008219~cell death	25	2,84	0,04
	GOTERM_BP_ALL	GO:0016265~death	25	2,83	0,04

	GOTERM_BP_ALL	GO:0006915~apoptosis	24	2,87	0,05
	GOTERM_BP_ALL	GO:0012501~programmed cell death	24	2,83	0,06
	GOTERM_BP_ALL	GO:0048468~cell development	26	1,74	1
8	GOTERM_BP_ALL	GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	9	10,73	9×10^{-3}
	GOTERM_BP_ALL	GO:0045727~positive regulation of translation	8	12,42	0,02
	GOTERM_BP_ALL	GO:0031328~positive regulation of cellular biosynthetic process	8	11,55	0,03
	GOTERM_BP_ALL	GO:0042108~positive regulation of cytokine biosynthetic process	7	12,80	0,08
	GOTERM_BP_ALL	GO:0051247~positive regulation of protein metabolic process	9	7,80	0,1
	GOTERM_BP_ALL	GO:0042035~regulation of cytokine biosynthetic process	7	8,60	0,6
	GOTERM_BP_ALL	GO:0009893~positive regulation of metabolic process	11	2,00	1
	GOTERM_BP_ALL	GO:0031325~positive regulation of cellular metabolic process	10	1,93	1
9	GOTERM_BP_ALL	GO:0009889~regulation of biosynthetic process	11	4,81	0,4
	GOTERM_BP_ALL	GO:0006417~regulation of translation	10	5,24	0,5
	GOTERM_BP_ALL	GO:0051246~regulation of protein metabolic process	13	3,74	0,6
	GOTERM_BP_ALL	GO:0031326~regulation of cellular biosynthetic process	10	4,87	0,7

Darstellung der angereicherten Kategorien bekannter Signal- und Stoffwechselwege der Schnittmengen bestehend aus q1, q2, q5 und q14 des Venn Diagramms der Lunge. Die erhaltenen Kategorien sind in funktionellen Gruppen gegliedert (Spalte 1) und für jede dargestellte Kategorie (Spalte 3) ist die als Grundlage dienende Wissensdatenbank (Spalte 2) angegeben. Unter (http://david.abcc.ncifcrf.gov/helps/knowledgebase/DAVID_coverage.jpg) finden sich detaillierte Angaben zu den Datenbanken. In Spalte 4 ist die Zahl der Treffer im untersuchten Datensatz für die jeweilige Kategorie aufgeführt. Das verwendete *DAVID-tool* gibt unter anderem einen „*Fold Enrichment*“-Wert (Spalte 5) sowie den *post hoc* korrigierten p-wert nach *Bonferroni* (Spalte 6) für die jeweilige Kategorie aus. Hierbei zeigt der „*Fold-Enrichment*“-Wert an, wie stark die detektierten Elemente (Gene) der Kategorie im untersuchten Datensatz im Vergleich zum normalen Genom der untersuchten Spezies angereichert sind. Hierbei gilt ein Wert über 1.5 als interessant sowie ein im Rahmen der vorgelegten Studie festgelegter adjustierter p-Wert ≤ 0.05 als signifikant.

4.4.4.2 Leber

In der Leber zeigten sich insbesondere Bestandteile funktioneller Gruppen betreffend die Entzündungsreaktion (1) und die Akut-Phase Antwort (2 und 3) als signifikant angereichert. Die einzelnen Kategorien sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8. GSEA der Genexpression aus den Schnittmengen der hochregulierten Gene (q1, q2, q5, q14) beider Infektionsmodelle für das Venn Diagramm der Leber.

Funktio- nelle Gruppe	Kategorie	Name	Gefun- dene Elemente	Fold Enrichment	p-Wert Bonfer- roni	
1	GOTERM_BP_ALL	GO:0006954~inflammatory response	12	12,37	10 ⁻⁵	
	GOTERM_BP_ALL	GO:0009611~response to wounding	12	8,83	4 x 10 ⁻⁴	
	GOTERM_BP_ALL	GO:0009605~response to external stimulus	14	6,61	6 x 10 ⁻⁴	
	GOTERM_BP_ALL	GO:0006950~response to stress	15	4,18	0,04	
	GOTERM_BP_ALL	GO:0006952~defense response	14	4,50	0,04	
2	GOTERM_BP_ALL	GO:0006953~acute-phase response	5	43,34	0,02	
	SP_PIR_KEYWORDS	acute phase	4	42,16	0,09	
	GOTERM_BP_ALL	GO:0002526~acute inflammatory response	5	14,27	0,87	
3	SP_PIR_KEYWORDS	amyloid	4	96,96	7 x 10 ⁻³	
	SP_PIR_KEYWORDS	acute phase	4	42,16	0,09	
	INTERPRO	IPR000096:Serum amyloid A protein	3	141,03	0,63	
	PIR_SUPERFAMILY	PIRSF002472:amyloid protein, SAA type	3	125,59	0,46	
	SMART	SM00197:SAA	3	104,53	0,17	
	SP_PIR_KEYWORDS	hdl	3	45,45	0,8	
	GOTERM_MF_ALL	GO:0005319~lipid transporter activity	3	12,70	1	
	GOTERM_BP_ALL	GO:0009607~response to biotic stimulus	6	5,36	1	
4	GOTERM_BP_ALL	GO:0051707~response to other organism	5	6,57	1	
	GOTERM_BP_ALL	GO:0051704~multi-organism process	5	4,57	1	
	KEGG_PATHWAY	mmu04620:Toll-like receptor signaling pathway	4	5,92	1	
	GOTERM_MF_ALL	GO:0004867~serine-type endopeptidase inhibitor activity	5	8,97	1	
	GOTERM_MF_ALL	GO:0004866~endopeptidase inhibitor activity	5	6,45	1	
5	GOTERM_MF_ALL	GO:0030414~protease inhibitor activity	5	6,34	1	
	GOTERM_MF_ALL	GO:0004857~enzyme inhibitor activity	5	4,52	1	
	GOTERM_MF_ALL	GO:0030234~enzyme regulator activity	6	1,85	1	
	6	BIOCARTA	m_il22bppathway:IL22 Soluble Receptor Signaling Pathway	3	29,95	0,62
		SP_PIR_KEYWORDS	sh2 domain	4	8,90	1
INTERPRO		IPR000980:SH2 motif	4	8,79	1	
KEGG_PATHWAY		mmu04630:Jak-STAT signaling pathway	5	4,97	0,94	

	SMART	SM00252:SH2	4	6,45	1
	BIOCARTA	m_TPOPathway:TPO Signaling Pathway	3	9,98	1
	UP_SEQ_FEATURE	domain:SH2	3	7,47	1
7	GOTERM_BP_ALL	GO:0042330~taxis	4	8,28	1
	GOTERM_BP_ALL	GO:0006935~chemotaxis	4	8,28	1
	SP_PIR_KEYWORDS	chemotaxis	3	12,99	1
	GOTERM_BP_ALL	GO:0007626~locomotory behavior	4	4,27	1
8	GOTERM_BP_ALL	GO:0050794~regulation of cellular process	25	1,53	1
	GOTERM_BP_ALL	GO:0065007~biological regulation	28	1,42	1
	GOTERM_BP_ALL	GO:0050789~regulation of biological process	26	1,45	1
9	SP_PIR_KEYWORDS	inflammatory response	4	14,26	0,9
	INTERPRO	IPR001811:Small chemokine, interleukin-8-like	3	19,06	1
	GOTERM_MF_ALL	GO:0008009~chemokine activity	3	17,26	1
	GOTERM_MF_ALL	GO:0042379~chemokine receptor binding	3	16,83	1
	SMART	SM00199:SCY	3	14,13	1
	GOTERM_MF_ALL	GO:0001664~G-protein-coupled receptor binding	3	10,52	1
	SP_PIR_KEYWORDS	cytokine	4	5,64	1
	GOTERM_MF_ALL	GO:0005125~cytokine activity	3	2,91	1
	GOTERM_MF_ALL	GO:0005102~receptor binding	3	0,99	1

Darstellung der angereicherten Kategorien bekannter Signal- und Stoffwechselwege der Schnittmenge bestehend aus q1, q2, q5 und q14 des Venn Diagramms der Leber. Die erhaltenen Kategorien sind in funktionellen Gruppen gegliedert (Spalte 1) und für jede dargestellte Kategorie (Spalte 3) ist die als Grundlage dienende Wissensdatenbank (Spalte 2) angegeben. Unter (http://david.abcc.ncifcrf.gov/helps/knowledgebase/DAVID_coverage.jpg) finden sich detaillierte Angaben zu den Datenbanken. In Spalte 4 ist die Zahl der Treffer im untersuchten Datensatz für die jeweilige Kategorie aufgeführt. Das verwendete *DAVID-tool* gibt unter anderem einen „*Fold Enrichment*“-Wert (Spalte 5) sowie den *post hoc* korrigierten p-Wert nach *Bonferroni* (Spalte 6) für die jeweilige Kategorie aus. Hierbei zeigt der „*Fold-Enrichment*“-Wert an, wie stark die detektierten Elemente (Gene) der Kategorie im untersuchten Datensatz im Vergleich zum normalen Genom der untersuchten Spezies angereichert sind. Hierbei gilt ein Wert über 1.5 als interessant sowie ein im Rahmen der vorgelegten Studie festgelegter adjustierter p-Wert ≤ 0.05 als signifikant.

5 Diskussion

Die genauen molekularen Mechanismen septischer Erkrankungen sowie septischer Organschädigungen sind nicht abschließend geklärt. Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen dieser systembiologisch orientierten, Hypothesen generierenden Arbeit die Frage bearbeitet werden, wie sich das Transkriptom der Lunge als Ausgangsorgan der Sepsis bei *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie vom Transkriptom der Lunge als infektionsortfernes Organ der Sepsis bei polymikrobieller Peritonitis unterscheidet. Weiterhin sollten die transkriptomischen Reaktionen der Lunge mit jenen der Leber als infektionsortfernes und infektionsortnahes Organ in beiden Infektionsmodellen verglichen werden sowie die transkriptionelle Reaktion weiterer Organsysteme wie Milz und Blut in die Analyse einbezogen werden.

Mithilfe einer *Microarray* basierten Analyse zweier muriner Infektionsmodelle, der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie und der polymikrobiellen Peritonitis wurden die transkriptomischen Signaturen von Lunge, Leber, Milz und Blut bezüglich Infektionsfokus und –art verglichen. Zunächst wurden die organspezifischen molekularen Signaturen der Infektionsmodelle in einem systembiologischen Ansatz identifiziert sowie prinzipielle organspezifische Unterschiede in den beiden Infektionsmodellen herausgearbeitet. Für die polymikrobielle Peritonitis und die *S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie zeigten sich deutliche Unterschiede im Transkriptom von Leber, Milz und Blut (Abbildung 3). Auch innerhalb der experimentellen Gruppe der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie ergaben sich deutlich unterschiedliche Transkriptionsmuster für Leber, Milz und Blut. Für die Peritonitis konnte hingegen eine synchrone systemische Reaktion aller untersuchten Organsysteme auf Transkriptomebene nachgewiesen werden, wobei sich die Expressionsmuster zum jeweils frühen bzw. jeweils späten Zeitpunkt der Infektion in allen Organen sehr ähnlich verhielten. Die Lunge nahm eine Sonderstellung im Vergleich zu den anderen untersuchten Organsystemen ein. Sie präsentierte keine infektionsspezifische Reaktion des Transkriptoms, sondern bot ein weitgehend robustes Expressionsmuster bei beiden Infektionsmodellen dar (Abbildung 3).

Bei der Untersuchung aller Organe auf signifikante Koexpression bekannter Stoffwechsel- und Signalwege konnten Komponenten der Immunantwort (Komplement- und Gerinnungssystem, Regulation des Aktinzytoskeletts) sowie des Zellmetabolismus und Energiestoffwechsels (Zellzyklus, DNA-Replikation, Ribosom, oxidative Phosphorylierung, Steroidbiosynthese) als wesentliche Komponenten der

pathophysiologischen Sequenz der systemischen Entzündungsreaktion unterschiedlicher infektiöser Genese identifiziert werden (Tabelle 6).

Im Vergleich der Organe Lunge und Leber fiel die Lunge durch weitgehend robuste Transkriptionsveränderung in beiden Infektionsmodellen auf, wohingegen die Leber deutliche Unterschiede im infektionsspezifischen Transkriptom aufwies. Die Expressionsveränderungen in der Lunge bei *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie entsprachen weitestgehend einer Teilmenge der Expressionsveränderungen bei polymikrobieller Peritonitis (Abbildung 8 A-D). Die genauere Analyse dieser Teilmenge präsentierte wesentliche Bestandteile der so genannten *common host response* (Abbildung 12, Tabelle 7), welche einer ubiquitär identischen Alarmreaktion des Organismus auf eindringende Erreger entspricht.

Die *common host response* der Leber erschien hingegen weit geringer ausgeprägt als in der Lunge, insbesondere war die Schnittmenge ähnlich regulierter Gene beider Infektionsmodelle im Vergleich zur Lunge deutlich reduziert (Abbildungen 7 A – D; 12 und 13). Hier könnte aufgrund des metabolischen Repertoires der Leber eine Verschiebung zugunsten einer spezifischen metabolischen Antwort im Rahmen der Infektion stattgefunden haben. So zeigte sich bei *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie eine Hochregulation der Cholesterolsynthese auf Transkriptomebene im Organ Leber (Abbildung 9). Hierbei könnte es sich beispielsweise um einen spezifischen protektiven Mechanismus im Rahmen der Wirtsantwort gegen Pneumokokken handeln.

5.1 Wertung der Methodik

5.1.1 Tiermodelle

Trotz des Vorliegens zahlreicher Sepsis-Tiermodelle stellt sich immer wieder die Frage, ob es ein optimales Modell zur Darstellung eines so komplexen Krankheitsbildes mit all seinen pathophysiologischen Veränderungen gibt (Dyson und Singer 2009). Prinzipiell muss nach Betrachtung der Vor- und Nachteile einzelner Modelle eine individuelle Entscheidung bezogen auf die jeweilige Fragestellung getroffen werden.

In der vorgelegten Arbeit sollten generelle Informationen über organspezifische transkriptomische Signaturen septischer Erkrankungen unterschiedlicher Genese erhalten werden. Im Tiermodell sollten die beiden häufigsten klinischen Szenarien septischer Erkrankungen mit potentiell konsekutiven Organdysfunktionen betrachtet werden: Es wurden die *S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie durch den hochvirulenten Serotyp 2

(D39) sowie die fäkale polymikrobielle Peritonitis als geeignete murine Modelle ausgewählt.

In beiden Modellen kann die applizierte Bakterienmenge genau dosiert und somit standardisiert werden. Das Modell der intra-peritonealen Bakterienapplikation in Form humaner Faeces wurde von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Nichols et al. 1978, Lorenz et al. 1994, Stamme et al. 1999). Die Applikation einer polymikrobiellen humanen Faeces-Suspension bietet entscheidende Vorteile. Das gemischte Erregerspektrum aerober und anaerober sowie Gram-positiver und Gram-negativer Erreger spiegelt die Gegebenheiten der humanen Peritonitis wider (Stamme et al. 1999, Parker und Watkins 2001) und eignet sich somit besser als der Einsatz kultivierter Reinkulturen Gram-positiver oder Gram-negativer Bakterien um klinisch relevante Fragestellungen zu bearbeiten. Stamme et al. (1999) konnten zeigen, dass in diesem Modell eine dosisabhängige systemisch entzündliche Antwort hervorgerufen werden kann (Stamme et al. 1999).

Die Modelle der intra-trachealen oder intra-nasalen Pneumokokkenapplikation sind ebenfalls etablierte Infektionsmodelle (Bergeron et al. 1998, Moine und Mazoit 1999). Andonegui et al. (2008) konnten kürzlich mit Hilfe des Modells der intra-trachealen Pneumokokkenapplikation (*S. pneumoniae* SPN 15814) eine konsistente und reproduzierbare Organdysfunktion bei der Maus induzieren. Die systemische Beteiligung anderer Organe in diesem Modell trat unabhängig von einer Bakteriämie auf (Andonegui et al. 2008).

5.1.2 Auswertungsstrategien der Genexpressionsanalysen

Pathogen induzierte phänotypische Veränderungen in Wirtszellen sind meist auch mit wesentlichen Veränderungen der Genexpression vergesellschaftet. Seit dem Aufkommen der *Microarray* Technologie haben sich die Möglichkeiten, Veränderungen in einer Vielzahl von Transkripten gleichzeitig darzustellen, enorm erweitert. Zahlreiche Studien dokumentieren die Genexpression der Wirtszellen als Reaktion auf infektiöse Stimuli unterschiedlicher Herkunft (Jenner und Young 2005). Die meisten dieser Studien konzentrierten sich auf die Darstellung einzelner differentiell exprimierter Gene im so genannten *single gene approach* (Einzelgenanalyse) oder favorisierten die Schnittmengendarstellung differentiell exprimierter Einzelgene im Vergleich organ- bzw. infektionsspezifischer Transkriptionsmuster. Diese Vorgehensweise eignet sich insbesondere, um diagnostische Marker der Infektion oder der konsekutiven Organschädigung zu identifizieren. Aufgrund der bei dieser Herangehensweise

notwendigen Stringenz der statistischen Analysen erhält man jeweils nur einen kleinen Ausschnitt auf Einzelgenebene, ohne zwingend die jeweiligen systembiologischen Zusammenhänge zu erkennen. Die wesentlichen Brückenbausteine zur Komplettierung eines gesamtbiologischen Bildes werden bei einer stringenten statistischen Analyse ausgeklammert. In den letzten Jahren wurden deshalb auch einige erfolgreiche Versuche unternommen, den *single gene approach* mit holistischen oder systembiologischen Ansätzen zu paaren. Calvano et al. (2005) führten an freiwilligen gesunden Probanden eine Injektion von LPS zur Induktion einer selbst limitierenden systemischen Entzündungsreaktion durch und untersuchten die resultierenden Genexpressionsveränderungen zirkulierender Leukozyten in einer netzwerkbasierten Analyse (*Ingenuity Pathway Analysis*[®]). Das bezüglich spezieller Stoffwechsel- und Signalwege existierende Wissen sowie bekannte Wechselwirkungen und Zusammenhänge einzelner Genprodukte können über solche netzwerkbasierten Analysen, wie sie auch über KEGG (Kanehisa 2002, Kanehisa et al. 2006) bereitgestellt werden, auf den Datensatz angewandt werden.

Die in der vorgelegten Arbeit eingesetzte Software GEDI stellt die Gene einer Probe anhand ihrer Koexpression visuell dar, so dass Rückschlüsse auf biologisch und klinisch relevante Zusammenhänge gezogen werden können (Guo et al. 2006). Insbesondere bei einer hypothesenfreien Herangehensweise ist eine solche Darstellung sehr hilfreich. Anhand Gestalt- und Mustererkennung können z.B. verschiedene Tumorgewebe unterschieden werden (Guo et al. 2006).

Die Datenvielfalt eines *Microarray*experimentes ist generell nicht direkt ohne Informationsverlust erfassbar oder vergleichbar. Zum Erhalt möglichst vieler Informationen in der Analyse wurden in der vorgelegten Arbeit die detektierten Gene ohne Vorselektion durch weitere statistische Analysen, als Mediane logarithmierter Signale biologischer Replikate in die Software eingelesen. Die molekulare Signatur „niedriger Auflösung“ gibt somit wichtige Hinweise bei der globalen Suche und eröffnet Hypothesen, auf deren Grundlage eine Fokussierung auf Einzelgenniveau zur weiteren Signifikanzenerhebung erfolgen kann.

In der vorliegenden Untersuchung wurde der systembiologische, Hypothesen generierende Ansatz der selbst organisierenden Merkmalskarten (SOM) und darauf basierender GSEA mit konsekutiven Analysen von Einzelgenen aus signifikant koexprimierten Signal- und Stoffwechselwegen kombiniert. Dies diente ebenso wie die parallele Analyse des statistisch vorgefilterten Datensatzes mithilfe der Software *Ingenuity Pathway Analysis*[®] (Daten werden nicht im Rahmen der vorgelegten Arbeit diskutiert) als

interne Validierung der systembiologisch gewonnenen Erkenntnisse. Somit konnte die Qualität der Daten hervorgehoben werden sowie auch die Expression von Einzelgenen in signifikant koexprimierte Stoffwechsel- und Signalwege eingebettet werden. Zudem war anhand des systembiologischen Ansatzes der Vergleich der Transkriptome einzelner Organe und Konditionen anhand von Gestalterkennung im Sinne einer „molekularen Signatur“ möglich. Die Kombination einer „niedrigen“ (systembiologischer Ansatz) mit einer „hohen Auflösung“ (Einzelgenanalyse) stellt eine Möglichkeit dar, weitgehend verlustfreie Ergebnisse im Sinne einer Integration in die biologischen und pathophysiologischen Zusammenhänge zu erhalten. Anhand der in der vorgelegten Arbeit generierten Hypothesen können im Weiteren Einzelgenanalysen auf Signifikanzniveau durchgeführt werden, was jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit ist.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Die molekulare Signatur der Organe bei Sepsis unterschiedlicher Genese

5.2.1.1 Infektionsspezifität der transkriptomischen Veränderungen

Ein entscheidender Faktor, welcher wesentliche Fortschritte in der Therapie der Sepsis behindert, ist das lückenhafte Wissen über die Interaktionen der zahlreichen auslösenden Erreger mit dem Wirtsimmunsystem sowie der daraus resultierenden pathophysiologischen Veränderungen (Tang et al. 2008). Obwohl sich die klinischen Symptome einer Gram-positiven und einer Gram-negativen Sepsis nicht unterscheiden (Sriskandan und Cohen 1999), weiss man mittlerweile, dass fundamentale Unterschiede in der Wirtsreaktion auf molekularer Ebene bestehen. Der Hauptunterschied liegt in der Initiierung der Erkrankung (Opal und Cohen 1999). Unklar ist bisher, ob septische, infektionsortferne Organdysfunktionen unabhängig vom Fokus der Infektion immer gleich aussehen.

In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das Transkriptom von Leber, Milz und Blut bei Sepsis unterschiedlicher Genese unterscheidet (Abbildung 3). Diese Organe zeigten in der hierarchischen Clusteranalyse jeweils deutlich unterschiedliche Expressionsmuster in beiden Infektionsmodellen. Dies deutet auf eine infektions- bzw. erregerspezifische Reaktion der jeweiligen Organe hin. Die Lunge nahm hierbei eine Sonderstellung ein und zeigte ein weitgehend robustes Transkriptom für beide Infektionsmodelle.

Innerhalb der experimentellen Gruppe der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie unterschied sich das Transkriptom der jeweiligen Organe voneinander (Abbildung 3). Um sich den jeweiligen Umgebungsbedingungen optimal im Sinne einer effektiven

Vermehrung im Wirtsorganismus anzupassen, verändern manche Erreger gewebsspezifisch die Expression bestimmter Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren. Orihuela et al. (2004) konnten *in vivo* und *in vitro* zeigen, dass verschiedene Serotypen von *S. pneumoniae* gewebsspezifisch die Expression sowohl von Bestandteilen überlebenswichtiger Stoffwechselwege als auch von Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren an die Umwelt anpassen können (Orihuela et al. 2004). Entsprechend wäre es denkbar, dass in verschiedenen Geweben desselben Wirts vom selben Erreger unterschiedliche Transkriptionsmuster hervorgerufen werden können. Die erregerspezifische Beeinflussung des Wirtszelltranskriptoms (Reprogrammierung) ist beschrieben (Hossain et al. 2006). Im Zusammenhang mit solchen Phänomenen ist auch auf die bei zahlreichen Gram-positiven (z.B. *Streptococcus* Spezies) und Gram-negativen (z.B. Pseudomonaden) Erregern anzutreffenden *Quorum sensing* Systeme zu verweisen (Williams et al. 2000, Singh et al. 2006). Hierbei steuert die Bakterienpopulation nach Erreichen einer Schwellenpopulationsgröße sozusagen durch Synchronisation des eigenen „Populationstranskriptoms“ beispielsweise die Expression von Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren sowie die lokale „Reprogrammierung“ des Wirtszelltranskriptoms.

Ebenfalls könnte die im Verlauf der Pneumonie getriggerte systemische Entzündungsreaktion abhängig vom Mikromilieu der jeweiligen Organe unterschiedliche Transkriptionsmuster hervorgerufen haben. Zur Klärung der Frage, ob die in der vorgelegten Arbeit aufgetretenen Gruppierungseffekte bezüglich des Transkriptionsmusters rein infektionsspezifisch sind, wäre der Vergleich einer Pneumokokken-Pneumonie mit einer Pneumokokken-Peritonitis gleicher Infektionsdosis sinnvoll. Zur Komplettierung wäre ebenso der analoge Vergleich einer polymikrobiellen Pneumonie mit einer polymikrobiellen Peritonitis sinnvoll.

Für die Peritonitis konnte eine synchrone systemische Reaktion aller untersuchten Organsysteme auf Transkriptomebene nachgewiesen werden. Hierbei verhielten sich die Expressionsmuster zum jeweils frühen bzw. jeweils späten Zeitpunkt der Infektion in allen Organen sehr ähnlich (Abbildung 3). In diesem Fall überwog das infektions- und stadienspezifische Transkriptom das organspezifische Transkriptom. Höchstwahrscheinlich führte hierbei der polymikrobielle Charakter des Modells zu einer Überlagerung der erregerspezifisch entstandenen Wirtszelltranskriptome, so dass sich unabhängig von der Organfunktion und metabolischen Kompetenz der Zellen eine ausgedehnte *common host response* zeigte. Die große Ähnlichkeit der molekularen Signatur aller Organe bei Peritonitis zum Zeitpunkt 6 Stunden unterstützt diese Hypothese (Abbildung 5-8 A).

Zudem könnte die hohe Letalität des Peritonitismodells bzw. die hohe Infektionsdosis Einfluss auf die Intensität und Kinetik der transkriptomischen Veränderungen genommen haben. Hierbei könnten beispielsweise große Mengen bakterieller Toxine und Zellwandbestandteile wie LPS oder Lipoteichonsäure und Peptidoglykane in der systemischen Zirkulation zu dieser ausgeprägten systemweiten Reaktion im Transkriptom geführt haben.

5.2.1.2 Kinetik der transkriptomischen Veränderungen

Mithilfe der systembiologischen Darstellung der molekularen Signatur durch die Software GEDI konnten die Ergebnisse der Clusteranalyse über Gestalterkennung bildlich bestätigt werden. Sowohl in den selbst organisierenden Merkmalskarten als auch in den Einzelorgananalysen (beispielhaft dargestellt für Leber und Lunge im Venn Diagramm; Abbildungen 12 und 13), zeigte sich der für das jeweilige Infektionsmodell entscheidende Zeitpunkt bezüglich einer positiven Expressionsveränderung. Dies war der 6 Stunden-Zeitpunkt für die Peritonitis in allen Organen sowie der 24 Stunden-Zeitpunkt für die Pneumonie in allen Organen. Es ist nicht gänzlich auszuschließen, dass ein Teil der unterschiedlichen Maximalzeitpunkte in beiden Modellen aus der unterschiedlichen Stärke der Modelle resultiert.

Vorrangig sind allerdings die unterschiedlichen pathophysiologischen Prozesse zu berücksichtigen. Hierbei ist der Infektionsweg von bedeutendem Interesse. Bei der fäkalen Peritonitis wird von außen eine große Zahl lebender Bakterien in die Bauchhöhle eingebracht. Die Lymphe des Peritoneums drainiert über den Ductus thoracicus direkt in den großen Kreislauf, weshalb eine intra-abdominelle Infektion sehr rasch eine systemische Mitbeteiligung verursacht. Zudem erfolgt die Drainage des Blutes der unpaaren Abdominalorgane über die portalvenöse Zirkulation in die Leber. Eine derart geleitete rasche Überflutung der untersuchten Organe mit bakteriellen Toxinen und Bakterienbestandteilen sowie auch lebenden Bakterien und aktivierten Immunzellen könnte die rasche synchrone Reaktion des Transkriptoms in dem hier verwendeten Peritonitismodell erklären. Bei der Pneumonie hingegen werden lebende Erreger intra-tracheal appliziert und von der Maus in die distalen Lungenkompartimente aspiriert. Bergeron et al. (1999) beschreiben die pathogenetischen Schritte der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie bei der Maus von der Infektion bis hin zum Tod der Tiere. Sie konnten zeigen, dass nach intra-nasaler Applikation von *S. pneumoniae* Typ 3 innerhalb der ersten 24 Stunden zunächst eine alveoläre Bakterienvermehrung sowie eine lokale

Reaktion in den Alveolen durch rekrutierte neutrophile Granulozyten erfolgte. Erst nach 24 Stunden kam es zum Übertritt der Bakterien aus den Alveolen in das Lungenparenchym sowie in die systemische Zirkulation (Bergeron et al. 1998).

Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung in der Lunge sowie die Untersuchung der Leukozytensubpopulationen in der bronchoalveolären Lavage in der vorgelegten Untersuchung zeigten eine Reduktion der initial eingebrachten Keimzahl um ca. zwei log-Stufen. Ebenso zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der initial massiv angestiegenen neutrophilen Granulozyten mit parallel deutlicher Zunahme von Monozyten, Alveolarmakrophagen und Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage von Tag eins auf Tag zwei p.i. (Tabelle 3). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Bergeron et al. (1999). Die Autoren berichten über eine ausgeprägte Monozytenrekrutierung aus dem Blut in die Alveolen sowie eine ebenfalls auffallende Lymphozytenrekrutierung und Leukopenie im Zeitraum von 48 bis 72 Stunden p.i. (Bergeron et al. 1998). Diesen Daten zufolge könnten die deutlichen Expressionsveränderungen aller Organe zum Zeitpunkt 24 Stunden bei *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie in der vorgelegten Arbeit sowohl mit einer effektiven Bakterienclearance als auch dem Übergang der alveolären Bakterienbesiedlung ins Lungengewebe respektive in die systemische Zirkulation assoziiert sein. Den Daten von Andonegui et al. (2008) zufolge ist die durch eine *S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie hervorgerufene Organschädigung und systemische Aktivierung unabhängig von einer vorliegenden Bakteriämie (Andonegui et al. 2008). In der vorgelegten Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass wesentliche Komponenten des Toll-like Rezeptor-Signalweges in allen Organen bei beiden Infektionsmodellen aktiviert sind (Abbildung 14). Somit ist von einer systemischen Aktivierung des angeborenen Immunsystems in beiden untersuchten Infektionsmodellen auszugehen. Dies wird auch durch die in den Venn-Diagrammen ersichtliche Aktivierung der *common host response* in Leber und Lunge bei beiden Infektionsmodellen deutlich (Abbildungen 12 und 13). Zusammengefasst liegt in beiden Modellen eine systemische Entzündungsreaktion vor. In Kombination mit dem gesicherten infektiösen Fokus (Peritonitis/Pneumonie) kann entsprechend klinischer Kriterien von einem septischen Geschehen sowohl bei der fäkalen Peritonitis als auch bei der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie ausgegangen werden.

Sowohl die Clusteranalyse und die Merkmalskarten aus GEDI (Abbildungen 3 und 5) als auch die Darstellung der Aktivierung des Toll-like Rezeptor Signalweges (Abbildung 14) ließen ebenfalls vermuten, dass der „Mediator“ Blut bzw. die zirkulierenden Leukozyten das infektionsspezifische Transkriptom konsistent und

frühzeitig (bereits zum 6 Stunden-Zeitpunkt) transportiert. Dies kann auch aus den Venn Diagrammen des Blutes vermutet werden (Abbildung 15 im Datenanhang). Somit könnte der infektiöse Prozess der Lunge unabhängig von einer Invasion der Erreger in die systemische Zirkulation im Transkriptom zirkulierender Leukozyten widergespiegelt sein. Ein Beweis dieser Hypothese steht jedoch aus.

5.2.1.3 Einfluss des Erregerspektrums auf die Kinetik der transkriptomischen Veränderungen

Die unterschiedliche Geschwindigkeit der zellulären Reaktion auf Transkriptomebene in beiden Infektionsmodellen könnte zudem durch den Einsatz verschiedener Erregerspezies und -gruppen mitbedingt sein. Das eingesetzte Faecsinokulum beinhaltet einen hohen Anteil an Gram-negativen Erregern (Tabelle 2). Calvano et al. (2005) konnten zeigen, dass die Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine ihr Maximum zwei bis vier Stunden nach Gabe des Gram-negativen Zellwandbestandteiles LPS erreichte. Vier bis sechs Stunden nach LPS-Gabe konnte die Expression zahlreicher sowohl immun-aktivierender als auch immun-limitierender Transkriptionsfaktoren festgestellt werden (Calvano et al. 2005). Entsprechend sind im Peritonitismodell nach 6 Stunden stärkere Veränderungen als nach 24 Stunden zu erwarten.

Die transkriptomische und proteomische Reaktion auf Gram-positive Bakterientoxine und Bakterienbestandteile zeigt teilweise eine unterschiedliche Kinetik. Gram-positive Toxine führen je nach untersuchtem Zytokin erst nach einer Latenz von 12 bis zu 75 Stunden zu einer ausgeprägten Zytokinreaktion (Andersson et al. 1992). Andererseits konnte gezeigt werden, dass eine frühe Wirtsantwort bei Gram-positiver Infektion über TLR 2 vermittelt wird. Diese wird innerhalb der ersten drei Stunden initiiert (Hossain et al. 2006). Die späte Reaktion auf Gram-positive Erreger erfolgt nach Eindringen oder Aufnahme in Wirtszellen oder Phagozyten. Diese Reaktion ist TLR unabhängig und verläuft oft über Interferon responsive Gene (Hossain et al. 2006). So könnte beispielsweise die frühe Reaktion zirkulierender Leukozyten in der vorgelegten Untersuchung der frühen TLR getriggerten Wirtsantwort entsprechen, was sich auch in Abbildung 14 des Datenanhangs erkennen lässt. Die späte transkriptionelle Reaktion im Ausgangsorgan Lunge sowie in den infektionsortfernen Organen Leber und Milz könnte die späte TLR-unabhängige Phase der Immunantwort nach Eindringen oder aktiver Aufnahme der Erreger in Wirtszellen widerspiegeln. Zur weiteren Untersuchung dieser Vermutung sollte die Analyse entsprechender Marker erfolgen. Dies war nicht Gegenstand

der vorliegenden Untersuchung, so dass die Hypothese nicht endgültig untermauert werden kann.

5.2.2 Aktivierte transkriptomische Programme bei Sepsis

5.2.2.1 Generelles Überlebens- und Schutzprogramm und common host response

Bei der Sepsis kommt es zu einer überschießenden systemischen Reaktion des Wirtsimmunsystems auf einen infektiösen Stimulus. Hierbei werden die regulären transkriptomischen Programme der Zellen verschoben (Jenner und Young 2005). Diese „Reprogrammierung“ des Wirtszelltranskriptoms wird größtenteils durch Bestandteile sowie Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren des Erregers bewirkt und führt zur Aktivierung der *common host response* sowie auch erregerspezifischer Reaktionen (Jenner und Young 2005). Pedron et al. (2003) verglichen die transkriptomischen Veränderungen mucosaler Epithelzellen des Colons nach Infektion mit einem invasivem sowie einem nicht-invasivem Stamm von *Shigella flexneri*. Sowohl bei invasiver als auch nicht-invasiver Infektion kam es zur Initiierung eines frühen „Überlebens- und Schutzprogramms“, welches durch die Expression von Genen, welche für Proteine des Detoxifikationsprozesses (Cytochrome) sowie der Proliferation, DNA-Protektion und Anti-Apoptose kodieren, gekennzeichnet war. Dieses frühe Programm wurde allerdings nur bei der invasiven Infektion von einem späten pro-inflammatorischen Programm gefolgt, welches im Wesentlichen der *common host response* entsprach (Pedron et al. 2003). Es ist somit denkbar, dass die Wirtszelle generell ein initiales Schutzprogramm startet und erst bei Hinzukommen anderer Faktoren und/oder Versagen des Schutzprogrammes die pro-inflammatorische Antwort programmiert wird. In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass Komponenten dieses Schutzprogrammes generell bei beiden untersuchten Infektionsmodellen reguliert wurden (Tabelle 6).

5.2.2.2 Fokus- und erregerunabhängige Koexpression von Stoffwechsel- und Signalwegen als pathophysiologische Grundlage der Sepsis

Anhand der organ- und konditionsübergreifenden Analyse signifikant koexprimierter Stoffwechsel- und Signalwege konnten in der vorgelegten Arbeit zahlreiche, die Immunantwort (Komplement- und Gerinnungssystem, Regulation des Aktinzytoskeletts), den Zellmetabolismus (Ribosom, Proteasom, Zellzyklus, DNA-Replikation) und Energiestoffwechsel (oxidative Phosphorylierung) betreffende Kategorien identifiziert werden (Tabelle 6). Diese stellen sowohl mögliche Komponenten eines „Wirtszell-

Überlebens- und Schutzprogrammes“ als auch der Pathogen induzierten Immunantwort dar und scheinen maßgeblich an der pathophysiologischen Sequenz der Sepsis unterschiedlicher Genese beteiligt zu sein. Die Kategorien „Komplement und Gerinnungskaskade“, „Steroidbiosynthese“ und „Regulation des Aktinzytoskeletts“ könnten als Mediatoren des Einzelzellstress und der auf Einzelzellebene induzierten Reaktionen auf infektiöse Stimuli in den Gesamtorganismus gesehen werden.

Die signifikante Koexpression von Komponenten des Komplement- und des Gerinnungssystem unterstreicht deren wesentliche Rolle in der pathophysiologischen Sequenz der Sepsis und der septischen Organdysfunktion (Marshall 2001, Bauer und Reinhart 2004, Levi und van der Poll 2004, Tosi 2005, Levi und Opal 2006). Insbesondere das im Normalzustand anti-koagulatorisch wirkende Gefäßendothel entwickelt pro-koagulatorische Eigenschaften im Rahmen der Inflammation (Bevilacqua et al., Bevilacqua et al. 1986, Moore et al. 1987, Moore et al. 1989, Ihrcke et al. 1993). Zusätzlich wird im Verlauf der Sepsis die Fibrinolyse gehemmt (Schleef et al. 1988, van der Poll et al. 1991). Das Komplementsystem leistet wesentlichen Beitrag bei der Erregerelimination durch Opsonierung, Phagozytenrekrutierung und Bakteriolyse (Joiner et al. 1984, Petersen et al. 2001, Walport 2001).

Die Regulation des Aktinzytoskeletts ist wesentliche Voraussetzung z.B. bei der Neutrophilenchemotaxis sowie Transmigration aus dem Gefäßsystem an den Ort der Infektion (Tosi 2005). Über Zelloberflächenrezeptoren wird das Aktinzytoskelett reorganisiert, was zur Zellbeweglichkeit führt (Cicchetti et al. 2002). Sowohl bei Patienten mit schweren Verbrennungen (de Chalain et al. 1994) als auch bei septischen Patienten (Tavares-Murta et al. 2002) konnten Störungen der chemotaktischen Funktion nachgewiesen werden. In der Studie von Tavares-Murta et al. (2002) wurde dies hauptsächlich bei Patienten mit tödlichem Ausgang der Sepsis gefunden. Die Plastizität und Organisation des Zytoskeletts spielt auch eine wesentliche Rolle bei der interzellulären Kommunikation im Rahmen der Immunantwort und der T-Zell-Aktivierung durch Antigen präsentierende Zellen (Sancho et al. 2002, Trost et al. 2009). Weiterhin hat das Aktinzytoskelett eine zentrale Rolle beim Vesikeltransport Vorgänge. (Park und Loh 2008). Eine Suppression des Aktinzytoskeletts kann zu negativen Folgen für das Individuum mit Immunsuppression und erhöhtem Infektionsrisiko führen (de Chalain et al. 1994, Tavares-Murta et al. 2002). Eine Induktion spräche u.a. für aktive Vorgänge im Rahmen der Immunantwort.

Die Regulation der Kategorien Zellzyklus sowie DNA-Replikation in der vorgelegten Arbeit deutet auf einen modifizierten Zellstoffwechsel hin. Die genaue Regulation der Kategorie innerhalb der Organe und Konditionen wird Aufschluss geben, ob jeweils eine vermehrte oder reduzierte Proliferation und Syntheseleistung vorliegt. Dies wird im Rahmen der vorgelegten Arbeit nicht detailliert untersucht.

Die Ergebnisse der GSEA implizieren ebenfalls eine wesentliche Rolle der Organellen der Proteinbiosynthese, der Ribosome in der Pathogenese der Sepsis. In einer Publikation von Hollingsworth et al. (2007) wurden verschiedene Mausstämme bezüglich ihrer Immunantwort auf *Streptococcus zooepidemicus* untersucht. Hierbei fiel auf, dass es resistente sowie susceptible Mausstämme gab, wobei die susceptible Stämme eine Induktion der ribosomalen Genexpression und die resistenten Stämme eine signifikante Herabregulation der ribosomalen Genexpression zeigten (Hollingsworth et al. 2007). Somit scheint die ribosomale Genexpression wesentlich mit der Immunantwort gekoppelt zu sein.

Proteasome sind essentielle Bestandteile aller eukaryoten Zellen, da sie an der Aufrechterhaltung der Proteinhomeostase beteiligt sind. In Form von Immunoproteasomen spielen sie eine Rolle bei infektiösen Prozessen und anderen Erkrankungen. Die vermehrte Expression von Untereinheiten des Immunoproteasoms wird beispielsweise durch IFN- γ induziert (Dahlmann 2007). In der vorgelegten Untersuchung deutet eine signifikante Koexpression entsprechender Bestandteile der Proteasome auf eine wesentliche Beteiligung dieser bei beiden Infektionsmodellen hin.

Die signifikante Koexpression von Komponenten der oxidativen Phosphorylierung impliziert die Beeinflussung Energie gewinnender Prozesse im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion. Bei septischen Erkrankungen kann eine veränderte Expression dieser Kategorie sowohl durch einen erhöhten Energiebedarf im Rahmen der Immunantwort und der zellulären Stressantwort hervorgerufen werden als auch auf eine zelluläre Schädigung mit mitochondrialem Untergang im Rahmen der septischen Organdysfunktion hinweisen (Tosi 2005, Marshall 2001).

Um genauere Aussagen über die Regulation der Kategorien in den einzelnen Organen und jeweiligen Infektionsmodellen treffen zu können, muss eine Einzelanalyse folgen, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht für alle Kategorien durchgeführt werden konnte. In der Analyse aller Organe und Konditionen zeigten sich Komponenten der Stoffwechselkategorie der Steroidbiosynthese ebenfalls als signifikant koexprimiert.

Aufgrund der auffallenden spezifischen Hochregulation dieser Komponenten im Organ Leber bei Pneumonie wurde diese Kategorie im Folgenden näher betrachtet.

5.2.3 Steroid- und Cholesterolbiosynthese bei Sepsis

In der vorgelegten Arbeit konnte eine signifikante Koexpression von Schlüsselenzymen der Steroidbiosynthese bzw. vornehmlich der Cholesterolbiosynthese gezeigt werden (Abbildungen 9 und 10). Eine Koexpression von Genen deutet immer auch auf eine Koregulation durch vorgeschaltete Transkriptionsfaktoren hin. Im vorliegenden Datensatz konnte ebenfalls die Koexpression der Transkriptionsfaktoren *sterol regulatory element binding factor* Sreb1 und 2 mit den nachgeschalteten Enzymen der Cholesterolbiosynthese auf Transkriptomebene bestätigt werden (Abbildung 10). Vornehmlich ist Sreb2 für die Regulation der Cholesterolbiosynthese zuständig (Horton et al. 2003). Betrachtet man die genaue Regulation der koexprimierten Gene des Stoffwechselweges in den einzelnen Organen und zu den unterschiedlichen Konditionen, fällt eine spezifische Hochregulation im Organ Leber bei Pneumonie auf (Abbildung 9). Für die Peritonitis imponiert eine Herabregulation der meisten Enzyme der Cholesterolbiosynthese auf Transkriptomebene. Dies ist eindrucksvoll in der *Heatmap* der einzelnen Gene für das Organ Leber gezeigt (Abbildung 10). Die Expressionsänderungen in beiden Infektionsgruppen wurden jeweils zur modellspezifischen Shamgruppe ermittelt, so dass ein eventueller Shameffekt ausgeblendet werden kann. Die Selektivität für das Organ Leber ist erwartungsgemäß, da die Cholesterolbiosynthese größtenteils in der Leber stattfindet. Auch die Induktion der Genexpression für die Cholesterolbiosynthese bei Pneumokokkenpneumonie liegt im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche dies auf Enzymniveau bestätigen konnten (Fisher et al. 1971, Guckian 1973, Canonico et al. 1977).

5.2.3.1 Cholesterol

Cholesterol ist Ausgangssubstanz aller Steroidhormone und zudem wesentlicher Bestandteil aller Phospholipidmembranen des menschlichen Organismus. Neben seiner Funktion als Zellmembranbestandteil spielt Cholesterol eine lebenswichtige Rolle im Metabolismus. Manche Signalproteine erfordern eine kovalente Bindung zu Cholesterol oder den Intermediärprodukten der Cholesterolbiosynthese (z.B. Farnesyldiphosphat und Geranylgeranyl Diphosphat) zur Funktionstüchtigkeit (Porter et al. 1996). Andere wesentliche Nebenprodukte der Cholesterolbiosynthese sind die Ubiquinone, welche eine

entscheidende Rolle in der Redoxbalance und bei der oxidativen Phosphorylierung spielen (Vyroubal et al. 2008). Cholesterol wird sowohl aktiv resorbiert als auch *de novo* synthetisiert aus Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA). Prinzipiell können alle kernhaltigen Zellen des Organismus Cholesterol zur intrazellulären Verwendung synthetisieren. Die Synthese von Cholesterol zur Bildung von Plasma-Lipoproteinen ist auf die Leber und den distalen Teil des Dünndarms beschränkt. Da die Synthese mit einem hohen Energieaufwand verbunden ist, greifen die meisten Zellen auf Plasma-Lipoproteine als Cholesterol-Quellen zurück. Die Hauptsynthese findet nachts zwischen zwei und vier Uhr statt (Vyroubal et al. 2008) und die maximale Syntheseleistung eines gesunden Menschen liegt bei ca. 500-1000 mg pro Tag.

5.2.3.2 *Stoffwechsel des Cholesterols*

Gallensäuren stellen mengenmäßig das bedeutendste Stoffwechselprodukt des Cholesterols dar. Zudem entstehen über mehrere Zwischenprodukte zahlreiche Steroidhormone (Progesteron, Cortison, Cortisol, Aldosteron, Östrogene und Androgene). Weiterhin wird Cholesterol in den Lipid haltigen Zellmembranen des Organismus eingebaut und spielt eine wesentliche Rolle als Kofaktor mancher Signalproteine (Porter et al. 1996).

5.2.3.3 *Ergebnisse klinischer Studien*

Cholesterol ist das zentrale Molekül der Steroidbiosynthese. Eine Hypocholesterolämie tritt bei kritisch kranken Patienten sehr häufig auf (Coombes et al. 1980, Alvarez und Ramos 1986, Budd und Ginsberg 1986). Dies stellt einen ungünstigen Prognosefaktor dar, da eine Hypocholesterolämie meist die Schwere der Infektion und metabolischen Dysregulation sowie die Schwere einer Organdysfunktion reflektiert (Vyroubal et al. 2008). Es konnte beobachtet werden, dass die Konzentration von Cholesterol und Lipoproteincholesterol in den Frühphasen kritischer Erkrankungen deutlich abfällt (Gordon et al. 1996, Gordon et al. 2001). Zahlreiche klinische Studien konnten eine Assoziation niedriger Cholesterolspiegel und Sepsis aufzeigen (Fraunberger et al. 1998, Fraunberger et al. 1999, Dunham et al. 2003, van Leeuwen et al. 2003). Es konnte eine negative Beeinflussung der Cholesterolspiegel durch pro-inflammatorische Zytokine wie beispielsweise IL-6, TNF- α und IL-1 β gezeigt werden (Spriggs et al. 1988, Ettinger et al. 1994, van Gameren et al. 1994). Pathologische Prozesse mit starker Eiterbildung imponieren durch ausgedehnte Verluste von Cholesterol in Form zersetzter Leukozyten.

Hierbei kann der Bedarf an Cholesterol für Zellteilung und Reparaturprozesse die maximal mögliche endogene Syntheseleistung um das 5- bis 6-fache übersteigen (Bonville et al. 2004, Vyroubal et al. 2008).

Die Rolle von Cholesterol bei der Immunantwort bezieht sich auch auf die Neutralisation von LPS. Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass die Bildung eines LPS-*high density lipoprotein* (HDL) Komplexes die Bindung von LBP und CD14 sowie konsekutive Aktivierung mononukleärer Zellen reduziert (Ulevitch et al. 1979, Freudenberg et al. 1980, Levine et al. 1993). LPS-Chylomikron-Komplexe erleichtern beispielsweise den Transport von LPS zu Hepatozyten, wo dessen Detoxifikation stattfindet (Harris et al. 1993).

Cholesterol spielt weiterhin eine zentrale Rolle bei der Produktion adrenaler Hormone wie Cortisol, wobei Hinweise dafür bestehen, dass HDL die bevorzugte Cholesterol-Quelle darstellt (Yaguchi et al. 1998). Sowohl in Ruhe als auch im Stress entstammen 80% des zirkulierenden Cortisols aus Plasmacholesterol, wohingegen lediglich 20% *in situ* aus Acetat oder anderen Vorstufen gebildet werden (Borkowski et al. 1967). Bei 61% der Patienten mit septischen Schock tritt eine absolute oder relative Nebennierenrindeninsuffizienz auf (Marik und Zaloga 2003). Die genauen Ursachen dieser reversiblen Störung sind unbekannt, niedrige HDL-Spiegel könnten hierbei jedoch eine wesentliche Rolle spielen (Chenaud et al. 2004, Marik 2004). In einer klinischen Studie bei pädiatrischen Meningokokkeninfektionen konnte eine Hypocholesterolämie, vergesellschaftet mit einer Hypocortisolämie festgestellt werden, wobei die verstorbenen Patienten regelhaft niedrigere Cholesterolspiegel aufwiesen (Vermont et al. 2005).

5.2.3.4 Ergebnisse der vorgelegten Untersuchung im Kontext der experimentellen Studienlage zum Thema sowie Einbettung in die Ergebnisse klinischer Studien

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorgelegten Untersuchung sowie zu den zuvor zitierten Ergebnissen klinischer Studien konnten Erhöhungen des Serumcholesterolspiegels sowie eine Erhöhung der β -HMG-CoA (Hydroxy-Methyl-Glutayryl-Coenzym A)-Reduktase Aktivität nach LPS-Gabe im Tiermodell gezeigt werden (Memon et al. 1993). In mehreren Infektionstiermodellen wurde eine Erhöhung der hepatischen Synthese von Cholesterol und/oder der β -HMG-CoA-Reduktase Aktivität nachgewiesen (Canonico et al. 1977, de Vasconcelos et al. 1989, Lanza-Jacoby und Tabares 1990). In einem Model mit syrischen Hamstern konnte gezeigt werden, dass der Cholesterolspiegel nach LPS-Injektion ansteigt. Der damit vergesellschaftete Anstieg der β -HMG-CoA-Reduktase

mRNA konnte bereits vier Stunden nach LPS-Gabe gesehen werden und persistierte für mindestens 24 Stunden (Feingold et al. 1993). Andere Studien konnten zeigen, dass die pro-inflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 nach systemischer Gabe ebenfalls die hepatische β -HMG-CoA-Reduktase induzieren (Hardardottir et al. 1994). Eine Vorbehandlung mit TNF-neutralisierenden Antikörpern konnte die LPS-induzierte Erhöhung der β -HMG-CoA-Reduktase Aktivität sowie der Serumcholesterolspiegel und hepatischen Cholesterolsynthese inhibieren (Memon et al. 1993). Feingold et al. (1995) konnten ebenfalls bestätigen, dass es zu einer spezifischen Erhöhung der β -HMG-CoA-Reduktase mRNA Spiegel durch Gabe von LPS oder den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF und IL-1 (allein oder in Kombination gegeben) kommt. In der zitierten Studie wird dies als Bestandteil der Akut-Phase Reaktion gewertet (Feingold et al. 1995).

Die Ergebnisse tierexperimenteller Studien zur Infektion mit Gram-positiven Erregern stehen hingegen im Einklang mit den in der vorgelegten Untersuchung präsentierten Ergebnissen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Injektion des Gram-positiven Zellwandbestandteiles Lipoteichonsäure bei der Ratte sowohl eine Hypertriglyzeridämie als auch eine milde Hypercholesterolämie auslöst (Nonogaki et al. 1995). Canonico et al. (1977) konnten nach subkutaner Pneumokokkeninfektion bei der Ratte eine 6-fache Aktivitätserhöhung der β -HMG-CoA-Reduktase sowie eine 18-fache Zunahme von Cholesterol und Diglyceriden zeigen (Canonico et al. 1977). Ähnliche Ergebnisse konnten bereits durch Fisher et al. (1971) und Guckian (1973) präsentiert werden. Auch sie konnten eine Erhöhung der Cholesterol- und Triglyceridsynthese durch die Leber bei Pneumokokkeninfektion nachweisen (Fisher et al. 1971, Guckian 1973).

Die teils widersprüchlichen Ergebnisse bei Peritonitis könnten sowohl bedingt sein durch die Betrachtung unterschiedlicher Organismen, wie Mensch und Tier als auch durch die Tatsache, dass im Rahmen der aufgeführten klinischen Studien Daten zur Genexpression der entscheidenden Enzyme fehlen. Zudem sind die genauen Ursachen der klinisch messbaren Hypocholesterolämie unbekannt. Beispielsweise wird die Hypocholesterolämie auch mit reduzierten Spiegeln einiger Plasmaproteine in Verbindung gebracht. Zu nennen wären unter anderem Gesamtprotein sowie Albumin, Präalbumin und Retinol bindendes Protein (Chiarla et al. 1990, Giovannini et al. 1999, Chiarla et al. 2000, Lopez-Martinez et al. 2000, Chiarla et al. 2004, Giovannini et al. 2006). In diesem Zusammenhang ist auch die damit einhergehende Hämodilution anzuführen, welche zudem auch durch die im Rahmen der klinischen Behandlung durchgeführte Volumentherapie mitbedingt werden kann. Eine weitere Erklärung für die einerseits erhöhte Genexpression

der Schlüsselenzyme der Cholesterolsynthese im Tiermodell bei andererseits in klinischen Studien imponierender Hypocholesterolämie, könnte der vermehrte Verbrauch des *de novo* synthetisierten Cholesterols durch Reparaturprozesse und erhöhten Zellumsatz, v.a. von Immunzellen bieten. Ähnlich könnte ein vermehrter Anfall von LPS zirkulierendes Cholesterol „aufbrauchen“. Bei Überschreiten der *de novo* Synthesekapazität wäre es denkbar, dass trotz maximal induzierter Synthese in der Leber der Serumcholesterolspiegel sinkt. Eine abschließende Beurteilung ist jedoch anhand der generierten Daten nicht möglich und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die ausbleibende Aktivierung der Cholesterolsynthese oder sogar Herabregulation einzelner Gene des Stoffwechselweges bei Peritonitis präsentiert ein konträres Ergebnis zu beispielsweise Resultaten von Feingold und Kollegen (Feingold et al. 1995). Die meisten der zitierten Studien bezüglich Gram-negativer Infektionen untersuchten den direkten Einfluss von LPS oder Zytokinen auf die Steroidbiosynthese. In der vorgelegten Arbeit wurde eine fäkale Peritonitis mit hoher Letalität ausgelöst, wobei die Entwicklung konsekutiver Organversagen angenommen wurde. Es ist durchaus denkbar, dass durch eine infektiös-getriggerte Leberdysfunktion eine Cholestase mit negativer Regulation der Cholesterolsynthese entstand. In experimentellen Studien konnte der negative Regulationsmechanismus von Gallensäuren auf die Steroidbiosynthese gezeigt werden (Feingold et al. 1995). Die detaillierte Analyse entsprechender Parameter (Gamma-GT, alkalische Phosphatase, etc.) überstieg jedoch die ursprüngliche Zielstellung der vorliegenden Untersuchung und ist vom gewählten Studiendesign nicht abgedeckt. Somit sollte diese Hypothese in weiterführenden Analysen untersucht werden.

Der während des Experimentes gegebene freie Zugang der Tiere zu Standardtiernahrung könnte zudem durch exogen zugeführtes Cholesterol negativ auf die endogene Synthese gewirkt haben. Zur Elimination dieser Störgröße unterlagen die Tiere in den zitierten experimentellen Studien zur Untersuchung der Cholesterolsynthese einem Fastenregime. Zukünftige Untersuchungen sollten neben einem standardisierten Fastenregime Messungen der Enzymaktivität, der Plasmacholesterolspiegel sowie das Monitoring beeinflussender Faktoren (z.B. Cholestaseparameter) zur Komplettierung der Aussage und zum Beweis der hier abgeleiteten Hypothese mit einbeziehen.

5.2.4 Selektive protektive Wirtsantwort, Reprogrammierung oder Akut Phase Antwort

Das lückenhafte Wissen über die genauen Interaktionen der zahlreichen Erreger mit dem Wirtsimmunsystem stellt eine große Triebfeder aktueller Forschung dar. Ein wesentlicher Faktor ist das gewandelte Erregerspektrum bei Sepsis. Gram-positive Erreger werden mittlerweile für bis zu 50% aller Sepsisfälle verantwortlich gemacht. Die Pathomechanismen der Gram-positiven Sepsis sind jedoch noch weniger verstanden als jene der Gram-negativen Sepsis (Sriksandan und Cohen 1999). Die im Rahmen der experimentellen Forschung mit Endotoxin und Gram-negativen Erregern gefundenen Ergebnisse zur Pathogenese des septischen Schocks und der septischen Organschädigung können nicht ohne weiteres auf Gram-positive Erreger übertragen werden (Opal und Cohen 1999). Vielmehr weisen Gram-positive Erreger deutliche Unterschiede in der Interaktion mit dem Wirtsimmunsystem auf, was sich beispielsweise in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems über differente Komponenten des Toll-like Rezeptor Signalweges sowie der Notwendigkeit der intrazellulären Abtötung durch Makrophagen und Neutrophile widerspiegelt (Andersson et al. 1992, Hossain et al. 2006). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, wie unterschiedliche Regulationen von Signal- und Stoffwechselwegen beim Vergleich rein Gram-positiver und polymikrobieller Infektionen zu werten sind.

In der vorgelegten Arbeit zeigte sich eine nahezu gegensätzliche Regulation der Steroidbiosynthese bzw. Cholesterolsynthese der Leber bei Gram-positiver Pneumonie und polymikrobieller Peritonitis (Abbildung 10). Erklärungsversuche anhand der bisher existierenden Literatur zum Thema leiten zu mehreren Hypothesen, welche mittels geeigneter experimenteller Untersuchungen bestätigt oder verworfen werden müssen. Es ist bekannt, dass das Wirtszelltranskriptom auf Komponenten der Infektion und des Erregers reagiert (Hossain et al. 2006). Es wäre möglich, dass hierüber die differenzierte Reaktion des Transkriptoms in beiden Infektionsmodellen hervorgerufen wurde.

Unklar ist jedoch, ob die selektive Induktion der Steroidbiosynthese in der Leber bei Pneumonie einem protektiven Wirtszellmechanismus als Reaktion auf die Infektion mit *S. pneumoniae* entspricht oder ob es sich hierbei um eine „Reprogrammierung“ des Wirtszelltranskriptoms zugunsten einer verbesserten Erregervermehrung und Invasion handelt. Prinzipiell könnte die aktivierte Steroidbiosynthese auch Bestandteil der Akut-Phase Reaktion sein (Feingold et al. 1995). In diesem Fall sollte man erwarten, wie auch

von anderen Autoren beschrieben, dass diese Akut-Phase Reaktion auch bei polymikrobiellen Infektionen oder bei Gram-negativen Toxinen eintritt (Feingold et al. 1995). Dies konnte im vorliegenden Datensatz jedoch nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung könnte eine durch die Peritonitis bedingte Cholestase mit negativer Rückkopplung auf die Cholesterolsynthese sein.

Die organspezifische Expression spezieller Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* als Anpassungsmechanismus an die jeweiligen Umgebungsbedingungen ist beschrieben (Orihuela et al. 2004) und könnte zu einer jeweils differentiellen „Reprogrammierung“ des Transkriptomts betroffener Organe führen. Hierbei bleibt die Frage offen, ob diese „Reprogrammierung“ zu Wirtszell protektiven oder Erreger protektiven Effekten führt. Die meisten klinisch relevanten Pneumokokkenstämme exprimieren das Cholesterol abhängige Zytolysin Pneumolysin, welches nach Autolyse der Pneumokokken freigesetzt wird (Jedrzejewski 2001). Durch Bindung von Pneumolysin am Cholesterol der Wirtszellmembran kommt es nach porenförmiger Konformationsänderung des Pneumolysins zur Wirtszelllyse. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von freiem Cholesterol die Pneumolysin vermittelte Zelllyse unterbindet, wahrscheinlich durch Verhinderung der Porenbildung (Nollmann et al. 2004). So könnte ein erhöhter Cholesterolspiegel potentiell Organ protektive Effekte haben. Marquart et al. (2007) konnten beim Kaninchen einen schützenden Effekt der lokalen Anwendung von Cholesterol bei Pneumokokkenkeratitis zeigen (Marquart et al. 2007). Eine Induktion der Cholesterolsynthese bei Pneumokokkeninfektionen konnte durch mehrere Autoren (Fisher et al. 1971, Guckian 1973, Canonico et al. 1977) sowie in der hier vorgelegten Arbeit auf Transkriptomebene bestätigt werden. Es wäre möglich, dass eine Erhöhung des Gesamtcholesterols auch zu einem vermehrten Einbau von Cholesterol in die Zellmembranen des Wirtes führt, so dass somit auch die Bindungsstellen für Pneumolysin erhöht werden. Dies wiederum könnte zu nachteiligen Effekten für den Wirtsorganismus führen.

Die genauen Ursachen der differentiellen Regulation der Cholesterolsynthese in den untersuchten Infektionsmodellen der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie sowie der fäkalen Peritonitis bedürfen ebenso wie die pathophysiologischen Folgen dieser Regulation genauerer Untersuchungen. Hierbei wäre die Messung sowohl transkriptioneller Veränderungen als auch von Veränderungen auf Enzymebene und des Gesamtcholesterols in beiden Infektionsmodellen von großer Bedeutung. Die weiterführende histologische

Befundung der untersuchten Organe würde ebenso hilfreiche Hinweise bezüglich Organ schädigender Effekte liefern.

5.2.5 Sonderstatus der Lunge im Vergleich zur Leber

Die Homöostase der Organfunktionen ist im Sinne des Überlebens des gesamten Organismus besonders essentiell. Die Entzündungsreaktion in der Lunge muss im Sinne eines suffizienten Gasaustausches besonders streng reguliert werden (Hippenstiel et al. 2006), da bereits nach einigen Minuten insuffizienter Organfunktion ein wesentlicher Schaden für den Gesamtorganismus entstehen kann. Einerseits muss eine rasche Elimination von Erregern erfolgen. Hierzu bedarf es einer schnellen Rekrutierung von kompetenten Immunzellen. Andererseits muss eine chronische Entzündungsreaktion durch mit der Atemluft eingedrungene Fremdpartikel und Erreger sowie Toxine vermieden werden. Dies wird unter anderem über eine differentielle Expression von Mustererkennungsrezeptoren reguliert (Hippenstiel et al. 2006).

5.2.5.1 Common host response

In der vorgelegten Arbeit zeigte sich in der Lunge eine deutliche Reaktion des Transkriptom in beiden Infektionsmodellen. Hierbei erschien die Genexpression sowohl bei *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie zum Zeitpunkt 24 Stunden als auch bei polymikrobieller Peritonitis zu beiden Zeitpunkten weitgehend robust (Abbildungen 3 und 8). In der qualitativen Analyse der Einzelorgane zeigte sich für die Lunge zudem eine vermehrte Expression von Genen der *common host response* in beiden Infektionsmodellen (Abbildung 12). Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, dass die Lunge eine ausgeprägte *common host response* (Jenner und Young 2005) bei diversen infektiösen Stimuli generieren kann, wobei die erreger- und fokusspezifischen Reaktionen weniger ins Gewicht fallen. Dies könnte durch die primäre und rasche Aktivierung alveolarer Makrophagen und pulmonaler Epithelzellen durch die Erreger sowie die hierdurch ausgelöste Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten erklärt sein (Hippenstiel et al. 2006, Marriott und Dockrell 2007). Entsprechend deutet die erhöhte transkriptionelle Expression von Chemokinen in der Lunge in beiden Infektionsmodellen (Abschnitt 4.4.2.2 und Tabelle 7) auf eine vermehrte Chemotaxis neutrophiler Granulozyten sowie anderer leukozytärer Zellen in die Lunge. In einer experimentellen Untersuchung von Rosseau et al. (2007) konnte in einem murinen *S. pneumoniae* Pneumonie-Modell und einer Influenza A-induzierten Pneumonie der Maus ein

gemeinsames Gencluster, welches die Aktivierung residenter Alveolarmakrophagen anzeigte, identifiziert werden (Rosseau et al. 2007). Eine Meta-Analyse verschiedener *in vivo* Inflammationsmodelle der Lunge konnte zeigen, dass es eine generelle transkriptionelle Antwort der Lunge auf verschiedene Stimuli gibt (Pennings et al. 2008). Hierbei wurden sowohl Pathogen induzierte Entzündungsreaktionen als auch allergisch und chemische induzierte Entzündungsreaktionen bezüglich der Genexpression in der Lunge untersucht. Neben einer inflammatorischen Antwort, welche bei allen Stimuli generiert werden konnte zeigten sich auch zusätzlich spezifische Antworten auf diverse Stimuli. Die Aktivierung Interferon induzierter Gene wurde bei viralen und bakteriellen Infektionen vermehrt nachgewiesen (Rosseau et al. 2007, Pennings et al. 2008), die Zellteilung betreffende Expressionsveränderungen traten hauptsächlich bei parasitären und allergischen Modellen auf (Pennings et al. 2008). Die vermehrte Expression Interferon induzierter Gene konnte auch in der vorgelegten Arbeit für beide Infektionsmodelle bestätigt werden (Abschnitt 4.4.2.2 und 4.4.3.2).

Die Lunge stellt das im Rahmen eines septischen Organversagens am häufigsten betroffene Organ dar (Wickel et al. 1997). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten eine wesentliche Rolle sowohl bei der unspezifischen Immunabwehr als auch bei der sekundären Organschädigung bei Peritonitis spielen (Joyce et al. 1978, Hau et al. 1979, Dunn et al. 1985, Anderson et al. 1991, Wickel et al. 1997). Einwandernde neutrophile Granulozyten setzen im Rahmen ihrer Phagozytoseaktivität unter anderem Sauerstoffradikale sowie proteolytische Enzyme frei, welche das Gefäßendothel schädigen (Varani et al. 1989, Goya et al. 1994). Die Neutrophilenadhäsion am Gefäßendothel ist wesentliche Voraussetzung der Migration an den Ort der Infektion, aber auch in infektionsortferne Organe (Allison et al. 1955, Downey et al. 1995, Marcus et al. 1997b). In einem Peritonitismodell der Ratte wurde intravitalmikroskopisch die Einwanderung fluoreszenzmarkierter neutrophiler Granulozyten in Peritoneum, Lunge, Leber und Niere untersucht (Fukatsu et al. 1999). Hierbei konnte abhängig von der applizierten Bakteriendosis bereits fünf Stunden nach Applikation eine signifikante Erhöhung markierter neutrophiler Granulozyten in Lunge, Niere und Peritoneum gesehen werden. Während die Erhöhung in Peritoneum und Niere vorübergehend war, kam es zu einer persistierenden Neutrophilenadhäsion in der Lunge. Im Gegensatz hierzu konnten in diesem Modell keine signifikanten Veränderungen der Neutrophilenadhäsion in der Leber festgestellt werden. Die histologische Untersuchung ergab, dass eine Neutrophileninfiltration ins Interstitium der Lunge mit begleitender Gewebeschädigung

vorlag, während dies für die Niere und Leber nicht bestätigt werden konnte. In einer Studie von Panes et al. (Panes et al. 1995) wurde berichtet, dass die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in der Lunge unter Ausgangsbedingungen bereits höher als in anderen Organen war und zudem Endotoxin zu einer Hochregulation von ICAM-1 in der Lunge führte. In einem Modell der intra-peritonealen Faecesapplikation verschiedener Dosierungen bei Mäusen zeigte sich, dass die erhöhte Neutrophilensequestration in der Lunge abhängig von der Bakteriendosis entweder vorübergehend (niedrige Dosis) oder persistierend (hohe Dosis) auftrat (Stamme et al. 1999). Bei einem fäkalen Peritonitismodell des Schweins zeigte die Lunge im Vergleich zu Leber und Niere deutliche Schädigungen bestehend aus ausgedehnten Zonen mit pulmonaler Kollaps, Hämorrhagien und Infarzierungen (de Azevedo et al. 2007). Insofern bestätigen die in der vorgelegten Arbeit erhaltenen Resultate die bisherige und aktuelle Studienlage. Die Ergebnisse der bronchoalveolären Lavage von Kontrollmäusen sowie von Mäusen mit *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie unterstreichen diesen Sachverhalt (Tabelle 3). Daten einer bronchoalveolären Lavage der Tiere mit polymikrobieller Peritonitis liegen nicht vor, sollten jedoch in weiterführenden Untersuchungen mitanalysiert werden.

Im Gegensatz hierzu zeigte die Leber deutliche Unterschiede im Transkriptom bei polymikrobieller Peritonitis und *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie (Abbildungen 3 und 7). Hier konnte insbesondere ein Überwiegen von Akut-Phase Proteinen und Komponenten des angeborenen Immunsystems (Tabelle 8) konstatiert werden. Die Expression chemotaktisch aktiver Zytokine spielte im Vergleich zur Lunge eine eher untergeordnete Rolle (Abschnitt 4.4.3.2 und Tabelle 8). Obgleich von einigen Autoren eine maßgebliche Beteiligung neutrophiler Granulozyten am septischen Leberschaden postuliert wird (Holman und Saba 1988, Malmros et al. 1994), messen neuere Untersuchungen der Sepsis induzierten Hypoperfusion sowie direkten zytopathischen Effekten pro-inflammatorischer Mediatoren die größte Rolle beim septischen Leberschaden bei (Bohlinger et al. 1996, Derikx et al. 2007). Fukatsu et al. (1999) konnten, wie oben beschrieben zeigen, dass die Neutrophiladhäsion in der Leber in einem Peritonitismodell der Ratte keine wesentliche Rolle spielt. Die Ergebnisse der vorgelegten Untersuchung könnten somit einen Hinweis darauf liefern, dass die Neutrophiladhäsion bei der septischen Organschädigung der Leber tatsächlich eine untergeordnete Rolle im Vergleich zur septischen Organschädigung der Lunge spielt. Dies könnte aus einer reduzierten Chemotaxis neutrophiler Granulozyten in die Leber resultieren. Die Bestätigung dieser

Hypothese steht jedoch aus und die genauen Mechanismen bedürfen weiterführender Untersuchung.

5.2.5.2 *Metabolische Reaktionen im Rahmen der Sepsis*

Ein weiteres wesentliches Ergebnis der vorgelegten Arbeit zeigte eine spezifische Induktion der Steroidbiosynthese in der Leber bei *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie (Abbildung 9). Diese Daten unterstreichen das breite metabolische Repertoire der Leber im Vergleich zur Lunge. Hierdurch wird vermutlich die individuelle Reaktion der Leber auf infektiöse Stimuli beeinflusst, so dass infektionsspezifische metabolische Regulationen bei variabler *common host response* resultieren. Es scheint, als würde die Leber nicht nur „die eine Antwort auf Alles“ generieren können, sondern je nach Erreger, Fokus und Stärke des Stimulus eine individuellere Antwort generieren können als die Lunge. Ein abschließender Beweis dieser Hypothese steht jedoch aus.

Die Betrachtung der regulierten Gene in Leber und Lunge zeigte zudem einen großen Anteil negativ regulierter Gene an den insgesamt im Organ regulierten Genen. Dies traf insbesondere für die Leber bei Peritonitis zu (Abbildungen 12 und 13 sowie Abbildungen 17 und 18 im Datenanhang). Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass die regulären organspezifischen (Stoffwechsel)Prozesse zugunsten der spezifischen Prozesse einer lokalen und/oder systemischen Entzündungsreaktion herabreguliert werden. Der je nach betrachteter Kondition vergleichsweise geringere Anteil herabregulierter Gene in der Lunge könnte hierbei die sehr eng spezialisierte Funktion der Lunge unterstreichen. Im Gegenschluss würde somit der hohe Anteil herabregulierter Gene in der Leber möglicherweise die breite metabolische Grundleistung des Organs bestätigen können, welche nun potenziell im Rahmen der Entzündungsreaktion zugunsten spezifischer transkriptioneller Programme gestoppt bzw. auf ein Mindestmaß reduziert wurde. Allerdings lässt die Beurteilung der Anzahl positiv oder negativ regulierter Gene alleine keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Ursachen dieser differentiellen Regulation zu. Auch hier bedarf es weiterer Untersuchungen. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls zu betonen, dass die Leber eine wesentliche Rolle bei der Neutralisation potentiell schädigender endogener (Chemokine, pro-inflammatorische Zytokine) und exogener Noxen (bakterielle Toxine und Komponenten, lebende Bakterien) spielt (Mathison und Ulevitch 1979, Katz et al. 1991). Sowohl der ausgedehnte Pool an Kupffer-Zellen (entsprechend 70% der Gesamtmakrophagenpopulation) als auch die metabolisch pluri-potenten Hepatozyten tragen durch Detoxifikation zu einer Organprotektion lokal und

systemisch bei (Andus et al. 1991). Allerdings kann dieser Effekt bei Überschreiten der Kapazität des Organs zu einer Potenzierung schädigender Effekte führen (Dhainaut et al. 2001). Entsprechend ist eine endgültige Bewertung selektiv aktivierter Stoffwechsel- und Signalwege (z.B. Steroidbiosynthese) im Organ Leber als wirtsprotektiv oder erregerpermissiv erst nach weiterer gezielter Untersuchung der jeweiligen Fragestellung möglich. Inwieweit der Pool ortsansässiger organspezifischer Makrophagen Einfluss auf die differentielle Regulation der Genexpression bei Sepsis unterschiedlicher Ursache nimmt sollte insbesondere im Hinblick auf die Organe Leber und Lunge genauer untersucht werden.

Nach kritischer Reflexion der Ergebnisse sowie Einbindung in die zum Thema vorliegende Literatur wäre anzunehmen, dass die Lunge aufgrund einer weitgehend robusten Reaktionsweise des Transkriptoms im Sinne einer *common host response* konsistent in lokale und systemische Entzündungsprozesse einbezogen wird. Dies wäre zwecks rascher Erregerelimination sinnvoll, kann jedoch bei überschießender Reaktion zu ausgedehntem Schaden der fragilen Alveolenstruktur und des Kapillarnetzes des Organs führen. Im Gegensatz hierzu präsentiert sich die Leber durch eine variabelere Antwort auf infektiöse Stimuli, welche zudem von einer möglicherweise spezifischen Regulation von Stoffwechselprozessen begleitet wird.

6 Schlussfolgerungen

In der vorgelegten Arbeit wurden mithilfe eines *Microarray* basierten, systembiologischen Ansatzes die Transkriptionsmuster von Leber, Lunge, Milz und Blut zweier muriner Sepsismodelle dargestellt. In Leber, Milz und Blut zeigten sich jeweils deutliche Unterschiede der Genexpression in der hierarchischen Clusteranalyse für die polymikrobielle Peritonitis und die *S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie.

Auch innerhalb der experimentellen Gruppe der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie zeigten die Organe Leber, Milz und Blut jeweils abweichende Transkriptionsmuster. Hierbei könnte die im Verlauf der Pneumonie getriggerte systemische Entzündungsreaktion abhängig vom Mikromilieu der jeweiligen Organe unterschiedliche Transkriptionsmuster hervorgerufen haben. Diese Veränderungen des Wirtstranskriptoms könnten auch durch eine vom jeweiligen Mikromilieu beeinflusste, veränderte Expression von Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren der Erreger hervorgerufen worden sein. Bei der polymikrobiellen Peritonitis konnte eine synchrone systemische Reaktion aller untersuchten Organe auf Transkriptomebene nachgewiesen werden. Hierbei könnte der polymikrobielle Charakter der Infektion zu einer Überlagerung der jeweiligen erregerspezifischen Wirtszelltranskriptome geführt haben im Sinne einer ausgedehnten *common host response*. Weiteren Aufschluss könnten beispielsweise vergleichende Experimente einer Peritonitis und Pneumonie mit identischen Erregerspezies liefern.

Für die Lunge ergaben sich keine infektionsspezifischen Expressionsveränderungen, sondern es präsentierte sich ein weitgehend robustes Expressionsmuster für beide Infektionsmodelle. Dieses ließ sich in der Einzelorgananalyse als ausgeprägte *common host response* im Sinne einer generellen Alarmreaktion des Organs auf infektiöse Stimuli identifizieren. Hierbei waren wesentliche Bestandteile des angeborenen Immunsystems auf Transkriptomebene exprimiert. Es fiel auf, dass besonders Komponenten der Chemokin-Chemokin-Rezeptor Interaktion in großer Zahl exprimiert wurden. Diese Ergebnisse reihen sich in Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen ein, welche die wesentliche Rolle neutrophiler Granulozyten bei der unspezifischen Immunabwehr der Lunge sowie der sekundären Lungenschädigung bei Peritonitis belegen konnten. Die pathophysiologische Sequenz der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie im Mausmodell beinhaltet ebenfalls die sequentielle Chemotaxis neutrophiler Granulozyten sowie mononukleärer Zellen in die Lunge. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit liefern weitere

Bausteine, warum die Lunge das im Rahmen eines septischen Organversagens am häufigsten betroffene Organ darstellen könnte.

Die Analyse der im Rahmen der Sepsis unterschiedlicher Genese regulierten Signal- und Stoffwechselwege der Organe Leber, Lunge, Milz und Blut zeigte wesentliche Komponenten der Immunantwort (Komplement- und Gerinnungssystem, Regulation des Aktinzytoskeletts) sowie des Zellmetabolismus und Energiestoffwechsels (Zellzyklus, DNA-Replikation, Ribosom, Proteasom, oxidative Phosphorylierung, Steroidbiosynthese) als signifikant koexprimiert. Diese stellen sowohl mögliche Komponenten eines „Wirtszell-Überlebens- und Schutzprogrammes“ als auch der Pathogen induzierten Immunantwort dar. Zudem scheinen sie maßgeblich an der pathophysiologischen Sequenz der Sepsis unterschiedlicher Ursache beteiligt zu sein und reflektieren sowohl den zellulären Stress als auch die systemischen Reaktionen der Entzündung.

In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls eine spezifische Hochregulation der Steroidbiosynthese auf Transkriptomebene im Organ Leber bei *S. pneumoniae*-induzierter Pneumonie dargestellt werden. Dieses Ergebnis könnte auf mögliche spezifische metabolische Reaktionsmuster der Leber im Rahmen der Immunantwort hindeuten. Hierdurch würde die zentrale Rolle der Leber als im Rahmen der Sepsis nicht nur reagierendes, sondern auch agierendes Organ untermauert. Die Lunge scheint zum Erhalt der funktionellen Homöostase des Organs mehr als die Leber im Sinne einer raschen „generellen Alarmreaktion“ auf diverse infektiöse Stimuli zu reagieren.

Zusammenfassend konnten mit der vorgelegten, Hypothesen generierenden Arbeit weitere Bausteine und Hypothesen zur komplexen pathophysiologischen Sequenz der Sepsis sowie der septischen Organschädigung geliefert werden. Durch die „niedrige Auflösung“ der angewandten Analyse des *Microarray* generierten Datensatzes konnten die systembiologischen Zusammenhänge bei Sepsis unterschiedlicher Genese dargestellt werden. Für die Organe Lunge und Leber wurden Reaktionsmechanismen erkannt und somit weitere Hinweise für die unterschiedlichen molekularen Mechanismen der Entzündungsreaktion einzelner Organe geliefert. Weitere Analysen auf Einzelgenniveau sowie Protein- und Substanzniveau sollten diese Arbeit im Sinne einer Fokussierung auf einzelne potentielle pathogenetische Mechanismen ergänzen.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham E, Arcaroli J, Shenkar R. 2001. Activation of extracellular signal-regulated kinases, NF-kappa B, and cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding protein in lung neutrophils occurs by differing mechanisms after hemorrhage or endotoxemia. *J Immunol*, 166 (1):522-530.
- Aderem A, Ulevitch RJ. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406 (6797):782-787.
- Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4 (7):499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124 (4):783-801.
- Allison F, Jr., Smith MR, Wood WB, Jr. 1955. Studies on the pathogenesis of acute inflammation. I. The inflammatory reaction to thermal injury as observed in the rabbit ear chamber. *J Exp Med*, 102 (6):655-668.
- Alvarez C, Ramos A. 1986. Lipids, lipoproteins, and apoproteins in serum during infection. *Clin Chem*, 32 (1 Pt 1):142-145.
- Anderson BO, Brown JM, Harken AH. 1991. Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury. *J Surg Res*, 51 (2):170-179.
- Andersson J, Nagy S, Bjork L, Abrams J, Holm S, Andersson U. 1992. Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. *Immunol Rev*, 127:69-96.
- Andonegui G, Goring K, Liu D, McCafferty DM, Winston BW. 2008. Characterization of S. Pneumoniae Pneumonia-Induced Multiple Organ Dysfunction Syndrome; an Experimental Mouse Model of Gram-Positive Sepsis. *Shock*,
- Andus T, Bauer J, Gerok W. 1991. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology*, 13 (2):364-375.
- Angus DC, Marrie TJ, Obrosky DS, Clermont G, Dremsizov TT, Coley C, Fine MJ, Singer DE, Kapoor WN. 2002. Severe community-acquired pneumonia: use of intensive care services and evaluation of American and British Thoracic Society Diagnostic criteria. *Am J Respir Crit Care Med*, 166 (5):717-723.
- Aoki K, Kanehisa M. 2005. Using the KEGG database resource. *Curr Protoc Bioinformatics* Oct;Chapter 1:Unit 1.12.
- Arend WP, Guthridge CJ. 2000. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis*, 59 Suppl 1:i60-64.
- Ayala A, Chung CS, Lomas JL, Song GY, Doughty LA, Gregory SH, Cioffi WG, LeBlanc BW, Reichner J, Simms HH, Grutkoski PS. 2002. Shock-induced neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice: divergent effects of TLR-4 and TLR-4/FasL deficiency. *Am J Pathol*, 161 (6):2283-2294.
- Baggiolini M. 2001. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*, 250 (2):91-104.
- Balachandran P, Hollingshead SK, Paton JC, Briles DE. 2001. The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *J Bacteriol*, 183 (10):3108-3116.

- Bals R, Hiemstra PS. 2004. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*, 23 (2):327-333.
- Bankey P, Cerra F. 1992. Hepatic dysfunction in shock and organ failure. In: Schlag G, Redl H (Eds) *Pathophysiology of Shock, Sepsis and Organ failure* Berlin: Springer Verlag, :948-960.
- Baratta JL, Ngo A, Lopez B, Kasabwalla N, Longmuir KJ, Robertson RT. 2009. Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochem Cell Biol*,
- Barie PS, Hydo LJ, Fischer E. 1996. Development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill patients with perforated viscus. Predictive value of APACHE severity scoring. *Arch Surg*, 131 (1):37-43.
- Bauer M, Reinhart K. 2004. Ätiologie und Diagnostik des septischen Organversagens. *Intensivmed*, 41: (465-475.)
- Bauer M, Paxian M, Kortgen A. 2004. [Acute liver failure. Current aspects of diagnosis and therapy]. *Anaesthesist*, 53 (6):511-530.
- Beal AL, Cerra FB. 1994. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *Jama*, 271 (3):226-233.
- Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH. 2000. CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem*, 275 (38):29731-29736.
- Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers AM, Simard M, Olivier M, Bergeron MG. 1998. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun*, 66 (3):912-922.
- Beutler B, Cerami A. 1989. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*, 7:625-655.
- Beutler B. 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 430 (6996):257-263.
- Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. 1984. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med*, 160 (2):618-623.
- Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. 1986. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (12):4533-4537.
- Bianchi ME. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, 81 (1):1-5.
- Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P. 2005. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Curr Opin Pulm Med*, 11 (1):35-42.
- Blanco J, Muriel-Bombin A, Sagredo V, Taboada F, Gandia F, Tamayo L, Collado J, Garcia-Labattut A, Carriedo D, Valledor M, De Frutos M, Lopez MJ, Caballero A, Guerra J, Alvarez B, Mayo A, Villar J. 2008. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care*, 12 (6):R158.

- Blenkharn JJ, Blumgart LH. 1986. The isolation of *Streptococcus pneumoniae* from bile. *J Infect*, 12 (2):175-178.
- Bohlinger I, Leist M, Gantner F, Angermuller S, Tiegs G, Wendel A. 1996. DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am J Pathol*, 149 (4):1381-1393.
- Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. 1997. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*, 112 (1):235-243.
- Bonville DA, Parker TS, Levine DM, Gordon BR, Hydo LJ, Eachempati SR, Barie PS. 2004. The relationships of hypocholesterolemia to cytokine concentrations and mortality in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Surg Infect (Larchmt)*, 5 (1):39-49.
- Borish LC, Steinke JW. 2003. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*, 111 (2 Suppl):S460-475.
- Borkowski AJ, Levin S, Delcroix C, Mahler A, Verhas V. 1967. Blood cholesterol and hydrocortisone production in man: quantitative aspects of the utilization of circulating cholesterol by the adrenals at rest and under adrenocorticotropin stimulation. *J Clin Invest*, 46 (5):797-811.
- Brook I. 2008. Microbiology and management of abdominal infections. *Dig Dis Sci*, 53 (10):2585-2591.
- Brun P, Castagliuolo I, Pinzani M, Palu G, Martines D. 2005. Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289 (3):G571-578.
- Budd D, Ginsberg H. 1986. Hypocholesterolemia and acute myelogenous leukemia. Association between disease activity and plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. *Cancer*, 58 (6):1361-1365.
- Butcher EC. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67 (6):1033-1036.
- Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, Chen RO, Brownstein BH, Cobb JP, Tschoeke SK, Miller-Graziano C, Moldawer LL, Mindrinos MN, Davis RW, Tompkins RG, Lowry SF. 2005. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*, 437 (7061):1032-1037.
- Canonica PG, Ayala E, Rill WL, Little JS. 1977. Effects of pneumococcal infection on rat liver microsomal enzymes and lipogenesis by isolated hepatocytes. *Am J Clin Nutr*, 30 (8):1359-1363.
- Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. 2000. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol*, 164 (2):966-972.
- Castranova V, Rabovsky J, Tucker JH, Miles PR. 1988. The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol Appl Pharmacol*, 93 (3):472-483.
- Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. 2005. Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res*, 11 (5):311-320.
- Cavaillon JM, Annane D. 2006. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res*, 12 (3):151-170.

- Cerra FB, Siegel JH, Border JR, Wiles J, McMenamy RR. 1979. The hepatic failure of sepsis: cellular versus substrate. *Surgery*, 86 (3):409-422.
- Cerra FB. 1987. Hypermetabolism, organ failure, and metabolic support. *Surgery*, 101 (1):1-14.
- Chaudhuri N, Dower SK, Whyte MK, Sabroe I. 2005. Toll-like receptors and chronic lung disease. *Clin Sci (Lond)*, 109 (2):125-133.
- Chen YX, Sato M, Abe Y, Kito K, Watanabe Y, Tokui K, Kashu Y, Yamamoto T, Kohtani T, Nakata Y, Kawachi K. 2000. Protective effect of an antineutrophil antibody, Urge-8, on liver ischemia-reperfusion injury in a new hepatic ischemia model. *Transplant Proc*, 32 (7):2318-2319.
- Chen YX, Sato M, Kawachi K, Abe Y. 2006. Neutrophil-mediated liver injury during hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 5 (3):436-442.
- Chenaud C, Merlani PG, Roux-Lombard P, Burger D, Harbarth S, Luyasu S, Graf JD, Dayer JM, Ricou B. 2004. Low apolipoprotein A-I level at intensive care unit admission and systemic inflammatory response syndrome exacerbation. *Crit Care Med*, 32 (3):632-637.
- Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH, Boldrini G, Coleman WP, Castagneto M. 1990. Relationship of plasma cholesterol level to doses of branch-chain amino acids in sepsis. *Crit Care Med*, 18 (1):32-36.
- Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH, Boldrini G, Castagneto M. 2000. The relationship between plasma taurine and other amino acid levels in human sepsis. *J Nutr*, 130 (9):2222-2227.
- Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH. 2004. The relationship between plasma cholesterol, amino acids and acute phase proteins in sepsis. *Amino Acids*, 27 (1):97-100.
- Chinnaiyan AM, Huber-Lang M, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Shankar-Sinha S, Sarma VJ, Padgaonkar VA, Ward PA. 2001. Molecular signatures of sepsis: multiorgan gene expression profiles of systemic inflammation. *Am J Pathol*, 159 (4):1199-1209.
- Cicchetti G, Allen PG, Glogauer M. 2002. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13 (3):220-228.
- Cobb JP, Laramie JM, Stormo GD, Morrissey JJ, Shannon WD, Qiu Y, Karl IE, Buchman TG, Hotchkiss RS. 2002. Sepsis gene expression profiling: murine splenic compared with hepatic responses determined by using complementary DNA microarrays. *Crit Care Med*, 30 (12):2711-2721.
- Cohen AB, Rossi M. 1983. Neutrophils in normal lungs. *Am Rev Respir Dis*, 127 (2):S3-9.
- Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420 (6917):885-891.
- Coldren CD, Nick JA, Poch KR, Woolum MD, Fouty BW, O'Brien JM, Gruber MP, Zamora MR, Svetkauskaite D, Richter DA, He Q, Park JS, Overdier KH, Abraham E, Geraci MW. 2006. Functional and genomic changes induced by alveolar transmigration in human neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291 (6):L1267-1276.
- Coombes EJ, Shakespeare PG, Batstone GF. 1980. Lipoprotein changes after burn injury in man. *J Trauma*, 20 (11):971-975.

- Dahl AR, Lewis JL. 1993. Respiratory tract uptake of inhalants and metabolism of xenobiotics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 33:383-407.
- Dahlmann B. 2007. Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem*, 8 Suppl 1:S3.
- de Azevedo LC, Park M, Noritomi DT, Maciel AT, Brunialti MK, Salomao R. 2007. Characterization of an animal model of severe sepsis associated with respiratory dysfunction. *Clinics*, 62 (4):491-498.
- de Chalain TM, Bracher M, Linley W, Gerneke D, Hickman R. 1994. Cytoskeletal actin: the influence of major burns on neutrophil structure and function. *Burns*, 20 (5):416-421.
- de Vasconcelos PR, Kettlewell MG, Gibbons GF, Williamson DH. 1989. Increased rates of hepatic cholesterogenesis and fatty acid synthesis in septic rats in vivo: evidence for the possible involvement of insulin. *Clin Sci (Lond)*, 76 (2):205-211.
- Deitch EA, Bridges W, Berg R, Specian RD, Granger DN. 1990. Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation: the role of neutrophils and hydroxyl radicals. *J Trauma*, 30 (8):942-951; discussion 951-942.
- Deitch EA, Specian RD, Berg RD. 1991. Endotoxin-induced bacterial translocation and mucosal permeability: role of xanthine oxidase, complement activation, and macrophage products. *Crit Care Med*, 19 (6):785-791.
- Deitch EA. 1992. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg*, 216 (2):117-134.
- Deitch EA, Xu D, Kaise VL. 2006. Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci*, 11:520-528.
- Derikx JP, Poeze M, van Bijnen AA, Buurman WA, Heineman E. 2007. Evidence for intestinal and liver epithelial cell injury in the early phase of sepsis. *Shock*, 28 (5):544-548.
- Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. 2001. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med*, 29 (7 Suppl):S42-47.
- Dinarello CA. 1998. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci*, 856:1-11.
- Dockrell DH, Marriott HM, Prince LR, Ridger VC, Ince PG, Hellewell PG, Whyte MK. 2003. Alveolar macrophage apoptosis contributes to pneumococcal clearance in a resolving model of pulmonary infection. *J Immunol*, 171 (10):5380-5388.
- Doig CJ, Sutherland LR, Sandham JD, Fick GH, Verhoef M, Meddings JB. 1998. Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 158 (2):444-451.
- Downey GP, Fialkow L, Fukushima T. 1995. Initial interaction of leukocytes within the microvasculature: deformability, adhesion, and transmigration. *New Horiz*, 3 (2):219-228.
- Dremsizov T, Clermont G, Kellum JA, Kalassian KG, Fine MJ, Angus DC. 2006. Severe sepsis in community-acquired pneumonia: when does it happen, and do systemic inflammatory response syndrome criteria help predict course? *Chest*, 129 (4):968-978.

- Dunham CM, Fealk MH, Sever WE, 3rd. 2003. Following severe injury, hypocholesterolemia improves with convalescence but persists with organ failure or onset of infection. *Crit Care*, 7 (6):R145-153.
- Dunn DL, Barke RA, Knight NB, Humphrey EW, Simmons RL. 1985. Role of resident macrophages, peripheral neutrophils, and translymphatic absorption in bacterial clearance from the peritoneal cavity. *Infect Immun*, 49 (2):257-264.
- Duran-Reynals F. 1933. Studies on a certain spreading factor existing in bacteria and its significance for bacterial invasiveness. . *J Exp Med* 58: :161-181. .
- Dyson A, Singer M. 2009. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med*, 37 (1 Suppl):S30-37.
- Eichler GS, Huang S, Ingber DE. 2003. Gene Expression Dynamics Inspector (GEDI): for integrative analysis of expression profiles. *Bioinformatics*, 19 (17):2321-2322.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (25):14863-14868.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33 (4):606-618.
- Esmon CT. 1995. Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *Faseb J*, 9 (10):946-955.
- Ettinger WH, Varma VK, Sorci-Thomas M, Parks JS, Sigmon RC, Smith TK, Verdery RB. 1994. Cytokines decrease apolipoprotein accumulation in medium from Hep G2 cells. *Arterioscler Thromb*, 14 (1):8-13.
- Ewig S, Torres A. 2002. Severe community-acquired pneumonia. *Curr Opin Crit Care*, 8 (5):453-460.
- Farthmann EH, Schoffel U. 1998. Epidemiology and pathophysiology of intraabdominal infections (IAI). *Infection*, 26 (5):329-334.
- Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O, Arditi M. 2001. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol*, 166 (3):2018-2024.
- Feezor RJ, Oberholzer C, Baker HV, Novick D, Rubinstein M, Moldawer LL, Pribble J, Souza S, Dinarello CA, Ertel W, Oberholzer A. 2003. Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infect Immun*, 71 (10):5803-5813.
- Feingold KR, Hardardottir I, Memon R, Krul EJ, Moser AH, Taylor JM, Grunfeld C. 1993. Effect of endotoxin on cholesterol biosynthesis and distribution in serum lipoproteins in Syrian hamsters. *J Lipid Res*, 34 (12):2147-2158.
- Feingold KR, Pollock AS, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C. 1995. Discordant regulation of proteins of cholesterol metabolism during the acute phase response. *J Lipid Res*, 36 (7):1474-1482.
- Fink MP, Delude RL. 2005. Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level. *Crit Care Clin*, 21 (2):177-196.

- Fischer E, Van Zee KJ, Marano MA, Rock CS, Kenney JS, Poutsiaika DD, Dinarello CA, Lowry SF, Moldawer LL. 1992. Interleukin-1 receptor antagonist circulates in experimental inflammation and in human disease. *Blood*, 79 (9):2196-2200.
- Fisher RH, Denniston JC, Rindsing RB, Beisel WR. 1971. Effects of acute infection on cholesterogenesis in the rhesus monkey. *Proc Soc Exp Biol Med*, 138:605-609.
- Fong YM, Marano MA, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Kenney JS, Allison AC, Cerami A, Shires GT, Lowry SF. 1990. The acute splanchnic and peripheral tissue metabolic response to endotoxin in humans. *J Clin Invest*, 85 (6):1896-1904.
- Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. 2007. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*, 447 (7147):972-978.
- Fraunberger P, Pilz G, Cremer P, Werdan K, Walli AK. 1998. Association of serum tumor necrosis factor levels with decrease of cholesterol during septic shock. *Shock*, 10 (5):359-363.
- Fraunberger P, Schaefer S, Werdan K, Walli AK, Seidel D. 1999. Reduction of circulating cholesterol and apolipoprotein levels during sepsis. *Clin Chem Lab Med*, 37 (3):357-362.
- Freudenberg MA, Bog-Hansen TC, Back U, Galanos C. 1980. Interaction of lipopolysaccharides with plasma high-density lipoprotein in rats. *Infect Immun*, 28 (2):373-380.
- Freudenberg MA, Galanos C. 1991. Tumor necrosis factor alpha mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in D-galactosamine-treated mice. *Infect Immun*, 59 (6):2110-2115.
- Friedman SL. 2008. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*, 88 (1):125-172.
- Fukatsu K, Saito H, Han I, Inoue T, Furukawa S, Matsuda T, Ikeda S, Yasuhara H, Muto T. 1999. Concomitant increase in neutrophil adhesion to inflammatory peritoneum and remote organs during peritonitis. *J Surg Res*, 81 (2):156-163.
- Ganz T. 2002. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest*, 109 (6):693-697.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*, 5 (10):R80.
- Giovannini I, Boldrini G, Chiarla C, Giuliante F, Vellone M, Nuzzo G. 1999. Pathophysiologic correlates of hypocholesterolemia in critically ill surgical patients. *Intensive Care Med*, 25 (7):748-751.
- Giovannini I, Chiarla C, Giuliante F, Vellone M, Ardito F, Nuzzo G. 2006. The relationship between albumin, other plasma proteins and variables, and age in the acute phase response after liver resection in man. *Amino Acids*, 31 (4):463-469.
- Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Suter P, Gallati H, Dayer JM. 1992. Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. The J5 Study Group. *Immunology*, 76 (1):20-23.
- Glass WG, Rosenberg HF, Murphy PM. 2003. Chemokine regulation of inflammation during acute viral infection. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3 (6):467-473.

- Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Saal SD, Wang JC, Sloan BJ, Barie PS, Rubin AL. 1996. Low lipid concentrations in critical illness: implications for preventing and treating endotoxemia. *Crit Care Med*, 24 (4):584-589.
- Gordon SB, Irving GR, Lawson RA, Lee ME, Read RC. 2000. Intracellular trafficking and killing of *Streptococcus pneumoniae* by human alveolar macrophages are influenced by opsonins. *Infect Immun*, 68 (4):2286-2293.
- Gordon BR, Parker TS, Levine DM, Saal SD, Wang JC, Sloan BJ, Barie PS, Rubin AL. 2001. Relationship of hypolipidemia to cytokine concentrations and outcomes in critically ill surgical patients. *Crit Care Med*, 29 (8):1563-1568.
- Gordon SB, Read RC. 2002. Macrophage defences against respiratory tract infections. *Br Med Bull*, 61:45-61.
- Goya T, Morisaki T, Torisu M. 1994. Immunologic assessment of host defense impairment in patients with septic multiple organ failure: relationship between complement activation and changes in neutrophil function. *Surgery*, 115 (2):145-155.
- Groopman JE, Molina JM, Scadden DT. 1989. Hematopoietic growth factors. Biology and clinical applications. *N Engl J Med*, 321 (21):1449-1459.
- Guckian JC. 1973. Role of metabolism in pathogenesis of bacteremia due to *Diplococcus pneumoniae* in rabbits. *J Infect Dis*, 127 (1):1-8.
- Guo Y, Eichler GS, Feng Y, Ingber DE, Huang S. 2006. Towards a holistic, yet gene-centered analysis of gene expression profiles: a case study of human lung cancers. *J Biomed Biotechnol*, 2006 (5):69141.
- Han DW. 2002. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol*, 8 (6):961-965.
- Hardardottir I, Moser AH, Memon R, Grunfeld C, Feingold KR. 1994. Effects of TNF, IL-1, and the combination of both cytokines on cholesterol metabolism in Syrian hamsters. *Lymphokine Cytokine Res*, 13 (3):161-166.
- Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Read TE, Kane JP, Jones AL, Eichbaum EB, Bland GF, Rapp JH. 1993. Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. *J Clin Invest*, 91 (3):1028-1034.
- Hastie T, Tibshirani R, Eisen MB, Alizadeh A, Levy R, Staudt L, Chan WC, Botstein D, Brown P. 2000. 'Gene shaving' as a method for identifying distinct sets of genes with similar expression patterns. *Genome Biol*, 1 (2):RESEARCH0003.
- Hau T, Ahrenholz DH, Simmons RL. 1979. Secondary bacterial peritonitis: the biologic basis of treatment. *Curr Probl Surg*, 16 (10):1-65.
- Heppleston AG. 1991. The role of surfactant in the pulmonary reaction to mineral particles. *Int J Exp Pathol*, 72 (5):599-616.
- Herzog EL, Brody AR, Colby TV, Mason R, Williams MC. 2008. Knowns and unknowns of the alveolus. *Proc Am Thorac Soc*, 5 (7):778-782.
- Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttorp N. 2006. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir Res*, 7:97.
- Hoebe K, Janssen E, Beutler B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, 5 (10):971-974.

- Hollingsworth JW, Whitehead G, Berman KG, Tekippe EM, Gilmour MI, Larkin JE, Quackenbush J, Schwartz DA. 2007. Genetic basis of murine antibacterial defense to streptococcal lung infection. *Immunogenetics*, 59 (9):713-724.
- Holman JM, Jr., Saba TM. 1988. Hepatocyte injury during post-operative sepsis: activated neutrophils as potential mediators. *J Leukoc Biol*, 43 (3):193-203.
- Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL. 2003. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (21):12027-12032.
- Hossain H, Tchatalbachev S, Chakraborty T. 2006. Host gene expression profiling in pathogen-host interactions. *Curr Opin Immunol*, 18 (4):422-429.
- Hostetter MK. 1986. Serotypic variations among virulent pneumococci in deposition and degradation of covalently bound C3b: implications for phagocytosis and antibody production. *J Infect Dis*, 153 (4):682-693.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 4 (1):44-57.
- Huang S. 2001. Genomics, complexity and drug discovery: insights from Boolean network models of cellular regulation. *Pharmacogenomics*, 2 (3):203-222.
- Huang S, Eichler G, Bar-Yam Y, Ingber DE. 2005. Cell fates as high-dimensional attractor states of a complex gene regulatory network. *Phys Rev Lett*, 94 (12):128701.
- Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A, Vingron M. 2002. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics*, 18 Suppl 1:S96-104.
- Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A, Vingron M. 2003. Parameter estimation for the calibration and variance stabilization of microarray data. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2:Article3.
- Ihrcke NS, Wrenshall LE, Lindman BJ, Platt JL. 1993. Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunol Today*, 14 (10):500-505.
- Iskit AB, Guc O. 2003. Effects of endothelin and nitric oxide on organ injury, mesenteric ischemia, and survival in experimental models of septic shock. *Acta Pharmacol Sin*, 24 (10):953-957.
- Iversen N, Sandset PM, Abildgaard U, Torjesen PA. 1996. Binding of tissue factor pathway inhibitor to cultured endothelial cells-influence of glycosaminoglycans. *Thromb Res*, 84 (4):267-278.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20:197-216.
- Jedrzejewski MJ. 2001. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65 (2):187-207 ; first page, table of contents.
- Jenner RG, Young RA. 2005. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat Rev Microbiol*, 3 (4):281-294.
- Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, Huber M, Kalis C, Keck S, Galanos C, Freudenberg M, Beutler B. 2005. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol*, 6 (6):565-570.

- Johnston RB, Jr. 1991. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev Infect Dis*, 13 Suppl 6:S509-517.
- Joiner KA, Brown EJ, Frank MM. 1984. Complement and bacteria: chemistry and biology in host defense. *Annu Rev Immunol*, 2:461-491.
- Jonsson S, Musher DM, Chapman A, Goree A, Lawrence EC. 1985. Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. *J Infect Dis*, 152 (1):4-13.
- Joyce LD, Hau T, Hoffman R, Simmons RL, Lillehei RC. 1978. Evaluation of the mechanism of zymosan-induced resistance to experimental peritonitis. *Surgery*, 83 (6):717-725.
- Kacharina JE, Crino PB, Eberwine J. 1999. Preparation of cDNA from single cells and subcellular regions. *Methods Enzymol*, 303:3-18.
- Kalin M. 1998. Pneumococcal serotypes and their clinical relevance. *Thorax*, 53 (3):159-162.
- Kanehisa M. 2002. The KEGG database. *Novartis Found Symp*, 247:91-101; discussion 101-103, 119-128, 244-152.
- Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KF, Itoh M, Kawashima S, Katayama T, Araki M, Hirakawa M. 2006. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res*, 34 (Database issue):D354-357.
- Kaplan V, Angus DC, Griffin MF, Clermont G, Scott Watson R, Linde-Zwirble WT. 2002. Hospitalized community-acquired pneumonia in the elderly: age- and sex-related patterns of care and outcome in the United States. *Am J Respir Crit Care Med*, 165 (6):766-772.
- Katz S, Jimenez MA, Lehmkuhler WE, Grosfeld JL. 1991. Liver bacterial clearance following hepatic artery ligation and portacaval shunt. *J Surg Res*, 51 (3):267-270.
- Kim CH. 2004. Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 4 (4):343-361.
- Kmiec Z. 2001. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 161:III-XIII, 1-151.
- Knowles MR, Boucher RC. 2002. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*, 109 (5):571-577.
- Kohonen T, Hrsg. 2000. Self-organizing maps. *Springer Series in Information Sciences*. Dritte Aufl. Berlin: Springer Verlag.
- Koperna T, Schulz F. 1996. Prognosis and treatment of peritonitis. Do we need new scoring systems? *Arch Surg*, 131 (2):180-186.
- Kox WJ, Bone RC, Krausch D, Docke WD, Kox SN, Wauer H, Egerer K, Querner S, Asadullah K, von Baehr R, Volk HD. 1997. Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch Intern Med*, 157 (4):389-393.
- Krivan HC, Roberts DD, Ginsburg V. 1988. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (16):6157-6161.
- Kuba K, Imai Y, Penninger JM. 2006. Angiotensin-converting enzyme 2 in lung diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 6 (3):271-276.

- Lanza-Jacoby S, Tabares A. 1990. Triglyceride kinetics, tissue lipoprotein lipase, and liver lipogenesis in septic rats. *Am J Physiol*, 258 (4 Pt 1):E678-685.
- Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME, Babior BM, Curnutte JT. 1988. Neutrophils and host defense. *Ann Intern Med*, 109 (2):127-142.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86 (6):973-983.
- Leroy O, Santre C, Beuscart C, Georges H, Guery B, Jacquier JM, Beaucaire G. 1995. A five-year study of severe community-acquired pneumonia with emphasis on prognosis in patients admitted to an intensive care unit. *Intensive Care Med*, 21 (1):24-31.
- Levi M, van der Poll T. 2004. Coagulation in sepsis: all bugs bite equally. *Crit Care*, 8 (2):99-100.
- Levi M, Opal SM. 2006. Coagulation abnormalities in critically ill patients. *Crit Care*, 10 (4):222.
- Levine DM, Parker TS, Donnelly TM, Walsh A, Rubin AL. 1993. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (24):12040-12044.
- Ley K. 2002. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol Rev*, 186:8-18.
- Ley K. 2003. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med*, 9 (6):263-268.
- Li J, Billiar TR. 1999. Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol*, 276 (5 Pt 1):G1069-1073.
- Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*, 5 (6):446-458.
- Lopez-Martinez J, Sanchez-Castilla M, Garcia-de-Lorenzo A. 2000. Hypocholesterolemia in critically ill patients. *Intensive Care Med*, 26 (2):259-260.
- Lorenz W, Reimund KP, Weitzel F, Celik I, Kurnatowski M, Schneider C, Mannheim W, Heiske A, Neumann K, Sitter H, et al. 1994. Granulocyte colony-stimulating factor prophylaxis before operation protects against lethal consequences of postoperative peritonitis. *Surgery*, 116 (5):925-934.
- Malmros C, Holst E, Hansson L, Martensson L, Thorne J. 1994. Dynamic accumulation of neutrophils in lungs and visceral organs during early abdominal sepsis in the pig. *World J Surg*, 18 (6):811-816; discussion 816-817.
- Marchant A, Deviere J, Byl B, De Groote D, Vincent JL, Goldman M. 1994. Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet*, 343 (8899):707-708.
- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, Hajjar KA, Posnett DN, Schoenborn MA, Schooley KA, Gayle RB, Maliszewski CR. 1997a. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest*, 99 (6):1351-1360.
- Marcus BC, Hynes KL, Gewertz BL. 1997b. Loss of endothelial barrier function requires neutrophil adhesion. *Surgery*, 122 (2):420-426; discussion 426-427.

- Marie C, Cavaillon JM, Losser MR. 1996. Elevated levels of circulating transforming growth factor-beta 1 in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*, 125 (6):520-521.
- Marik PE, Zaloga GP. 2003. Adrenal insufficiency during septic shock. *Crit Care Med*, 31 (1):141-145.
- Marik PE. 2004. Adrenal insufficiency: the link between low apolipoprotein A-I levels and poor outcome in the critically ill? *Crit Care Med*, 32 (9):1977-1978; author reply 1978-1979.
- Marquart ME, Monds KS, McCormick CC, Dixon SN, Sanders ME, Reed JM, McDaniel LS, Caballero AR, O'Callaghan RJ. 2007. Cholesterol as treatment for pneumococcal keratitis: cholesterol-specific inhibition of pneumolysin in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48 (6):2661-2666.
- Marriott HM, Ali F, Read RC, Mitchell TJ, Whyte MK, Dockrell DH. 2004. Nitric oxide levels regulate macrophage commitment to apoptosis or necrosis during pneumococcal infection. *Faseb J*, 18 (10):1126-1128.
- Marriott HM, Dockrell DH. 2007. The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Exp Lung Res*, 33 (10):493-505.
- Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. 1995. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med*, 23 (10):1638-1652.
- Marshall JC. 2001. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*, 29 (7 Suppl):S99-106.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348 (16):1546-1554.
- Mathison JC, Ulevitch RJ. 1979. The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol*, 123 (5):2133-2143.
- Matsukawa A. 2007. STAT proteins in innate immunity during sepsis: lessons from gene knockout mice. *Acta Med Okayama*, 61 (5):239-245.
- Mauderly JL. 1984. Respiratory function responses of animals and man to oxidant gases and to pulmonary emphysema. *J Toxicol Environ Health*, 13 (2-3):345-361.
- Maus UA, Srivastava M, Paton JC, Mack M, Everhart MB, Blackwell TS, Christman JW, Schlondorff D, Seeger W, Lohmeyer J. 2004. Pneumolysin-induced lung injury is independent of leukocyte trafficking into the alveolar space. *J Immunol*, 173 (2):1307-1312.
- McCall CE, Yoza BK. 2007. Gene silencing in severe systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 175 (8):763-767.
- McCormack FX, Whitsett JA. 2002. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest*, 109 (6):707-712.
- McLauchlan GJ, Anderson ID, Grant IS, Fearon KC. 1995. Outcome of patients with abdominal sepsis treated in an intensive care unit. *Br J Surg*, 82 (4):524-529.
- Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1 (2):135-145.

- Memon RA, Grunfeld C, Moser AH, Feingold KR. 1993. Tumor necrosis factor mediates the effects of endotoxin on cholesterol and triglyceride metabolism in mice. *Endocrinology*, 132 (5):2246-2253.
- Merrell RC. 1995. The abdomen as source of sepsis in critically ill patients. *Crit Care Clin*, 11 (2):255-272.
- Mertens G, Cassiman JJ, Van den Berghe H, Vermeylen J, David G. 1992. Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties. *J Biol Chem*, 267 (28):20435-20443.
- Miyazaki S, Matsukawa A, Ohkawara S, Takagi K, Yoshinaga M. 2000. Neutrophil infiltration as a crucial step for monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 to attract monocytes in lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits. *Inflamm Res*, 49 (12):673-678.
- Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, Schneider H, Burchardi H. 2002. Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med*, 28 (10):1440-1446.
- Moine P, Vercken JB, Chevret S, Gajdos P. 1995. Severe community-acquired pneumococcal pneumonia. The French Study Group of Community-Acquired Pneumonia in ICU. *Scand J Infect Dis*, 27 (3):201-206.
- Moine P, Mazoit JX. 1999. Streptococcus pneumoniae pneumonia in mice: optimal amoxicillin dosing predicted from a pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *J Pharmacol Exp Ther*, 291 (3):1086-1092.
- Moine P, Abraham E. 2004. Immunomodulation and sepsis: impact of the pathogen. *Shock*, 22 (4):297-308.
- Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM, Billiar TR. 2006. Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock*, 26 (5):430-437.
- Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU. 1987. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro
- Moore KL, Esmon CT, Esmon NL. 1989. Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood*, 73 (1):159-165.
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*, 164 (11):5998-6004.
- Nelson S, Bagby GJ, Bainton BG, Summer WR. 1989a. The effects of acute and chronic alcoholism on tumor necrosis factor and the inflammatory response. *J Infect Dis*, 160 (3):422-429.
- Nelson S, Bagby GJ, Bainton BG, Wilson LA, Thompson JJ, Summer WR. 1989b. Compartmentalization of intraalveolar and systemic lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and the pulmonary inflammatory response. *J Infect Dis*, 159 (2):189-194.

- Nelson S, Mason CM, Kolls J, Summer WR. 1995. Pathophysiology of pneumonia. *Clin Chest Med*, 16 (1):1-12.
- Nichols RL, Smith JW, Balthazar ER. 1978. Peritonitis and intraabdominal abscess: an experimental model for the evaluation of human disease. *J Surg Res*, 25 (2):129-134.
- Nollmann M, Gilbert R, Mitchell T, Sferrazza M, Byron O. 2004. The role of cholesterol in the activity of pneumolysin, a bacterial protein toxin. *Biophys J*, 86 (5):3141-3151.
- Nonogaki K, Moser AH, Pan XM, Staprans I, Grunfeld C, Feingold KR. 1995. Lipoteichoic acid stimulates lipolysis and hepatic triglyceride secretion in rats in vivo. *J Lipid Res*, 36 (9):1987-1995.
- Oda K, Kitano H. 2006. A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Mol Syst Biol*, 2:2006 0015.
- Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA. 2006. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell*, 126 (4):659-662.
- Opal SM, Cohen J. 1999. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med*, 27 (8):1608-1616.
- Opitz B, Hippenstiel S, Eitel J, Suttorp N. 2007. Extra- and intracellular innate immune recognition in endothelial cells. *Thromb Haemost*, 98 (2):319-326.
- Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, Yang D. 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis*, 62 Suppl 2:ii17-21.
- Oppert M, Engel C, Brunkhorst FM, Bogatsch H, Reinhart K, Frei U, Eckardt KU, Loeffler M, John S. 2008. Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock--a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study. *Nephrol Dial Transplant*, 23 (3):904-909.
- Orihuela CJ, Gao G, Francis KP, Yu J, Tuomanen EI. 2004. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J Infect Dis*, 190 (9):1661-1669.
- Ortqvist A, Hedlund J, Kalin M. 2005. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and clinical features. *Semin Respir Crit Care Med*, 26 (6):563-574.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (25):13766-13771.
- Pabon C, Modrusan Z, Ruvolo MV, Coleman IM, Daniel S, Yue H, Arnold LJ, Jr. 2001. Optimized T7 amplification system for microarray analysis. *Biotechniques*, 31 (4):874-879.
- Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. 2003. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 37 (5):1043-1055.
- Palaniyar N, Nadesalingam J, Reid KB. 2002. Pulmonary innate immune proteins and receptors that interact with gram-positive bacterial ligands. *Immunobiology*, 205 (4-5):575-594.

- Panes J, Perry MA, Anderson DC, Manning A, Leone B, Cepinskas G, Rosenbloom CL, Miyasaka M, Kvietys PR, Granger DN. 1995. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am J Physiol*, 269 (6 Pt 2):H1955-1964.
- Park JJ, Loh YP. 2008. How peptide hormone vesicles are transported to the secretion site for exocytosis. *Mol Endocrinol*, 22 (12):2583-2595.
- Parker SJ, Watkins PE. 2001. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg*, 88 (1):22-30.
- Paterson HM, Murphy TJ, Purcell EJ, Shelley O, Kriynovich SJ, Lien E, Mannick JA, Lederer JA. 2003. Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity. *J Immunol*, 171 (3):1473-1483.
- Paton JC, Berry AM, Lock RA, Hansman D, Manning PA. 1986. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding pneumolysin. *Infect Immun*, 54 (1):50-55.
- Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, Mitchell TJ. 1993. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol*, 47:89-115.
- Pedron T, Thibault C, Sansonetti PJ. 2003. The invasive phenotype of *Shigella flexneri* directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *J Biol Chem*, 278 (36):33878-33886.
- Peltola H, Booy R, Schmitt HJ. 2004. What can children gain from pneumococcal conjugate vaccines? *Eur J Pediatr*, 163 (9):509-516.
- Pennings JL, Kimman TG, Janssen R. 2008. Identification of a common gene expression response in different lung inflammatory diseases in rodents and macaques. *PLoS ONE*, 3 (7):e2596.
- Petersen SV, Thiel S, Jensenius JC. 2001. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol Immunol*, 38 (2-3):133-149.
- Pliyev BK. 2008. Chemotactically active proteins of neutrophils. *Biochemistry (Mosc)*, 73 (9):970-984.
- Pons JL, Mandement MN, Martin E, Lemort C, Nouvellon M, Mallet E, Lemeland JF. 1996. Clonal and temporal patterns of nasopharyngeal penicillin-susceptible and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains in children attending a day care center. *J Clin Microbiol*, 34 (12):3218-3222.
- Porter JA, Young KE, Beachy PA. 1996. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*, 274 (5285):255-259.
- Quinlan TR, Marsh JP, Janssen YM, Leslie KO, Hemenway D, Vacek P, Mossman BT. 1994. Dose-responsive increases in pulmonary fibrosis after inhalation of asbestos. *Am J Respir Crit Care Med*, 150 (1):200-206.
- Ramakers BP, de Goeij M, van der Hoeven JG, Peters WH, Pickkers P. 2009. Inflammation-induced hepatotoxicity in humans. *Shock*, 31 (2):151-156.
- Rayner CF, Jackson AD, Rutman A, Dewar A, Mitchell TJ, Andrew PW, Cole PJ, Wilson R. 1995. Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect Immun*, 63 (2):442-447.

- Ring A, Stremmel W. 2000. The hepatic microvascular responses to sepsis. *Semin Thromb Hemost*, 26 (5):589-594.
- Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. 2008. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*, 8 (10):776-787.
- Rosseau S, Hocke A, Mollenkopf H, Schmeck B, Suttorp N, Kaufmann SH, Zerrahn J. 2007. Comparative transcriptional profiling of the lung reveals shared and distinct features of *Streptococcus pneumoniae* and influenza A virus infection. *Immunology*, 120 (3):380-391.
- Rossi D, Zlotnik A. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*, 18:217-242.
- Rousseeuw PJ, Leroy AMH, Hrsg. 2003. *Robust Regression and Outlier Detection*. Wiley Series in Probability and Statistics. Erste Aufl. New York: Wiley.
- Rubins JB, Janoff EN. 1998. Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. *J Lab Clin Med*, 131 (1):21-27.
- Sakaguchi S, Furusawa S. 2006. Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 47 (2):167-177.
- Sancho D, Vicente-Manzanares M, Mittelbrunn M, Montoya MC, Gordon-Alonso M, Serrador JM, Sanchez-Madrid F. 2002. Regulation of microtubule-organizing center orientation and actomyosin cytoskeleton rearrangement during immune interactions. *Immunol Rev*, 189:84-97.
- Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*, 177:195-203.
- Schleef RR, Bevilacqua MP, Sawdey M, Gimbrone MA, Jr., Loskutoff DJ. 1988. Cytokine activation of vascular endothelium. Effects on tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor. *J Biol Chem*, 263 (12):5797-5803.
- Senthil M, Brown M, Xu DZ, Lu Q, Feketeova E, Deitch EA. 2006. Gut-lymph hypothesis of systemic inflammatory response syndrome/multiple-organ dysfunction syndrome: validating studies in a porcine model. *J Trauma*, 60 (5):958-965; discussion 965-957.
- Seo SM, McIntire LV, Smith CW. 2001. Effects of IL-8, Gro-alpha, and LTB(4) on the adhesive kinetics of LFA-1 and Mac-1 on human neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281 (5):C1568-1578.
- Shenkar R, Abraham E. 1999. Mechanisms of lung neutrophil activation after hemorrhage or endotoxemia: roles of reactive oxygen intermediates, NF-kappa B, and cyclic AMP response element binding protein. *J Immunol*, 163 (2):954-962.
- Sibille Y, Reynolds HY. 1990. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis*, 141 (2):471-501.
- Simon RH, Paine R, 3rd. 1995. Participation of pulmonary alveolar epithelial cells in lung inflammation. *J Lab Clin Med*, 126 (2):108-118.
- Singh V, Shi W, Almo SC, Evans GB, Furneaux RH, Tyler PC, Painter GF, Lenz DH, Mee S, Zheng R, Schramm VL. 2006. Structure and inhibition of a quorum sensing target from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochemistry*, 45 (43):12929-12941.

- Sorensen GL, Husby S, Holmskov U. 2007. Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology*, 212 (4-5):381-416.
- Spriggs DR, Sherman ML, Michie H, Arthur KA, Imamura K, Wilmore D, Frei E, 3rd, Kufe DW. 1988. Recombinant human tumor necrosis factor administered as a 24-hour intravenous infusion. A phase I and pharmacologic study. *J Natl Cancer Inst*, 80 (13):1039-1044.
- Sriskandan S, Cohen J. 1999. Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from gram-negative sepsis. *Infect Dis Clin North Am*, 13 (2):397-412.
- Stamme C, Bundschuh DS, Hartung T, Gebert U, Wollin L, Nusing R, Wendel A, Uhlig S. 1999. Temporal sequence of pulmonary and systemic inflammatory responses to graded polymicrobial peritonitis in mice. *Infect Immun*, 67 (11):5642-5650.
- Steinfurt C, Wilson R, Mitchell T, Feldman C, Rutman A, Todd H, Sykes D, Walker J, Saunders K, Andrew PW, et al. 1989. Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in vitro. *Infect Immun*, 57 (7):2006-2013.
- Steinstraesser L, Tippler B, Mertens J, Lamme E, Homann HH, Lehnhardt M, Wildner O, Steinau HU, Uberla K. 2005. Inhibition of early steps in the lentiviral replication cycle by cathelicidin host defense peptides. *Retrovirology*, 2:2.
- Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. 2003. Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. *Curr Opin Infect Dis*, 16 (3):193-198.
- Takahashi H, Tsuda Y, Takeuchi D, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. 2004. Influence of systemic inflammatory response syndrome on host resistance against bacterial infections. *Crit Care Med*, 32 (9):1879-1885.
- Takeda K, Akira S. 2004. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci*, 34 (2):73-82.
- Talbot UM, Paton AW, Paton JC. 1996. Uptake of *Streptococcus pneumoniae* by respiratory epithelial cells. *Infect Immun*, 64 (9):3772-3777.
- Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander ES, Golub TR. 1999. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (6):2907-2912.
- Tang BM, McLean AS, Dawes IW, Huang SJ, Cowley MJ, Lin RC. 2008. Gene-expression profiling of gram-positive and gram-negative sepsis in critically ill patients. *Crit Care Med*, 36 (4):1125-1128.
- Tavares-Murta BM, Zapparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CH, Murta EF, Ferreira SH, Cunha FQ. 2002. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med*, 30 (5):1056-1061.
- Tomasz A, Albino A, Zanati E. 1970. Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature*, 227 (5254):138-140.
- Tosi MF. 2005. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol*, 116 (2):241-249; quiz 250.
- Trinchieri G, Sher A. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*, 7 (3):179-190.

- Trost M, English L, Lemieux S, Courcelles M, Desjardins M, Thibault P. 2009. The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity*, 30 (1):143-154.
- Tuomanen EI, Austrian R, Masure HR. 1995. Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med*, 332 (19):1280-1284.
- Ulevitch RJ, Johnston AR, Weinstein DB. 1979. New function for high density lipoproteins. Their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J Clin Invest*, 64 (5):1516-1524.
- Ulich TR, Guo K, Yin S, del Castillo J, Yi ES, Thompson RC, Eisenberg SP. 1992. Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo. IV. Expression of interleukin-1 alpha/beta and interleukin-1 receptor antagonist mRNA during endotoxemia and during endotoxin-initiated local acute inflammation. *Am J Pathol*, 141 (1):61-68.
- Unanue ER. 2007. Ito cells, stellate cells, and myofibroblasts: new actors in antigen presentation. *Immunity*, 26 (1):9-10.
- van der Poll T, Levi M, Buller HR, van Deventer SJ, de Boer JP, Hack CE, ten Cate JW. 1991. Fibrinolytic response to tumor necrosis factor in healthy subjects. *J Exp Med*, 174 (3):729-732.
- van Gameren MM, Willemsse PH, Mulder NH, Limburg PC, Groen HJ, Vellenga E, de Vries EG. 1994. Effects of recombinant human interleukin-6 in cancer patients: a phase I-II study. *Blood*, 84 (5):1434-1441.
- van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP. 2003. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*, 31 (5):1359-1366.
- van oud Alblas AB, van Furth R. 1979. Origin, Kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J Exp Med*, 149 (6):1504-1518.
- van Till JW, van Veen SQ, van Ruler O, Lamme B, Gouma DJ, Boermeester MA. 2007. The innate immune response to secondary peritonitis. *Shock*, 28 (5):504-517.
- Van Zee KJ, DeForge LE, Fischer E, Marano MA, Kenney JS, Remick DG, Lowry SF, Moldawer LL. 1991. IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J Immunol*, 146 (10):3478-3482.
- Varani J, Ginsburg I, Schuger L, Gibbs DF, Bromberg J, Johnson KJ, Ryan US, Ward PA. 1989. Endothelial cell killing by neutrophils. Synergistic interaction of oxygen products and proteases. *Am J Pathol*, 135 (3):435-438.
- Vermont CL, den Brinker M, Kakeci N, de Kleijn ED, de Rijke YB, Joosten KF, de Groot R, Hazelzet JA. 2005. Serum lipids and disease severity in children with severe meningococcal sepsis. *Crit Care Med*, 33 (7):1610-1615.
- Verstak B, Hertzog P, Mansell A. 2007. Toll-like receptor signalling and the clinical benefits that lie within. *Inflamm Res*, 56 (1):1-10.
- Vervloet MG, Thijs LG, Hack CE. 1998. Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemost*, 24 (1):33-44.
- Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S. 1998. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter,

- prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med*, 26 (11):1793-1800.
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D. 2006. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*, 34 (2):344-353.
- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol*, 166 (1):249-255.
- Vyroubal P, Chiarla C, Giovannini I, Hyspler R, Ticha A, Hrniciarikova D, Zadak Z. 2008. Hypocholesterolemia in clinically serious conditions--review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 152 (2):181-189.
- Wakabayashi G, Gelfand JA, Jung WK, Connolly RJ, Burke JF, Dinarello CA. 1991. Staphylococcus epidermidis induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to Escherichia coli. *J Clin Invest*, 87 (6):1925-1935.
- Walport MJ. 2001. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, 344 (14):1058-1066.
- Wang H, Ma S. 2008. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Emerg Med*, 26 (6):711-715.
- Wang P, Chaudry IH. 1996. Mechanism of hepatocellular dysfunction during hyperdynamic sepsis. *Am J Physiol*, 270 (5 Pt 2):R927-938.
- Wang X, Moser C, Louboutin JP, Lysenko ES, Weiner DJ, Weiser JN, Wilson JM. 2002. Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to Haemophilus influenzae infection in mouse lung. *J Immunol*, 168 (2):810-815.
- Weiss SJ. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, 320 (6):365-376.
- Weksler BB, Marcus AJ, Jaffe EA. 1977. Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (9):3922-3926.
- Wickel DJ, Cheadle WG, Mercer-Jones MA, Garrison RN. 1997. Poor outcome from peritonitis is caused by disease acuity and organ failure, not recurrent peritoneal infection. *Ann Surg*, 225 (6):744-753; discussion 753-746.
- Williams P, Camara M, Hardman A, Swift S, Milton D, Hope VJ, Winzer K, Middleton B, Pritchard DI, Bycroft BW. 2000. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355 (1397):667-680.
- Worthen GS, Haslett C, Rees AJ, Gumbay RS, Henson JE, Henson PM. 1987. Neutrophil-mediated pulmonary vascular injury. Synergistic effect of trace amounts of lipopolysaccharide and neutrophil stimuli on vascular permeability and neutrophil sequestration in the lung. *Am Rev Respir Dis*, 136 (1):19-28.
- Yaguchi H, Tsutsumi K, Shimono K, Omura M, Sasano H, Nishikawa T. 1998. Involvement of high density lipoprotein as substrate cholesterol for steroidogenesis by bovine adrenal fasciculo-reticularis cells. *Life Sci*, 62 (16):1387-1395.
- Zhang P, Nelson S, Summer WR, Spitzer JA. 1997a. Acute ethanol intoxication suppresses the pulmonary inflammatory response in rats challenged with intrapulmonary endotoxin. *Alcohol Clin Exp Res*, 21 (5):773-778.

- Zhang P, Bagby GJ, Stoltz DA, Spitzer JA, Summer WR, Nelson S. 1997b. Modulation of the lung host response by granulocyte colony-stimulating factor in rats challenged with intrapulmonary endotoxin. *Shock*, 7 (3):193-199.
- Zhang P, Bagby GJ, Stoltz DA, Summer WR, Nelson S. 1999. Granulocyte colony-stimulating factor modulates the pulmonary host response to endotoxin in the absence and presence of acute ethanol intoxication. *J Infect Dis*, 179 (6):1441-1448.
- Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S. 2000. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev*, 173:39-51.

8 Anhang

Aktivierung des Toll-like Rezeptor Signalweges

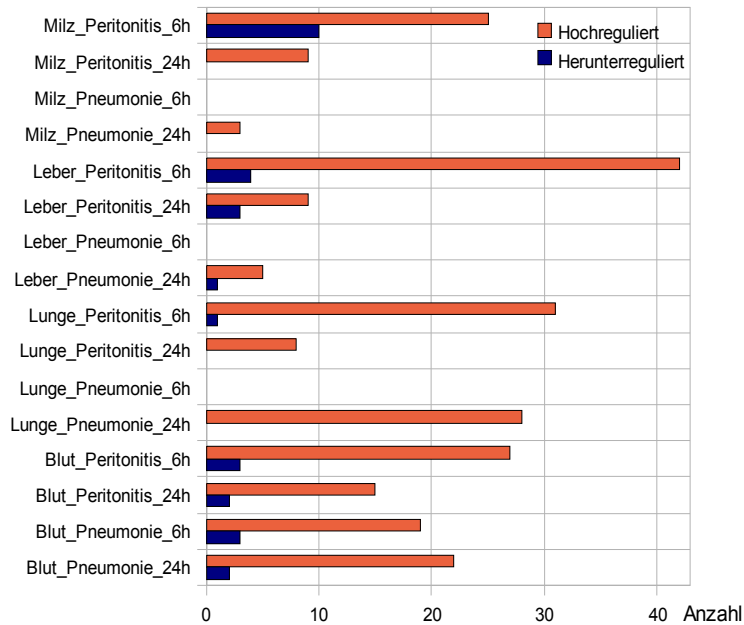


Abbildung 14. Kumulatives Balkendiagramm der Gene des Toll-like Rezeptor Signalweges, welche eine mehr als zweifache Änderung der Genexpression bezogen zur jeweiligen Shamgruppe aufwiesen ($|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 1$). Hierbei sind alle Organe, Konditionen und Zeitpunkte dargestellt. Die KEGG-Kategorie des Toll-like Rezeptor Signalweges beinhaltet insgesamt 100 Gene. Der Signalweg kann auf der Homepage der KEGG-Datenbank (http://www.genome.jp/dbget-bin/get_pathway?org_name=mmu&mapno=04620) eingesehen werden. Hochregulierte Gene werden kumulativ mit roten Balken und herabregulierte Gene kumulativ mit blauen Balken dargestellt. Auf der X-Achse findet sich die Anzahl der regulierten Gene, auf der Y-Achse die jeweilige Kondition (Organ, Infektionsmodell, Zeitpunkt nach Induktion der Infektion) aufgetragen. Die genaue Untersuchung einzelner regulierter Gene des Signalweges war nicht Gegenstand der vorgelegten Untersuchung.

Venn Diagramme des Organs Blut

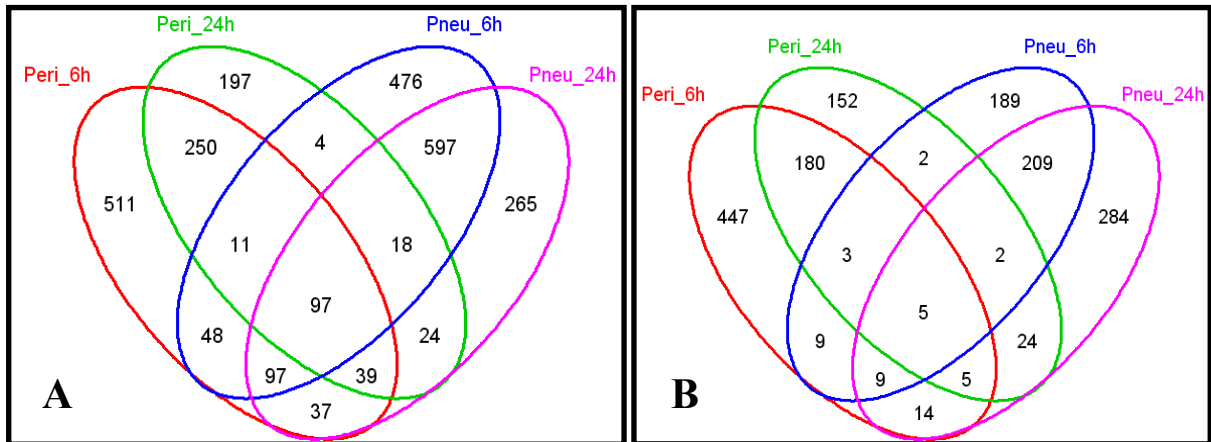


Abbildung 15. Venn Diagramme des Blutes. **A)** Venn Diagramm der mehr als zweifach hochregulierten Gene bezogen auf die zugehörige Shamgruppe. **B)** Venn Diagramm der mehr als zweifach herabregulierten Gene bezogen auf die jeweilige Shamgruppe. Peri_6h = Genexpression 6h nach Induktion der fäkalen Peritonitis (**rot**), Pneu_6h = Genexpression 6h nach intratrachealer Instillation von *S. pneumoniae* Serotyp 2 (D39) (**blau**); Analoges gilt für die jeweiligen 24h-Zeitpunkte: Peri_24h (**grün**) und Pneu_24h (**lila**). Menge der definitionsgemäß hochregulierten Gene **A)**: Alle Konditionen = 2671, Peri_6h = 1090, Peri_24h = 640, Pneu_6h = 1348, Pneu_24h = 1174; Menge der definitionsgemäß herabregulierten Gene **B)**: Alle Konditionen = 1543, Peri_6h = 672, Peri_24h = 373, Pneu_6h = 428, Pneu_24h = 552.

Venn Diagramme der Milz

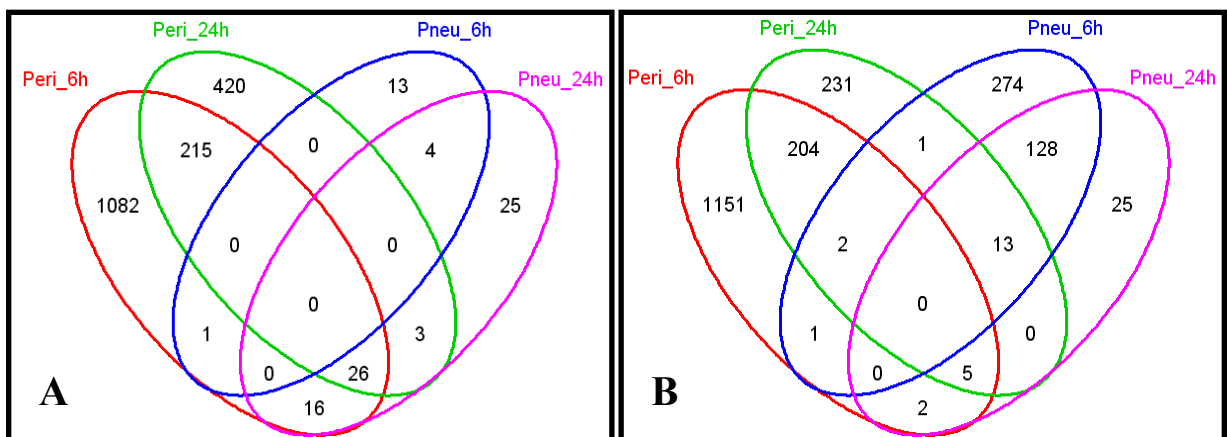


Abbildung 16. Venn Diagramme der Milz. **A)** Venn Diagramm der mehr als zweifach hochregulierten Gene bezogen auf die zugehörige Shamgruppe. **B)** Venn Diagramm der mehr als zweifach herabregulierten Gene bezogen auf die jeweilige Shamgruppe. Peri_6h = Genexpression 6h nach Induktion der fäkalen Peritonitis (**rot**), Pneu_6h = Genexpression 6h nach intratrachealer Instillation von *S. pneumoniae* Serotyp 2 (D39) (**blau**); Analoges gilt für die jeweiligen 24h-Zeitpunkte: Peri_24h (**grün**) und Pneu_24h (**lila**). Menge der definitionsgemäß hochregulierten Gene **A)**: Alle Konditionen = 1805, Peri_6h = 1340, Peri_24h = 664, Pneu_6h = 18, Pneu_24h = 74; Menge der definitionsgemäß herabregulierten Gene **B)**: Alle Konditionen = 2037, Peri_6h = 1365, Peri_24h = 456, Pneu_6h = 419, Pneu_24h = 173.

Venn Diagramme aller Organe im Vergleich bei Peritonitis

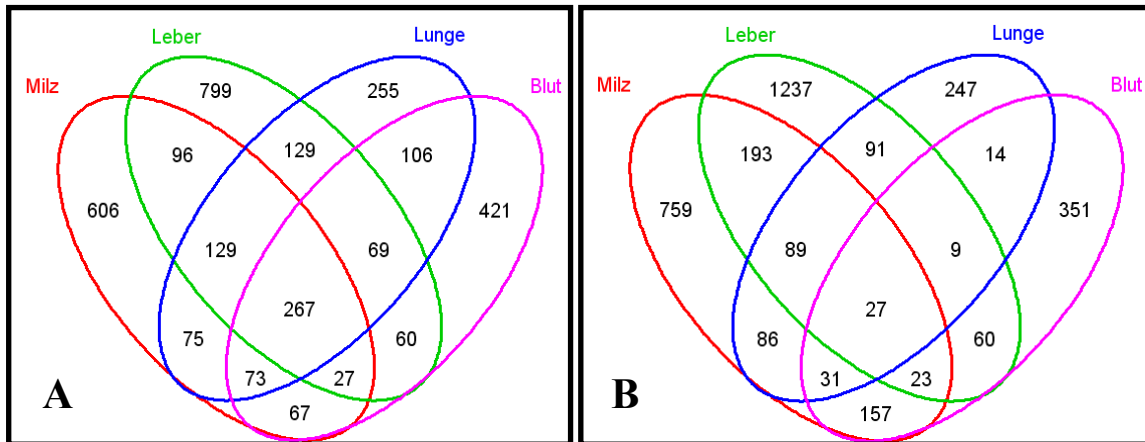


Abbildung 17. Venn Diagramme aller Organe im Vergleich 6h nach Induktion der fäkalen Peritonitis. A) Venn Diagramm der mehr als zweifach hochregulierten Gene bezogen auf die zugehörige Shamgruppe. B) Venn Diagramm der mehr als zweifach herabregulierten Gene bezogen auf die jeweilige Shamgruppe. Die Bezeichnung der übergeordneten Mengen erfolgte jeweils organweise für die Genexpression 6h nach Induktion der fäkalen Peritonitis für Milz (**rot**), Leber (**grün**); Lunge (**blau**) und Blut (**lila**). Menge der definitionsgemäß hochregulierten Gene **A**): Alle Organe = 3179, Milz = 1340, Leber = 1576, Lunge = 1103, Blut = 1090; Menge der definitionsgemäß herabregulierten Gene **B**): Alle Organe = 3374, Milz = 1365, Leber = 1729, Lunge = 594, Blut = 672.

Venn Diagramme aller Organe im Vergleich bei Pneumonie

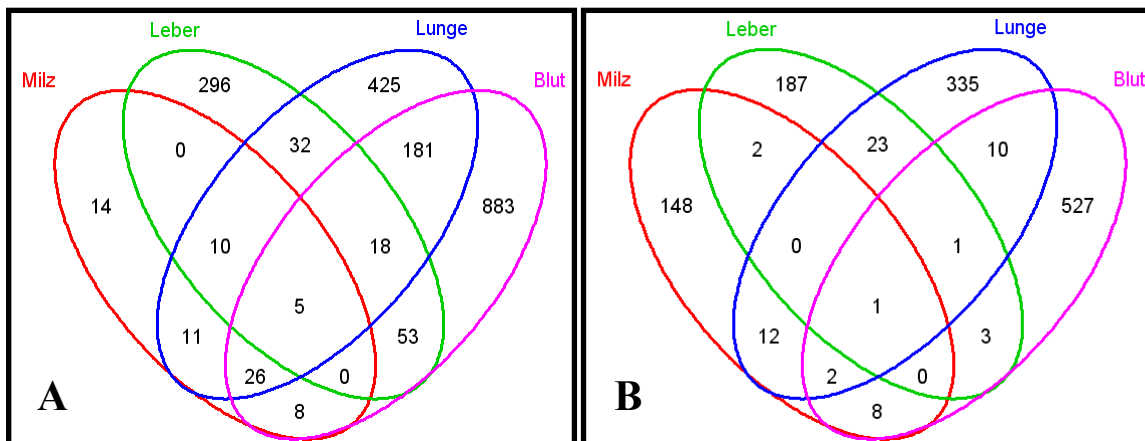


Abbildung 18. Venn Diagramme aller Organe im Vergleich 24h nach Induktion einer Pneumonie mit *S. pneumoniae* Serotyp 2 (D39). A) Venn Diagramm der mehr als zweifach hochregulierten Gene bezogen auf die zugehörige Shamgruppe. B) Venn Diagramm der mehr als zweifach herabregulierten Gene bezogen auf die jeweilige Shamgruppe. Die Bezeichnung der übergeordneten Mengen erfolgt jeweils organweise für die Genexpression 24h nach Induktion der Pneumonie für Milz (**rot**), Leber (**grün**); Lunge (**blau**) und Blut (**lila**). Menge der definitionsgemäß hochregulierten Gene **A**): Alle Organe = 1962, Milz = 74, Leber = 414, Lunge = 708, Blut = 1174; Menge der definitionsgemäß herabregulierten Gene **B**): Alle Organe = 1259, Milz = 173, Leber = 217, Lunge = 384, Blut = 552.

9 Danksagung

In erster Linie möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Michael Bauer für die Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie die exzellente Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertation und die mir gewährten Freiräume danken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Konrad Reinhart für die Möglichkeit, eine experimentelle Arbeit an seiner Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universitätsklinik Jena durchführen zu können.

Für die Bereitstellung von Teilen des Probenmaterials sowie für hilfreiche Hinweise bei der Manuskriptgestaltung danke ich Herrn PD. Dr. Ulrich A. Maus des Labors für Experimentelle Pneumologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Mein Dank gilt ebenso Frau Dr. Elke Grunow, Frau Dr. Karen Felsmann sowie dem gesamten Team der SIRS Lab GmbH Jena, welche mir durch Bereitstellung der notwendigen experimentellen Apparaturen und die Einarbeitung in die Microarraytechnologie, die Durchführung der Genexpressionsanalysen in ihren Räumlichkeiten ermöglichten.

Außerdem danke ich dem Team des Infektionstierhauses am Forschungszentrum Beutenberg in Jena unter der Leitung von Frau Dr. Carola Leipner für die Bereitstellung der Experimentierräume und exzellenten Bedingungen.

Für die Anleitung bei den statistischen Analysen gilt mein Dank Herrn Dr. Matthias Kohl vom Lehrstuhl für Stochastik der Universität Bayreuth. Für die Unterstützung und Anleitung bei den bioinformatischen und systembiologischen Analysen sowie bei der Erstellung der Abbildungen bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dipl. Bioinf. Sandro Lambeck der bioinformatischen Abteilung des Hans-Knöll-Institutes in Jena.

Ebenso gilt mein Dank dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Experimentelle Anästhesie unter Leitung von PD Dr. rer. nat. Ralf Claus für die gute Zusammenarbeit sowie Herrn Benedikt Acht für die freundliche Assistenz bei den Tierexperimenten.

Ein ganz besonderer Dank richtet sich an meine Mentorin Frau Prof. Dr. med. Nöldge-Schomburg, die aufgrund Ihrer überaus positiven, liebenswerten und gut strukturierten Persönlichkeit wesentlich zu meinem persönlichen Fortschritt beigetragen hat. Ebenso danke ich meinen wissenschaftlichen Wegbereitern Prof. Dr. Hans Köhler, Prof. Dr. Matthias Girndt, Prof. Dr. Terry Strom und Prof. Dr. Xing Xiao Zheng für die wertvollen Erfahrungen, welche ich in der Zusammenarbeit mit ihnen sammeln konnte.

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau Brigitte Specht, Herrn Dr. Martin Specht und an Frau PD Dr. Florentine Jahn, die mir bei der privaten Organisation und Kinderbetreuung sowie in persönlichen Belangen stets eine große Stütze waren.

Losgelöst hiervon und von ganzem Herzen danke ich meinem wundervollen Sohn Levin für sein Verständnis für meine persönlichen Ziele und seine strahlende Existenz, meinen Eltern und Großeltern sowie meinem Bruder für ihren Glauben in meine Fähigkeiten und ihre uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen.

ERGEBNISSE DER ARBEIT WURDEN ZU TEILEN VERÖFFENTLICHT UND PRÄSENTIERT

Weber M., Lambeck S., Kohl M., Maus U. und Bauer M. 2009. Lokale und systemische Transkriptionsmuster der Inflammation: Die Lunge als Ausgangs- und als Zielorgan der Sepsis. *Wissenschaftliche Anästhesietage Würzburg*. Wird in einer Ausgabe von *Anästhesiologie und Intensivmedizin (A & I)* veröffentlicht. Im Druck.

Weber M., Lambeck S., Kohl M., Maus U. und Bauer M. 2009. **Systems biology of multiple organ dysfunction:** effects of *Streptococcus pneumoniae* pneumonia as opposed to polymicrobial peritonitis on organspecific transcriptome in murine sepsis model. Abstract eingereicht bei *European Shock Society Congress 2009* in Lissabon.

Vortrag: Systembiologie des septischen Organversagens. 2009. Im Rahmen der Vorlesungsreihe „Molekulare Mechanismen des Organversagens“, Forschungszentrum Lobeda des Universitätsklinikums Jena.

Vortrag: Lokale und systemische Transkriptionsmuster der Inflammation: Die Lunge als Ausgangs- und als Zielorgan der Sepsis. 2009. Wissenschaftliche Anästhesietage Würzburg.

Vortrag: Lokale und systemische Transkriptionsmuster der Inflammation: Die Lunge als Ausgangs- und als Zielorgan der Sepsis. 2009. Forschungskonferenz der Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie des Universitätsklinikums Jena.

PUBLIKATIONEN UND ZITIERFÄHIGE ABSTRACTS

Weber M., Girndt M, Kaul H, Sester M, Sester U, Köhler H. 1999. Glucocorticoide nach Nierentransplantation: Wirkung auf Zytokinproduktion und Expression von B7-1 (CD80) durch Monozyten. *Transplantationsmedizin Supplement*, S. 61.

Sanchez-Fueyo A, **Weber M.**, Domenig C, Strom TB, Zheng XX. 2002. Tracking the Immunoregulatory Mechanisms Active During Allograft Tolerance. *The Journal of Immunology*, 168, 2274-2281

Weber M., Laux T, Luiz T, Pajonk FG. 2005. Psychiatrische Erkrankungen-eine Notarztindikation? Ein Vergleich mit anderen Einsatzkategorien. *Deutscher Anästhesiekongress München*, Abstract Nr.109.

Weber M., Madler C, Pajonk FG. 2005. Zur Problematik psychiatrischer Notarzteinsätze - Drei Kasuistiken. *Notfall- und Rettungsmedizin*, 8 : 489 – 492.

WEITERE VORTRÄGE

Glucocorticoide nach Nierentransplantation: Wirkung auf Zytokinproduktion und Expression von B7-1 (CD80) durch Monozyten. 1999. Abteilung für Innere Medizin IV. Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar

Glucocorticoids after renal transplantation: Role of cytokine production and expression of B7-1 (CD80) on human monocytes. 1999. Division of Immunology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School. Boston MA, USA.

Modelle der Toleranzentwicklung und Abstossungsprävention nach Organtransplantation bei der Maus. (2000). Abteilung für Innere Medizin IV. Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar.

Neue Methoden zur Genexpressions- und Proteinanalyse. 2000. Abteilung für Herz-Thorax und Gefäßchirurgie. Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar.

Zertifizierte Fortbildungen der Ärztekammer Rheinlandpfalz (Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern):

Morphine bei Leber- und Niereninsuffizienz. 2004.

Aktuelle Hämostasekonzepte – rekombinanter Faktor VIIa. 2005.

Psychiatrische Notfälle – eine Notarztindikation. 2005.

Psychiatrische Erkrankungen – eine Notarztindikation? Ein Vergleich mit anderen Einsatzkategorien. 2005. Deutscher Anästhesiekongress München.

Psychiatrische Erkrankungen – eine Notarztindikation? Ein Vergleich mit anderen Einsatzkategorien. 2005. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde. Berlin.

Transkriptomik mit klinischer Relevanz. 2007. Institut für Immunologie. Universitätsklinikum Jena.

Immunmodulation bei Sepsis. 2008. Im Rahmen der Vorlesungsreihe „Molekulare Mechanismen des Organversagens“, Forschungszentrum Lobeda des Universitätsklinikums Jena.

11 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, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Michael. Bauer, Dipl. Bioinf. Sandro Lambeck, Dr. Matthias Kohl, PD Dr. rer. nat. Ulrich A. Maus,

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

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

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

Martina Weber

Jena, den 28.04.2009