

**Expression von Neutrophilen-Gelatinase-
assoziiertem Lipocalin (NGAL)
im Rahmen der polymikrobiellen Sepsis
im Mausmodell**

Dissertation

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

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

von Daniel Seibold

geboren am 12.10.1983 in Heilbronn

Gutachter:

- 1. apl. Prof. Dr. Ralf A. Claus**
- 2. PD Dr. med. Martin Busch**
- 3. Prof. Dr. med. Jan Hinrich Bräsen**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.11.2021

Abkürzungsverzeichnis

Actb actin beta

AKI acute kidney injury

ALI acute lung injury

aq.dest. *aqua destillata*

ARDS acute respiratory distress syndrome

AUC *area under the curve*

CARS compensatory antiinflammatory response syndrome

CLP cecal ligation and puncture

Ct *cycle threshold*

DAMP damage associated molecular pattern

DHBA Dihydroxybenzoesäure

DMT1 divalent metal transporter 1

Fth1 *ferritin heavy chain 1*

Ftl1 *ferritin light chain 1*

Gapdh glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

G-CSF granulocyte colony-stimulating factor

GM-CSF granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Gusb glucuronidase beta

HMGB1 high mobility group box protein 1

Hprt1 hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

i.p. intraperitoneal

ICG Indocyanin-Grün

IL-6 Interleukin-6

IL-8 Interleukin-8

KBE Kolonie bildende Einheiten

KS-Test Kolmogorov-Smirnov-Test

Lcn2 Lipocalin 2

LPS Lipopolysaccharid

MMP-9 matrix metalloproteinase 9

MODS multiple organ dysfunction syndrome

mRNA *messenger RNA*

MSC Mesenchymale Stammzellen

NF- κ B *nuclear factor kappa B*, *Siehe*

NGAL neutrophil gelatinase-associated lipocalin

NRAMP1 natural resistance-associated macrophage protein 1

PAMP pathogen associated molecular pattern

PCI peritoneal contamination and infection, peritoneal contamination and infection

PRR pattern recognition receptors

qRT-PCR real-time quantitative PCR

RNA ribonucleic acid

ROC *receiver operating characteristics*

ROS reaktive Sauerstoffspezies

RT-PCR reverse transcription polymerase chain reaction

SIRS systemic inflammatory response syndrome

Slc22a17 solute carrier family 22 member 17

SOFA sequential [sepsis-related] organ failure assessment

STAT3 signal transducer and activator of transcription 3

Tfrc *transferrin receptor*

TGF- β transforming growth factor β

TLR Toll-like Rezeptor

TNF- α Tumornekrosefaktor-alpha

VEGF vascular endothelial growth factor

vWF Von Willebrand-Faktor

Zusammenfassung

Wissenschaftlicher Hintergrund

Sepsis ist nach wie vor eine schwerwiegende Erkrankung mit einer vergleichsweise hohen Mortalität, deren pathophysiologische Zusammenhänge nur teilweise verstanden sind. Therapeutische Maßnahmen sind limitiert auf eine antibiotische Therapie und supportive intensivmedizinische Maßnahmen. Es bestehen keine ursächlichen Therapien, die den Verlauf der humanen Sepsis günstig beeinflussen können. Daher besteht eine Notwendigkeit, die komplexen Mechanismen der Sepsis besser zu verstehen.

Fragestellung

Transkriptomanalysen zeigten eine erhöhte Expression des Transkripts für *Ngal* im Modell der polymikrobiellen Sepsis. Daraus ergab sich die Frage, ob diese Expressionssteigerung von *Ngal* in den wichtigsten bei einer Sepsis beteiligten Organen mit Hilfe von RT-PCR-Messungen reproduziert werden kann, hierzu wurden die Organe Leber, Niere, Lunge und Herz untersucht, da diese als zentrale Organe maßgeblich von der Sepsis betroffen sind bzw. an deren Entstehung beteiligt sind. Weiterführend sollte anhand immunhistochemischer Untersuchungen NGAL in Proteinform auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden, um hieraus Anhaltspunkte über die zellulären Syntheseorte und den systemischen NGAL-Metabolismus zu generieren.

Methodik

Als Modell der polymikrobiellen Sepsis wurde das PCI-Modell (*peritoneal contamination and infection*, PCI) verwendet. Hierbei erhielten 8-Wochen alte C57BL/6-Mäuse eine intraperitoneale Injektion einer standardisierten humanen Faeces-Suspension oder isotone Kochsalzlösung als Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt 6h und 24h nach Injektion erfolgte die Organentnahme und anschließende Bestimmung der Transkriptionsveränderungen mittels RT-PCR. Der immunhistochemische Nachweis von NGAL erfolgte durch Einsatz eines polyklonalen NGAL-Antikörpers.

Ergebnisse und Diskussion

In den Organen Leber, Niere, Lunge und Herz kommt es im Rahmen einer polymikrobiellen Sepsis bereits nach 6 h zu einer ausgeprägten Hochregulation des *Ngal*-Transkripts, diese hält nach 24h an. Immunhistochemisch ist NGAL-Protein in der Leber in Hepatozyten und v.a. Makrophagen nachweisbar, in der Niere im proximalen Tubulusepithel, in der Lunge v.a. in Makrophagen, daneben auch vereinzelt in Pneumozyten. Hieraus lassen sich Hypothesen über die zellulären Syntheseorte und den Metabolismus von NGAL im Rahmen der Sepsis generieren. Ein maßgebliches Charakteristikum der Sepsis ist das Vorliegen einer dysregulierten Immunantwort mit einer initial überschießenden proinflammatorischen Reaktion („Zytokinsturm“). Mehrere Studien konnten zeigen, dass verschiedene proinflammatorische Zytokine (v.a. IL-1 β , IL-6, TNF- α) in der Lage sind, die Expression von *Ngal* zu stimulieren, dies erklärt die ausgeprägte Steigerung der *Ngal*-Expression in der PCI-Gruppe nach 6h und 24h in allen untersuchten Organen. Daten aus der Literatur deuten darauf hin, dass im Mausmodell die Leber maßgeblich zu den deutlich erhöhten NGAL-Plasmaspiegeln beiträgt, dies erscheint insofern plausibel, als dass der Leber für die Elimination von aus dem Darm translozierten Bakterien und die Initiierung der initialen proinflammatorischen Akute-Phase-Reaktion eine besondere Bedeutung zukommt. Es gibt weiterhin Hinweise, dass plasmatisches und damit systemisches NGAL renal reabsorbiert wird, sodass der Niere im Stoffwechsel des NGAL eine Doppelfunktion zukommt, zum einen ist sie durch glomeruläre Filtration der niedermolekularen Formen des NGAL und deren Reabsorbierung für die Regulation des plasmatischen Spiegels mitverantwortlich, zum anderen wird in den Tubulusepithelien selbst NGAL – als Ausdruck einer lokalen Nierenschädigung – synthetisiert. Der immunhistochemische Nachweis von NGAL-Protein im proximalen Tubulusepithel kann also plasmatischen Ursprunges sein und muss nicht zwingend lokal synthetisiertem NGAL entsprechen, dies ließe sich zum Beispiel durch den immunhistochemischen Nachweis der *Ngal*-mRNA weiter differenzieren. Auf systemischer Ebene hat NGAL im Rahmen einer akuten Infektion zweifelsfrei einen protektiven Effekt auf den Organismus, dies wurde in mehreren Studien anhand der erhöhten Sterblichkeit von NGAL-depletierten Mäusen oder nach NGAL-Administration gezeigt. Maßgeblich ist hierbei die bakterio-statische Funktion von NGAL, die durch nicht redundante Funktionen in der Regulation des Eisenstoffwechsels im Rahmen einer Infektion vermittelt wird (Bindung bakterieller

Siderophore, Ausbildung einer Entzündungsanämie), darüber hinaus spielt dies jedoch auf für zellregenerative Prozesse und Regulation apoptotischer Vorgänge eine Rolle. Weiterhin ist es für die Funktion der Neutrophilen essentiell und wirkt regulierend auf die Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine, ob auch diese Effekte rezeptorvermittelt ablaufen und mit dem Transport von Eisen über die Zellmembran assoziiert sind, ist bis dato nicht bekannt. Studien die ein verbessertes Überleben nach exogener Gabe von NGAL zeigten, könnten Anlass geben NGAL als potenzielles Therapeutikum im Rahmen der Sepsis weiter zu erforschen. Zahlreiche Studien und Metaanalysen liegen in Bezug auf die mögliche Eignung von NGAL als Biomarker vor (insb. der akuten Nierenschädigung). Da es in allen untersuchten Organen zu einer deutlichen Expressionssteigerung von *Ngal* im Rahmen der Sepsis kommt, sind entsprechende Korrelationen von NGAL mit Funktionsparametern eines Organes im Hinblick auf die Eignung als Biomarker aufgrund der geringen Spezifität kritisch zu sehen.

Schlussfolgerungen und Ausblick

NGAL ist ein essentieller Bestandteil des unspezifischen Immunsystems, ein deutlicher Hinweis hierfür ist die erhöhte Morbidität und Mortalität NGAL-depletierter Mäuse bei gram-negativen Infektionen (Flo et al. 2004, Berger et al. 2006, Srinivasan et al. 2012). Dabei übt NGAL bakterio-statische Funktionen aus, in dem es durch Bindung an bakterielle Siderophore, das für das bakterielle Wachstum notwendige Eisen limitiert. Darüber hinaus ist NGAL wichtiger Bestandteil der Eisenhomöostase und trägt zur Ausbildung einer sog. Entzündungsanämie bei und hat weitere wichtige immunmodulatorische Effekte, die sich protektiv-regulierend auf die Funktion und Homöostase des Immunsystems auswirken. Vor diesem Hintergrund ist die Erforschung des NGAL-Metabolismus im Rahmen der Sepsis von großem Interesse. Um Aussagen über die Syntheseorte und die Dynamik der *Ngal*-Expression treffen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit die Expressionsveränderungen von *Ngal* im PCI-Modell der Sepsis in verschiedenen, maßgeblichen von der Sepsis betroffenen Organen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Folgende Hauptaussagen lassen sich hieraus ableiten (siehe hierzu auch Abbildung 27):

- ➔ Es existiert eine organübergreifende ausgeprägte *Ngal*-Hochregulation im PCI-Modell der Sepsis, die bereits nach 6h deutlich ausgeprägt ist und nach

24h weiterhin anhält, dabei ist die Reaktion insbesondere in der Leber auch nach 24h konsistent hoch.

- ➔ In der Leber und zum Teil auch im Herzen kommt es bereits durch die Scheinbehandlung zu einer moderaten Hochregulation von *Ngal*, dies deutet daraufhin, dass NGAL nicht ausschließlich als Ausdruck einer Organschädigung zu sehen ist, sondern zumindest zum Teil mit dem inflammatorischen Stimulus *per se* assoziiert ist.
- ➔ Immunhistochemisch konnte NGAL in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden, in der Leber sind dies Makrophagen und Hepatozyten, in der Niere Tubuluszellen und in der Lunge Typ II-Pneumozyten und Makrophagen. Ob das nachgewiesene NGAL dort synthetisiert oder aus dem Plasma aufgenommen wurde, lässt sich hierbei nicht differenzieren und könnte Gegenstand weiterer Arbeiten sein.
- ➔ Die Messungen der *Ngal*-Rezeptor-Expression zeigen organübergreifend eine im Vergleich zu den Veränderungen der *Ngal*-Expression geringfügige Herabregulation, dies korreliert mit mittlerer bis hoher Effektstärke mit der gegensätzlichen *Ngal*-Hochregulation. Die Ursache hierfür ist zu klären, beispielsweise könnte eine Herabregulation des NGAL-Rezeptors zu einer erhöhten systemischen Verfügbarkeit von NGAL beitragen.

Viele Zusammenhänge bezüglich des NGAL-Metabolismus sind jedoch weiterhin unklar. Dabei wären in weiteren Forschungsarbeiten unter anderem folgende Fragen zu klären:

- ➔ Welchen Regulationsmechanismen unterliegt NGAL und dessen spezifischer Rezeptor? Hat der Rezeptor eine unterschiedliche Affinität für Apo- vs. Holo-NGAL? Gibt es neben dem membranständigen Rezeptor einen löslichen Rezeptor wie dies beim Transferrin-Rezeptor der Fall ist?
- ➔ Welches Organ trägt in welchem Umfang zum NGAL-Plasmaspiegel bei? Studien zeigen hier uneinheitliche Daten (Leber vs. Niere als Hauptquelle des systemischen NGAL), aufgrund der Heterogenität der Studien ist die Vergleichbarkeit zum Teil eingeschränkt.

Von besonderem Interesse ist zudem die Erforschung eines therapeutischen Einsatzes von NGAL. Hierzu konnte bereits ein verbessertes Überleben im PCI-

Modell nach exogener Zufuhr von NGAL 1h *post infectionem* gezeigt werden (Otto et al. 2015). Hier besteht weiterer Forschungsbedarf hinsichtlich offener Fragen:

- ➔ Dosisabhängigkeit des NGAL-Effektes? Abhängigkeit des Effektes vom Zeitpunkt einer exogenen NGAL-Gabe? Welchen Einfluss haben Co-Morbiditäten auf den Effekt?
- ➔ Auch eine potenzielle biotechnologische Modifizierbarkeit der Liganden-Bindungstasche mit dem Ziel die Eisenbindungsfähigkeit von NGAL zu steigern, könnte in der Zukunft für therapeutische Zwecke von Interesse sein (Bao et al. 2015).

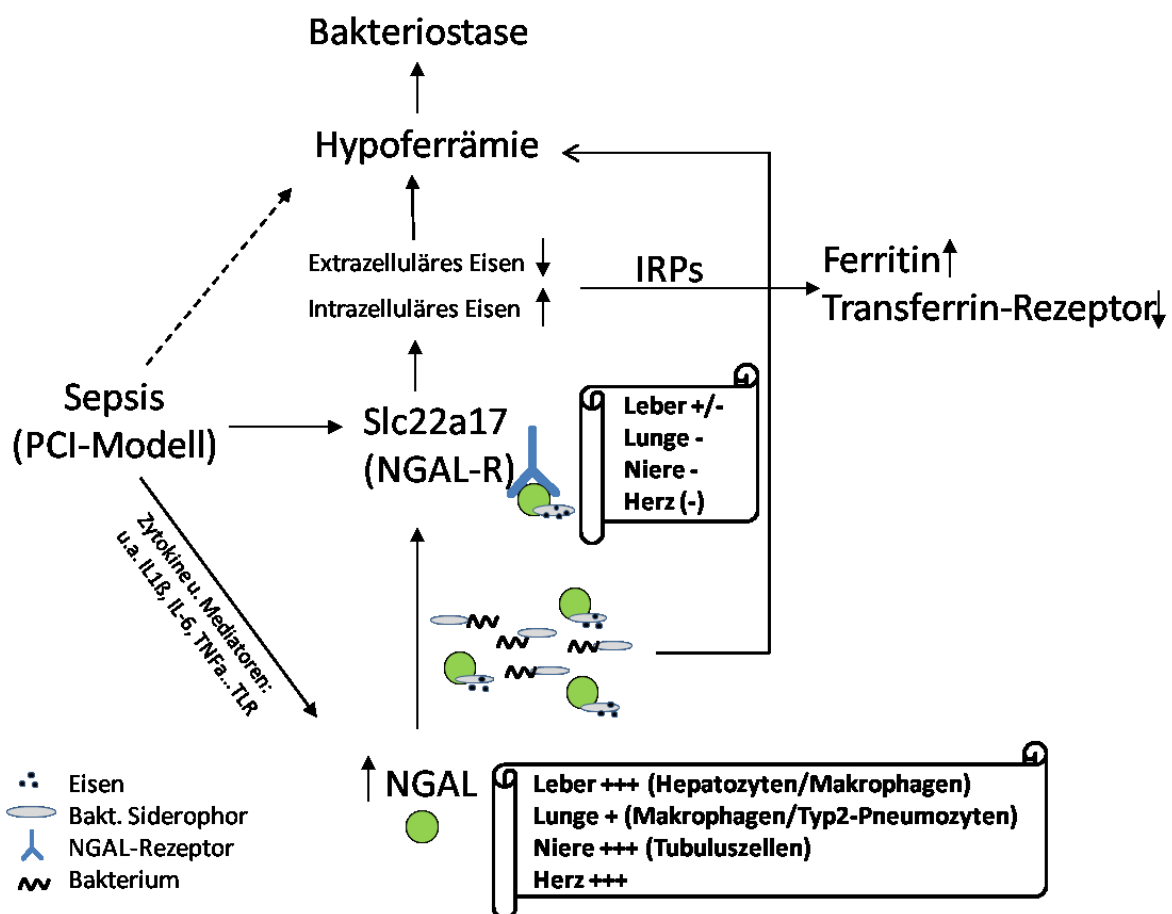


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des NGAL-Metabolismus mit Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Die *Ngal*-Expression wird maßgeblich durch den Einfluss proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren gesteigert, dies führt im PCI-Modell der Sepsis zu einer organübergreifend ausgeprägten *Ngal*-Expressionssteigerung. NGAL bindet im Plasma bakterielle Siderophore und daran gebundenes Eisen, hierdurch trägt es zur Ausbildung einer Hypoferrämie (Entzündungsanämie) bei und begrenzt so das bakterielle Wachstum. Die Aufnahme des NGAL-Siderophor-Komplexes stellt dabei neben dem Transferrin-System einen weiteren Mechanismus zur Aufnahme von Eisen in die Zelle dar und hat dadurch Einfluss auf die Translation eisensensitiver Gene wie Ferritin und den Transferrin-Rezeptor. Die Expression des *Ngal*-Rezeptors wird im PCI-Modell geringfügig herabreguliert.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung	II
1 Einleitung.....	1
1.1 Bedeutung und Mechanismen der Sepsis	1
1.2 Sepsisinduzierte Organschäden und die Rolle der einzelnen Organe im Rahmen der Sepsis.....	5
1.2.1 Niere	5
1.2.2 Leber.....	7
1.2.3 Lunge	10
1.2.4 Herz	11
1.3 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) bei Sepsis	12
1.3.1 Bezeichnung und molekulare Formen	12
1.3.2 Biologische Funktion und Signaltransduktion.....	14
1.3.3 Beteiligung von NGAL in der Regulation des Eisenmetabolismus bei systemischen Infektionen	16
1.3.4 Gewebsexpression und Regulation	18
1.3.5 NGAL als Akute-Phase-Protein der Leber	19
1.3.6 NGAL bei akuter Lungenschädigung	20
1.3.7 NGAL im Rahmen der akuten Nierenschädigung (AKI)	21
1.3.8 NGAL im Rahmen der (septischen) myokardialen Dysfunktion	22
2 Ziele der Arbeit / Fragestellung	23
3 Material und Methoden.....	25
3.1 Studiendesign.....	25
3.2 Tierexperimente.....	25
3.2.1 Versuchstiere	26
3.2.2 Polymikrobielle Peritonitis	26
3.2.3 Euthanasie und Organentnahme	27
3.3 Molekularbiologische Methoden	28
3.3.1 RNA-Isolierung.....	28

3.3.2	Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit am Nano-Drop Spectrophotometer	28
3.3.3	Qualitative RNA-Analyse am Experion-Elektrophorese-System	29
3.3.4	Ergebnisse der RNA-Analyse am Experion-System	30
3.3.5	cDNA-Synthese	31
3.3.6	Primerdesign.....	32
3.3.7	Real-Time-qPCR.....	33
3.3.8	Bestimmung von Ct-Werten.....	34
3.3.9	Schmelzkurvenanalyse	35
3.3.10	DNA-Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Produkte	35
3.3.11	Ermittlung der Primereffizienzen	36
3.3.12	Referenzgen-Analyse mittels <i>geNorm</i> und <i>NormFinder</i>	38
3.3.13	Ergebnisse der Referenzgen-Analyse	39
3.3.14	Relative Quantifizierung	41
3.3.15	Statistische Auswertung.....	41
3.3.16	Histologische Methoden.....	42
4	Ergebnisse	45
4.1	Genexpressionsanalyse der Zielgene	45
4.1.1	Ergebnisse der Genexpression für <i>Lcn2</i>	46
4.1.2	Ergebnisse der Genexpression für <i>Slc22a17</i>	47
4.1.3	Ergebnisse der Genexpression für <i>Fth1</i>	49
4.1.4	Ergebnisse der Genexpression für <i>Ftl1</i>	50
4.1.5	Ergebnisse der Genexpression für <i>Tfrc</i>	51
4.2	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen.....	53
4.2.1	Niere	53
4.2.2	Leber.....	55
4.2.3	Lunge.....	57
5	Diskussion	60
5.1	Leitmotiv	60
5.2	Grundsätzliche Eignung des Tiermodells	61
5.2.1	Translationale Tiermodelle in der Sepsisforschung	61
5.3	Einordnung der Ergebnisse in das klinische Umfeld.....	63

5.3.1	Vorbemerkung	63
5.3.2	Leber.....	63
5.3.3	Niere	67
5.3.4	Lunge.....	70
5.3.5	Herz	73
5.3.6	NGAL-Rezeptor (<i>Slc22a17</i>).....	74
5.3.7	Veränderungen wichtiger Eisenparameter im Modell der polymikrobiellen Sepsis und mögliche Zusammenhänge mit der <i>Ngal</i> -Expression	75
5.3.8	Überlegungen über die funktionelle Rolle von NGAL im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion	77
5.3.9	Diagnostische Wertigkeit von Plasma- oder Urin-NGAL	80
6	Literaturverzeichnis	83
7	Danksagung	96
8	Ehrenwörtliche Erklärung	97

1 Einleitung

1.1 Bedeutung und Mechanismen der Sepsis

Die Sepsis ist eine systemische Reaktion auf eine schwere Infektion des Wirtes. Hierbei spielen sowohl inflammatorische als auch antiinflammatorische Antworten des Immunsystems eine bedeutende Rolle, im Verlauf kommt es dabei zu einer gestörten Homöostase des Immunsystems mit „immunologischer Dissonanz“ (Bone et al. 1997), was zum Fortschreiten der Erkrankung mit Dysfunktion mehrerer Organe führen und mit dem Tod enden kann. Die genauen Ursachen und Zusammenhänge, die zu dieser Störung führen, sind bis heute unzureichend verstanden.

Die Sepsis ist in Deutschland nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache, basierend auf Daten des deutschen Sepsis-Netzwerkes aus dem Jahr 2005 (Brunkhorst 2006), sie hat damit auch eine hohe gesundheitsökonomische Bedeutung.

Die Letalität ist hoch und lag im Progress-Register, in das über 12 000 Patienten eingeschlossen wurden, bei knapp 50% (Martin et al. 2009). Im Jahre 1992 wurde im Rahmen der Konsensus-Konferenz des *American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine* (APPC/SCCM) eine Definition der Sepsis erarbeitet (Bone et al. 1992), die sich auch in den Leitlinien 2010 wiederfand (Reinhart et al. 2010). 2015 wurden diese Kriterien aufgrund von Fortschritten und neuen Erkenntnissen in der Pathobiologie, im Management und der Epidemiologie der Sepsis von einem Expertengremium überarbeitet und 2016 eine neue Consensus-Definition („SEPSIS-3“) veröffentlicht. Demnach lag beim vorherigen Modell, das ein *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), eine Sepsis und eine schwere Sepsis sowie einen septischen Schock unterschied, der Fokus zu sehr auf der Komponente der Inflammation, zudem war nach Meinung der Autoren die Spezifität und Sensitivität der Kriterien zur Diagnose eines SIRS zu gering (Singer et al. 2016). Nach der nun aktuellen Definition wird eine Sepsis als lebensbedrohliche Organdysfunktion angesehen, die durch eine dysregulierte Immunantwort auf eine Infektion ausgelöst wird (Singer et al. 2016). Zur Beurteilung einer der sechs berücksichtigten Organ(dys)funktion wird der *sequential [sepsis-related] organ failure assessment score* (SOFA-Score) herangezogen, der einen Punktwert von 0-4 ergibt (siehe Abbildung 2). Bei einer akuten Änderung des SOFA-Scores um 2 oder mehr Punkte liegt eine Organdysfunktion vor. Der septische Schock wird als spezielle

Form der Sepsis definiert, bei der die zugrundeliegenden zellulären und metabolischen Störungen sowie Störungen des Kreislaufes derart ausgeprägt sind, dass eine Therapie mit Vasopressoren notwendig ist, um den mittleren arteriellen Druck >65mmHg zu halten, und trotz Flüssigkeitstherapie ein erhöhter Serum-Laktat-Spiegel (>2 mmol/l) messbar ist (Singer et al. 2016).

System	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
Pao ₂ /Fio ₂ , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
Coagulation					
Platelets, ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular					
MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose) ^b	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 ^b	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 ^b	
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score ^c	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200

Abbreviations: Fio₂, fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; Pao₂, partial pressure of oxygen.

^a Adapted from Vincent et al.²⁷

^b Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour.

^c Glasgow Coma Scale scores range from 3-15; higher score indicates better neurological function.

Abbildung 2: SOFA-Score

Darstellung der für die Beurteilung relevanten Organsysteme und deren Messparameter (Atmung, Gerinnung, Leber, Herz-Kreislauf, ZNS und Niere). Je nach Ausmaß der Veränderungen wird für jedes System ein Punktwert von 0 (geringste) bis 4 (schwerste Funktionsstörung) vergeben. Die einzelnen Punktwerte werden dann addiert (Singer et al. 2016).

Pathophysiologisch konnten in Studien verschiedene, unabhängige Faktoren, die bei der Entwicklung der Erkrankung eine wichtige Rolle spielen, identifiziert werden.

Grundsätzlich kommt es bei einer Inokulation eines infektiösen Agens zunächst zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit dem Ziel, den Herd einzugrenzen, den Keim zu eliminieren und den Ausgangszustand wiederherzustellen. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die natürlichen epithelialen Barrieren sowie die Zellen des unspezifischen Immunsystems, primär sind hierbei ortsständige Makrophagen beteiligt, welche über Zytokine, z.B. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und andere Mediatoren weitere Zellen, hierunter dendritische Zellen und zirkulierende neutrophile Granulozyten an den Ort der Infektion rekrutieren. Weiterhin werden E- und P-Selektine am Endothel induziert, welche eine Verlangsamung und ein Andocken der Neutrophilen an das Endothel bewirken, was in der Folge über Chemokine (z.B. IL-8) eine feste Bindung der

Leukozyten zum Endothel und eine anschließende Migration ins Gewebe begünstigt (Butcher 1991).

Makrophagen und Neutrophile haben als phagozytierende Zellen eine elementare Funktion in der primären Abwehr des Erregers. Sie sind in der Lage durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und weiterer antimikrobieller Substanzen (Lysozym, Defensine, Proteasen) Bakterien intrazellulär abzutöten. Als Zellen des unspezifischen Immunsystems erkennen sie über sog. *pattern recognition receptors* (PRR) mikrobielle Strukturen, die von vielen Bakterien, Viren oder Pilzen exprimiert werden, aber auch Komplementfaktoren und Immunglobuline (Stearns-Kurosawa et al. 2011). Die am besten charakterisierten PRR sind hierbei die *Toll-like* Rezeptoren (TLR), von denen mindestens zehn Entitäten bekannt sind. Beispielsweise spielt TLR4 über die Bindung von Lipopolysacchariden (LPS) bei der Erkennung gram-negativer Bakterien eine wesentliche Rolle.

Kann die Infektion durch Mechanismen der unspezifischen Abwehr nicht lokal eingedämmt werden, kann es zu einer systemischen Reaktion kommen, in deren Folge es zu einer Störung der Homöostase zwischen pro- und antiinflammatorischen Antworten kommen kann. Es wurde gezeigt, dass bereits in der frühen Phase der Infektion antiinflammatorische Mediatoren freigesetzt werden, welche das Ausmaß der Entzündungsreaktion begrenzen sollen. Da diesem Prozess vormals eine besondere Bedeutung zuerkannt wurde, erfolgte bei dem postulierten Überwiegen dieser Mechanismen die Bezeichnung eines *compensatory antiinflammatory response syndrome* (CARS) (Bone 1996). In welchem Ausmaß welche Reaktion erfolgt, hängt unter anderem von der Lokalisation und dem dort herrschenden Mikromilieu ab, dies wurde als sog. „Kompartimentalisierung“ der Immunantwort bezeichnet (Cavaillon und Annane 2006). Weitere Faktoren, die Art und Ausmaß der Wirtsreaktion determinieren, sind das Alter und die Vorerkrankungen des Patienten. Weiterhin konnten folgende, an der immunsuppressiven Antwort beteiligte Faktoren in Studien belegt werden: Shift von proinflammatorischen Th1 zu antiinflammatorischen Th2-Helferzellen und damit in Verbindung stehende Anergie von T-Lymphozyten, Apoptose von CD4+-Lymphozyten, B-Lymphozyten und intestinalen epithelialen Zellen (Hotchkiss und Karl 2003).

Von diesen Faktoren abhängig sind verschiedene in Abbildung 3 dargestellte Szenarien der Immunantwort möglich, welche das frühe Versterben von Patienten im Rahmen einer Hyperinflammation und das spätere Versterben durch eine

persistierende Immunsuppression und rekurrende Infektionen erklären könnten (Hotchkiss et al. 2013).

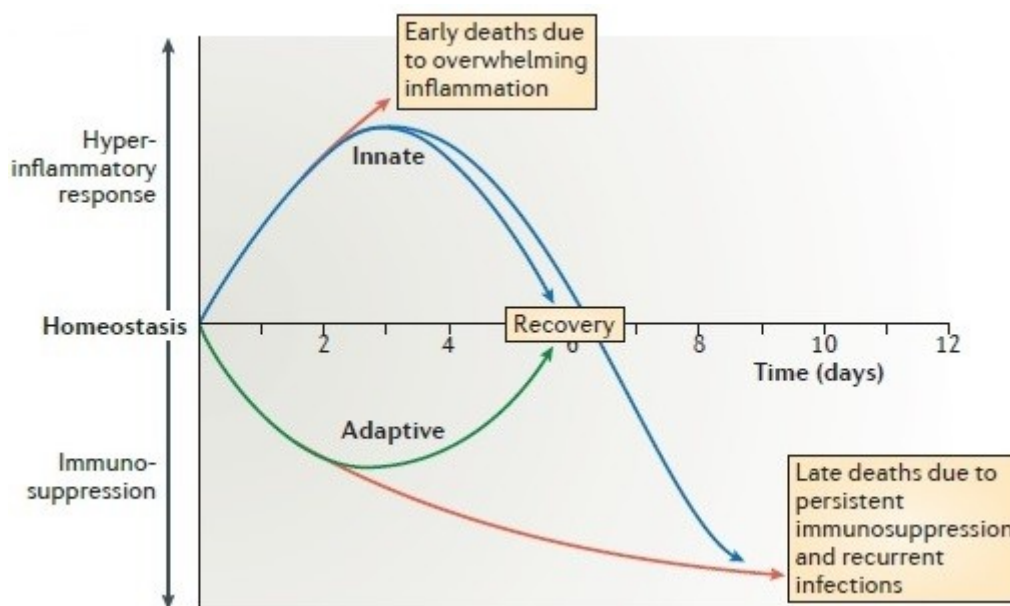


Abbildung 3: Vereinfachte und schematisierte Darstellung der möglichen Wirtsreaktionen im Rahmen einer Sepsis (Hotchkiss und Karl 2003).

Im Verlauf der Sepsis kommt es aufgrund der dysregulierten Wirtsantwort häufig zu einer oder mehreren Organdysfunktionen, was dann als Multi-Organ-Dysfunktionssyndrom (*multiple organ dysfunction syndrome*, MODS) bezeichnet wird (Bone 1996), das durch eine hohe Letalität charakterisiert ist (Bone et al. 1997) und das leitende Kriterium für die aktuelle Krankheitsdefinition („SEPSIS-3“) darstellt (Singer et al. 2016). Welche Mechanismen hierfür ursächlich sind, ist unzureichend verstanden. Als ein wesentlicher Faktor wird die Mikrozirkulationsstörung wichtiger Organe gesehen, hierbei kommt es durch ein lokales hyperinflammatorisches Milieu zu einer endothelialen Dysfunktion mit gestörter Gefäßpermeabilität und Bildung von Mikrothromben, in dessen Folge die Sauerstoffausschöpfung des Blutes eingeschränkt ist und es zu Minderperfusion der Organe kommen kann (Ince 2005). Hierzu gegensätzlich wurde an einer Autopsie-Studie von Hotchkiss et al. gezeigt, dass die Organe von akut verstorbenen Patienten weit weniger histologische Veränderungen aufwiesen als anhand der klinischen Organdysfunktion zu erwarten gewesen wäre. Darauf basierend wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Zellen in einen Ruhezustand verfallen, was die teilweise zu beobachtende, vollständige *Restitutio ad Integrum* bei von schwerer Sepsis betroffenen Patienten erklären könnte (Hotchkiss und Karl 2003). Zunehmend gewinnt auch das Konzept eines

Ungleichgewichtes zwischen induziertem Organschaden und Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion an Bedeutung (Bauer et al. 2018). Hierbei spielen die Modelle der Krankheitstoleranz und Resistenz eine zentrale Rolle. Dabei subsummiert der Begriff der Krankheitstoleranz verschiedene Mechanismen, die es dem Organismus ermöglichen eine Infektion zu tolerieren ohne das infektiöse Agens zu eliminieren (Medzhitov et al. 2012). Die Resistenz hingegen bezeichnet die Abwehrmechanismen mit dem primären Ziel der Keimelimination. Es existieren einige Hinweise, dass ein gestörtes Gleichgewicht mit Überwiegen der Resistenzmechanismen gegenüber Strategien der Krankheitstoleranz maßgeblich zu den sepsisinduzierten Organschäden beiträgt, dabei sind sowohl eine Dysregulation der zellulären Signaltransduktion als auch metabolischer Funktionen bedeutsam (Bauer et al. 2018).

Klinisch kommt es bei einer Sepsis häufig zu einem vorhersehbaren Verlauf mit früher respiratorischer Insuffizienz im Rahmen eines Lungenversagens, dann werden Nieren- und Leberschäden manifest (Deitch 1992). Eine Nierenschädigung tritt bei Patienten mit schwerer Sepsis allerdings bereits wesentlich früher ein (Poukkanen et al. 2013), wird jedoch durch den Anstieg des Kreatinin bei erst >50% Nierenschädigung spät entdeckt. Nachfolgend sollen die Veränderungen der einzelnen Organe während einer Sepsis dargestellt werden.

1.2 Sepsisinduzierte Organschäden und die Rolle der einzelnen Organe im Rahmen der Sepsis

1.2.1 Niere

Die Niere spielt eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Sepsis. Es ist bekannt, dass die Sepsis den häufigsten Grund für eine akute Nierenschädigung (*acute kidney injury*, AKI) auf Intensivstationen darstellt (Uchino et al. 2005) und dass Patienten mit AKI eine höhere Mortalität aufweisen (Bagshaw et al. 2008). Weiterhin besteht erwartungsgemäß eine positive Korrelation zwischen der Schwere des AKI und der Mortalität bei kritisch kranken Patienten, beim dialysepflichtigen AKI liegt die Mortalität bei 40-50% (Wald et al. 2015) bzw. bei 60-80%, sofern weitere Organdysfunktionen vorliegen (Chao et al. 2012, Chertow et al. 1995). Hierfür ursächlich wird eine Reihe von Mechanismen diskutiert. Die dabei eingeschränkte Eliminierung harnpflichtiger Substanzen scheint nicht der entscheidende Faktor zu sein, zum einen hat sich seit Einführung der

Nierenersatztherapie die Mortalität des AKI bei kritisch Kranken nicht wesentlich verringert, zum anderen konnte gezeigt werden, dass Patienten mit nicht dialysepflichtigem AKI eine höhere Mortalität aufweisen als Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (Clermont et al. 2002). Hierbei spielen unter anderem auch an anderen Organen induzierte Schäden eine Rolle, beispielsweise konnte gezeigt werden, dass über eine Erhöhung von *high mobility group box protein 1* (HMGB1) durch die geschädigte Niere und konsekutive Aktivierung von TLR4 in der Lunge eine Neutrophilen- Infiltration induziert wird (Doi 2016).

In Bezug auf die Entstehung der Nierenschädigung im Rahmen der Sepsis gilt das frühere Paradigma, dass ein reduzierter renaler Blutfluss der entscheidende und möglicherweise alleinige Faktor für die Entstehung des AKI bei Sepsis ist, mittlerweile als überholt. So konnte gezeigt werden, dass ein AKI auch bei erhöhtem renalen Blutfluss entstehen kann (Langenberg et al. 2005, Langenberg et al. 2006). Es gibt mehrere Hinweise, dass folgende drei Mechanismen bei der Entstehung des septischen AKI maßgeblichen Anteil haben: 1. inflammatorische Prozesse 2. eine gestörte Mikrozirkulation und 3. adaptive Zellreaktionen auf die Schädigung (Zarbock et al. 2014), dies soll im Folgenden skizziert werden.

Inflammatorische Mediatoren von Pathogenen (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP) und von aktivierten Zellen des Immunsystems (*damage associated molecular pattern*, DAMP) werden nicht nur von Immunzellen erkannt, sondern lösen auch eine Reaktion an epithelialen oder parenchymatösen Zellen aus, dies geschieht z.B. über den membranständigen TLR4 als „Prototyp“ eines PRR. PAMP/DAMP können das tubuläre Epithel sowohl über die peritubuläre Mikrozirkulation als auch über die tubuläre Zellseite nach glomerulärer Filtration erreichen und eine immunmodulatorische Zellantwort auslösen. Kommt es zu einer überschießenden Immunantwort („Zytokin-Sturm“), wie es bei der Sepsis der Fall ist, können Zellschäden auch in anderen Organen entstehen (*remote organ failure*) (Zarbock et al. 2014). Verstärkt wird dieses „Gefahren“-Signal u.a. durch die verlängerte Kontaktzeit von aktivierten Leukozyten und inflammatorischen Mediatoren mit dem tubulären Epithel in *low flow*-Arealen im Rahmen der Mikrozirkulationsstörung, hierbei entsteht durch die Gewebshypoxie zusätzlicher oxidativer Stress (Gomez et al. 2014). Dementsprechend werden im Tiermodell bereits vier Stunden nach einer caecalen Ligatur und Punktion erhöhte Konzentrationen an reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies festgestellt, die vor allem in Bereichen ohne kapillären Blutfluss

auftreten (Wang et al. 2012) und dort histologisch zur typischen apikalen Vakuolenbildung führen (Wu et al. 2007). Interessanterweise finden sich darüber hinaus beim septischen AKI kaum histopathologische Veränderungen, insbesondere zeigen sich gegenüber dem Modell der Ischämie mit anschließender Reperfusion (*ischemia-reperfusion injury*) oder einer Hämorrhagie kaum Anzeichen einer Nekrose oder Apoptose (Rosen und Heyman 2001, Sato et al. 1978), was die mögliche *Restitutio ad Integrum* bei Sepsispatienten erklären kann. Es gibt Hinweise, dass epitheliale Tubuluszellen durch Umorganisation der Energienutzung und einer Induktion von Mitophagie und Zellzyklusarrest die Apoptose zunächst verhindern können (Gomez et al. 2014).

Andererseits muss erwähnt werden, dass eine akute Nierenschädigung nicht ausschließlich als Folgeerscheinung einer Sepsis diskutiert werden darf. Eine vorbestehende Nierenschädigung erhöht das Risiko einer Infektion um ein Vielfaches, sodass die Nierenfunktion und im Besonderen die tubuläre Dysfunktion eine wichtige immunmodulatorische Rolle spielen, weiterhin gibt es Hinweise, dass inflammatorische Kaskaden, die durch eine endotheliale Dysfunktion im Rahmen eines SIRS ausgelöst werden, bei einer vorbestehenden Nierenschädigung weiter „dysreguliert“ werden (Honore et al. 2011).

1.2.2 Leber

Die Leber spielt aufgrund ihrer zentralen Funktion als Stoffwechselorgan und als Hauptorgan für die Elimination von Bakterien aus dem mesenterialen Gefäßbett eine Schlüsselrolle bei der Sepsis (Nessler et al. 2012). Trotz ihrer Wichtigkeit existieren nach wie vor keine verlässlichen diagnostischen Mittel, die in der klinischen Routine eine frühe Leberschädigung nachweisen können (Dhainaut et al. 2001), sodass die Inzidenz der Leberschädigung weiterhin nicht genau einzuschätzen ist; die Daten variieren je nach Definition der Leberschädigung und Beobachtungszeitraum deutlich zwischen 2,75- 20% für das akute Leberversagen und 35-46% für die akute Leberdysfunktion, meist ist Bilirubin der am häufigsten verwendete „Biomarker“ zur Diagnose einer Leberdysfunktion (Nessler et al. 2012).

In einer prospektiven Beobachtungsstudie wurden Marker der Leberschädigung im Rahmen der Sepsis *ex vivo* und *in vivo* evaluiert, hierbei konnte mittels intravenös verabreichtem Indocyanin-Grün (ICG) gezeigt werden, dass neben der beeinträchtigten Mikrozirkulation v.a. die exkretorische Funktion der Leber besonders sensitiv für schädliche Stimuli beim septischen Patienten ist (Kortgen et al. 2009).

Die Daten dieser Studie zeigen auch, dass mittels Monitoring des ICG bei 74% eine akute Leberschädigung nachgewiesen werden kann, im Vergleich zu einer Inzidenz von lediglich 42% bei der Verwendung von Bilirubin als Marker, das beim kritisch Kranken weiteren Einflussfaktoren ausgesetzt ist (Kortgen et al. 2009). Dies deutet darauf hin, dass es bei einer Sepsis bereits früh zu einer Leberdysfunktion kommt, die mit Routineparametern schlecht messbar ist. Für eine frühe Leberschädigung ergaben sich auch in experimentellen Studien am PCI-Modell (*peritoneal contamination and infection*, PCI) der Sepsis weitere Belege (Recknagel et al. 2012).

Klinisch können bei einer akuten Leberschädigung zwei gut charakterisierte Veränderungen beobachtet werden, zum einen kann es im Rahmen von hämodynamischen Einschränkungen zur einen akuten hypoxischen Hepatitis mit Leberzellnekrose kommen, die durch einen akuten und ausgeprägten, aber meist transienten Anstieg der Transaminasen sowie einen akuten Abfall des Prothrombinlevels (mit entsprechender Blutungsneigung) charakterisiert ist. Die hier vorherrschenden Mechanismen sind komplex und unvollständig verstanden, ein wesentlicher Faktor scheint die Schädigung im Rahmen einer Reperfusion nach vorhergehender Ischämie zu sein (Nessler et al. 2012). Zum anderen die Sepsis-induzierte Cholestase als Folge eines zunehmenden intrahepatischen Schadens, der durch eine meist intrahepatische Cholestase mit Anstieg des Bilirubins vergesellschaftet ist. Die zur Bildung und Sekretion der Galle notwendigen energieaufwendigen Mechanismen werden hierbei durch Hypoxie und/oder Hypoperfusion empfindlich gestört (Fuchs und Sanyal 2008).

Die Vorstellung, dass es bei der Sepsis zu einem typischen biphasischen Verlauf mit initialer ischämisch-hypoxischer Hepatitis und einer einige Tage verzögert auftretenden Cholestase kommt, kann jedoch für das Kollektiv der Patienten mit septischem Schock nicht bestätigt werden, da es bereits vom ersten Tag an zu einer Störung der exkretorischen Funktion kommt und nur ein geringer Teil der Sepsispatienten den beschriebenen ausgeprägten Transaminasenanstieg als Korrelat der hypoxischen Hepatitis zeigt (Kortgen et al. 2009).

Darüber hinaus trägt die Leber durch ihre Reaktion auf einen septischen Stimulus auch selbst maßgeblich zur Verstärkung bzw. Modulation der Immunantwort bei. Zum einen hat sie durch Synthese von Akute-Phase-Proteinen maßgeblichen Anteil

an der systemischen proinflammatorischen Antwort, dies wird hauptsächlich über IL-6 getriggert (Vary und Kimball 1992). Zum anderen kommt es im Rahmen der Akute-Phase-Antwort zu einer Hemmung des Protein C-Stoffwechsels und in der Folge zu einer pro-koagulatorischen Wirkung auf den Organismus (Nessler et al. 2012). Weiterhin stellen die in der Leber ortsständigen Kupffer-Zellen 80% der Gesamt-Makrophagen-Population dar und spielen eine wichtige Rolle für die Eliminierung von Bakterien und Endotoxinen sowie für die Verstärkung der inflammatorischen Antwort durch Zytokinproduktion (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-6, G-CSF, IL-12, IL-18, GM-CSF). Darüber hinaus interagieren Kupffer-Zellen mit anderen Blutzellen (Thrombo-, Erythro- und Leukozyten) (Nessler et al. 2012, Dhainaut et al. 2001). Durch die Adhäsion von Neutrophilen an sinusoidale endotheliale Zellen wird die Bildung von sinusoidalen Mikrothromben gefördert und damit die hepatische Mikrozirkulation negativ beeinflusst (Dhainaut et al. 2001). Auf molekularer Ebene kommt es durch Lipopolysaccharide (LPS) zu zytotoxischen Effekten auf die Hepatozyten und zur Induktion metabolischer Veränderungen durch die Hepatozyten. In Bezug auf die von Kupffer-Zellen produzierten Zytokine ist insbesondere TNF- α von zentraler Bedeutung für die Entwicklung einer Sepsis, unter anderem in dem es die Produktion von IL-6 durch Hepatozyten stimuliert (Nessler et al. 2012). IL-6 wiederum ist selbst eines der zentralen proinflammatorischen Zytokine, das die Produktion der Akute-Phase-Proteine stimuliert (Dhainaut et al. 2001), andererseits jedoch auch die Bildung von *transforming growth factor β* (TGF- β) induziert, das als wichtiges antiinflammatorischen Zytokin das Ausmaß der inflammatorischen Antwort begrenzt (Ayala et al. 1993). Ein weiteres wichtiges Zytokin, das zur hepatozellulären Schädigung beiträgt, ist das ebenfalls von Kupffer-Zellen produzierte IL-18, das über die Bildung von Interferon- γ zur Apoptose von Hepatozyten beiträgt (Tsutsui et al. 1997). Einschränkend hierzu bemerkten Recknagel et al., dass die aktuellen Erkenntnisse hauptsächlich auf Experimenten beruhen, die mit Endotoxämie-Modellen arbeiteten und stellten fest, dass sich die Wirtsreaktion in einem PCI-Modell deutlich von den Endotoxämie-Modellen unterscheidet, was die klinische Anwendbarkeit der oben beschriebenen Erkenntnisse im Kollektiv von Sepsispatienten deutlich einschränkt. Im PCI-Modell kommt es zu einer deutlich geringeren Ausschüttung von Zytokinen, wohingegen deutlich häufiger eine Cholestase mit resultierender Gelbsucht beobachtet wird (Recknagel et al. 2013).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Leber mit erregerspezifischen molekularen Signaturen reagiert, dies konnte beim Vergleich des PCI-Modells mit intraperitonealer und systemischer Candida-Infektion sowohl auf transkriptioneller als auch auf metabolischer Ebene gezeigt werden (Schaarschmidt et al. 2018). Auf transkriptioneller Ebene wurden hierbei Veränderungen in 56 funktionellen Netzwerken identifiziert, die spezifisch für das PCI-Modell waren. Insgesamt zeigte sich in dieser Studie im frühen Stadium der Infektion (nach 6h) unabhängig vom Erreger eine Herabregulation des Lipid-Stoffwechsels mit Defekten in der β -Oxidation und eine Herabregulation der Gallensäuresynthese. Die Unterschiede auf metabolischer Ebene bestanden unter anderem in einer Akkumulation unkonjugierter (PCI-Modell) vs. konjugierter (Candida-Infektion) Gallensäuren und einer Störung der exkretorischen Funktion (PCI-Modell) vs. prähepatischer Dysfunktion für den Transport verschiedener Substanzen (Candida-Infektion) (Schaarschmidt et al. 2018).

1.2.3 Lunge

Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben, kommt es im Verlauf einer Sepsis häufig zu einer Lungenschädigung (*acute lung injury*, ALI) und im Vollbild zu einem Lungenversagen (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS). Ungefähr 40% der Sepsispatienten entwickeln ein ALI/ARDS (Newman 1985, Hudson et al. 1995, Tsushima et al. 2009). Welche pathophysiologischen Mechanismen zur Entwicklung einer Lungenschädigung bei der Sepsis führen ist nur unzureichend verstanden (Perl et al. 2011). Die resultierende Pathologie ist letztlich eine Beeinträchtigung der alveolo-kapillären Barriere, was zur Ausbildung eines proteinreichen Ödemes im Interstitium und in den Alveolen führt und in der Folge den Gasaustausch beeinträchtigt (Perl et al. 2011). Eine wichtige Rolle spielen hierbei verschiedene Chemokine und Zytokine, hierbei sind insbesondere IL-8, TGF- β und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zu nennen (Sharp et al. 2015). So kommt es unter anderem durch IL-8 getriggert zu einer vermehrten Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten, die durch die Freisetzung proteolytischer Enzyme und reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies zu einer weiteren Gewebsschädigung beitragen (Sharp et al. 2015). Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Apoptose epithelialer alveolärer Zellen, ob dies Folge oder Ursache der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ist, ist bisher ungeklärt (Perl et al. 2011). Auf Ebene des Endothels kommt es durch die Inflammation zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems durch die Expression von

Gewebe- und von Willebrand-Faktor (vWF) und eine gleichzeitig verminderte Aktivität der von Willebrand-Faktor spaltenden Protease (ADAMTS13), was die Ausbildung von Mikrothromben begünstigt (Claus et al. 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Endotoxin von gram-negativen Bakterien in der Lage ist über TLR4 am Endothel eine Reihe von Immunantworten auszulösen (Maniatis et al. 2008).

1.2.4 Herz

Die myokardiale Depression im Rahmen der Sepsis ist ein bekanntes Phänomen, auch wenn keine validen Daten zur Häufigkeit vorliegen. Nach Schätzungen anhand echokardiographischer Daten liegt diese bei 40-50% der Patienten im septischen Schock vor (Rudiger und Singer 2007).

Funktionell handelt es sich bei der septischen Kardiomyopathie um eine globale (systolische und diastolische) Pumpfunktionsstörung des linken und rechten Herzens (Vieillard-Baron 2011). Da es im Rahmen der Sepsis zu einer Erniedrigung des Gefäßwiderstandes und damit zu einer Hypotonie mit Minderperfusion der Organe kommt, erhöht sich kompensatorisch das Herzminutenvolumen, wodurch die Durchblutung verbessert werden soll. Diese hyperdynamische Kreislaufsituation mit erhöhtem Herzminutenvolumen und reduziertem Gefäßwiderstand maskiert eine zugrundeliegende myokardiale Depression zunächst (Antonucci et al. 2014). Die Inzidenz der echokardiographisch messbaren systolischen Dysfunktion nimmt im Verlauf der Sepsis zu (Repesse et al. 2013). Dies liegt jedoch nicht primär an einer Verschlechterung der myokardialen Kontraktilität, sondern wird maßgeblich durch die Erhöhung der Nachlast (des arteriellen Druckes) durch therapeutische Maßnahmen (Flüssigkeitstherapie, Vasopressoren, etc.) verursacht, denn die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, als Maß für die systolische Funktion, hängt neben der myokardialen Kontraktilität maßgeblich von der Nachlast ab. Dies bedeutet die myokardiale Depression wird durch die therapiebedingte Nachlasterhöhung erst sichtbar. Dabei wurde in mehreren tierexperimentellen Studien nachgewiesen, dass die septische Kardiomyopathie *per se*, reflektiert durch die reduzierte linksventrikuläre Kontraktilität, konstant ist (Vieillard-Baron 2011, Repesse et al. 2013). Pathogenetisch wurden multiple Faktoren identifiziert, ohne dass deren komplexes Zusammenwirken hinreichend verstanden ist, u.a. werden eine Störung der Kalziumhomöostase, der Einfluss proinflammatorischer Zytokine und inflammatorischer Signale über *Toll-like* Rezeptoren (TLR) neben genetischen und einigen anderen molekularen Faktoren verantwortlich gemacht (Antonucci et al.

2014). Eine spezifische Behandlung für die septische Kardiomyopathie existiert nicht, dies ist auch der Feststellung geschuldet, dass das Herz primär als „Opfer“ denn als „Akteur“ im Rahmen der Sepsis agiert (Antonucci et al. 2014). Grundsätzlich erfolgen die Behandlung der zugrundeliegenden Infektion sowie eine symptomatische Therapie mit Vasopressoren, Inotropika und Flüssigkeitsmanagement zur Verbesserung der Organperfusion.

Sowohl im Herzen als auch in der Niere zeigten sich in einer post-mortem-Studie im Vergleich zur ausgeprägten funktionellen Dysfunktion nur geringe strukturelle Schäden am Myokard (Takasu et al. 2013), was die klinische Beobachtung erklären kann, dass die septische Kardiomyopathie meist reversibel ist (Vieillard-Baron 2011).

1.3 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) bei Sepsis

Aufgrund der nach wie vor hohen Letalität und der nur partiell verstandenen komplexen pathobiochemischen Prozesse der Sepsis, besteht ein hohes Interesse die Mechanismen der Sepsis weiter zu entschlüsseln, um hieraus in der Zukunft effektivere diagnostische und therapeutische Strategien zu entwickeln. Im Rahmen dessen konnten in unserer Arbeitsgruppe anhand von Microarray-basierten Genexpressionsanalysen im Mausmodell der Sepsis (PCI-Modell) einige Transkripte identifiziert werden, die eine deutliche Expressionserhöhung bei einer Sepsis zeigen (Weber 2010). Eines dieser stark hochregulierten und hochsignifikant differentiell exprimierten Gene war in diesen Untersuchungen das NGAL-kodierende Transkript, welches bei der Dateninterpretation der genannten Arbeit nicht berücksichtigt wurde, sodass dieses von Interesse für weitere Betrachtungen am Sepsismodell war.

Nachfolgend soll zunächst ein allgemeiner Überblick über das Protein NGAL gegeben werden, anschließend sollen das Expressionsverhalten im Rahmen von systemischen Infektionen bzw. Sepsis und bekannte Funktionen anhand der bestehenden Literatur beschrieben werden.

1.3.1 Bezeichnung und molekulare Formen

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) wurde initial als 25kDa großes Protein in Form eines Heterodimers (135 kDa) assoziiert mit neutrophiler Gelatinase (*matrix metalloproteinase 9*, MMP-9) in humanen Neutrophilen entdeckt, woraus sich die Bezeichnung ableitet (Kjeldsen et al. 1993). Weitere in der Literatur verwendete Homologe sind Lipocalin 2 (Lcn2), Human Neutrophil Lipocalin, Uterocalin, Siderocalin, sip24. Analysen der Aminosäuresequenz zeigten eine starke Ähnlichkeit

zum Mausprotein 24p3, welches bereits als Lipocalin identifiziert wurde, sodass 24p3 als murines Homolog von NGAL gilt, wobei die Bezeichnungen oft synonym verwendet werden. Lipocaline im Allgemeinen sind Proteine, die unterschiedlichste biologische Funktionen ausüben, jedoch eine gemeinsame Tertiärstruktur mit einer anti-parallelen Beta-Fass-Struktur besitzen, die aus acht Beta-Faltblättern aufgebaut ist und eine Kelch-ähnliche Struktur formiert (siehe Abbildung 4). Aufgrund hydrophober Aminosäuren ging man zunächst davon aus, dass NGAL primär kleine lipophile Moleküle bindet (Kjeldsen et al. 1993, Flower 1996, Chu et al. 1998). Aufgrund struktureller und biochemischer Besonderheiten des Kelches fand man später heraus, dass NGAL im Gegensatz zu anderen Lipocalinen in der Lage ist, auch hydrophile Moleküle zu binden (Goetz et al. 2000, Bao et al. 2015), von besonderem Interesse ist hierbei die Bindung an Eisenbindeproteine (sog. Siderophore) unterschiedlichen Ursprunges (Bao et al. 2015). Neben der oben genannten Form als Heterodimer (135 kDa) existiert NGAL weiterhin als Monomer (25 kDa) oder Homodimer (46 kDa) in sekundären Granula der Neutrophilen (Kjeldsen et al. 1993). Die niedermolekularen Formen (<100kDa) werden glomerulär filtriert, sodass die Niere einen wesentlichen Anteil an der Regulation des normalen Plasmaspiegels hat, welcher unter physiologischen Bedingungen bei der Maus ca. 20ng/ml beträgt (Kuwabara et al. 2009, Paragas et al. 2012), beim Menschen etwa 35ng/ml (Otto et al. 2015). Im physiologischen Zustand tragen die Neutrophilen zu einem substantiellen Teil des NGAL-Plasma-Spiegels bei, dies konnte sowohl an Mäusen als auch an neutropenischen Patienten vor Stammzelltransplantation gezeigt werden (Kanda et al. 2015). Hierbei lagen beim Menschen 82% des Serum-NGAL in einer hochmolekularen (>100kDa) Form vor, allerdings waren davon <30% als Heterodimer mit MMP9 assoziiert, sodass postuliert wird, dass weitere bisher nicht bekannte hochmolekulare Formen von NGAL existieren (Kanda et al. 2015). Weiterhin wird humanes und murines NGAL durch Polyamine modifiziert, dabei steigert die Polyaminierung die Elimination, wohingegen die Deamidierung das Protein stabilisiert und eine Akkumulation im Gewebe begünstigt (Li et al. 2019), letzteres wurde in der Arterienwand und im Herzen beobachtet.

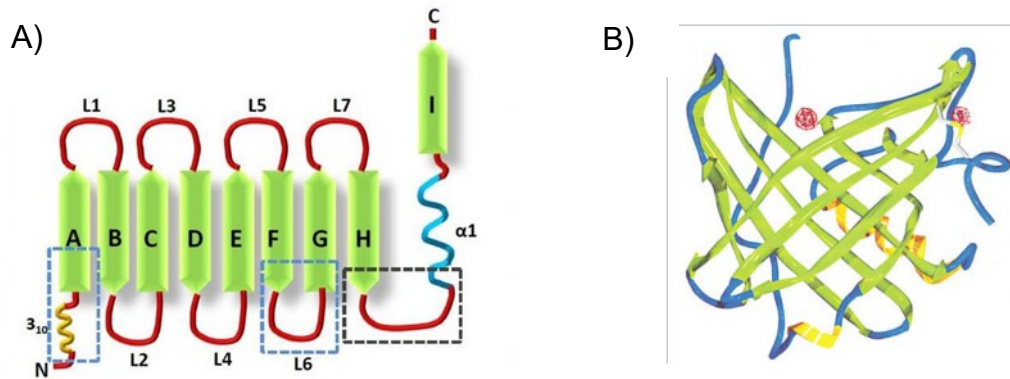


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Lipocalin-Struktur.

A) Sekundärstruktur B) Tertiärstruktur. Die charakteristische Eigenschaft der Lipocaline ist die "Lipocalin-Faltung", die eine N-terminale 3-10 Helix, gefolgt von acht antiparallelen Beta-Faltblättern (A-H, grün dargestellt) enthält, das achte Beta-Faltblatt ist mit einer Alpha-Helix ($\alpha 1$) verbunden, die wiederum mit einem C-terminalen Beta-Faltblatt verbunden ist. Die Beta-Faltblätter sind mit Schleifen (L1-L7) verbunden, die Schleifen L1, L3, L5 und L7 formen das offene Ende des Moleküls (Bindungsstelle) (Goetz et al. 2002)

1.3.2 Biologische Funktion und Signaltransduktion

Einen maßgeblichen Teil seiner biologischen Effekte übt NGAL durch die Bindung von Eisen über Eisenbindepoteine aus der Gruppe der sog. Siderophore aus, die sowohl bakteriellen, endogenen als auch pflanzlichen Ursprunges sein können (Bao et al. 2015). NGAL bindet hierbei bakterielle Siderophore vom Catechol-Typ, z.B. Enterobactin (Goetz et al. 2002). Diese werden von *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* und *Vibrio cholerae* und weiteren Darmbakterien exprimiert (Miethke und Marahiel 2007), daneben bindet NGAL Carboxymycobactin, das von Mykobakterien exprimiert wird (Bao et al. 2015). Erstmals 2010 wurden mögliche endogene Siderophore charakterisiert, dies sind Catechole (Bao et al. 2010, Bao et al. 2015), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHBA) (Devireddy et al. 2010) und L-Norepinephrin (Miethke und Skerra 2010). Durch die Bindung an bakterielle Siderophore wird das für das bakterielle Wachstum notwendige Eisen limitiert, sodass NGAL hierdurch bakteriostatische Effekte ausübt (Goetz et al. 2002). Dass dies zweifelsfrei eine entscheidende Rolle in der unspezifischen Immunabwehr spielt, zeigte die Arbeit von Flo et. al., in der NGAL-depletierte Mäuse eine deutlich erhöhte Letalität im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bei intraperitonealer Infektion mit *E. coli*- Bakterien aufwiesen. Die bakteriostatische Funktion ist hochspezifisch für Bakterien, deren Siderophore von NGAL gebunden werden, z.B. hat NGAL keinen Einfluss auf die Bakterienlast bei einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* (Flo et al. 2004). Eisenbeladenes NGAL (holo-NGAL) ist in der Lage, Eisen in der Zelle

freizusetzen, wodurch eisensensitive Gene wie Ferritin und Transferrin-Rezeptor reguliert werden (Yang et al. 2002). Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass nicht-eisenbeladenes NGAL (apo-NGAL) in der Lage ist, Eisen aus der Zelle zu entfernen und hierdurch bei hämatopoetischen Zellen eine Apoptose einzuleiten vermag, nachgewiesen *in vitro* (Devireddy et al. 2001, Devireddy et al. 2005) und *in vivo* bei NGAL-depletierten Mäusen (Liu et al. 2011). Für den Transport in die Zelle ist die Interaktion mit einem spezifischen membranständigen Rezeptor (24p3R bzw. Slc22a17) notwendig, dieser befindet sich im Mausmodell in einer Vielzahl von Geweben, hierunter auch in der Leber, Lunge, Niere und im Herzen (Devireddy et al. 2005). Nach Bindung von NGAL an seinen Rezeptor wird der NGAL-Rezeptor-Komplex internalisiert und liegt dann in Vesikeln, die späten Endosomen entsprechen, vor. Ein hier vorliegender saurerer pH-Wert begünstigt die Freisetzung von Eisen, das dann u.a. über den *divalent metal transporter 1* (DMT1) in das Zytosol gelangt, die subzellulären Wege des NGAL unterscheiden sich hierbei von denen des Transferrins (Devireddy et al. 2005). Im Falle einer Bindung von eisenfreiem NGAL an den Rezeptor kommt es ebenfalls zu einer Internalisierung des Komplexes, dies löst dann vermutlich eine intrazelluläre Assoziation mit einem endogenen oder bakteriellen Siderophor und die nachfolgende Bindung an Eisen aus, wodurch der NGAL-Siderophor-Eisen-Komplex durch Exozytose dann aus der Zelle exportiert werden kann (Devireddy et al. 2005).

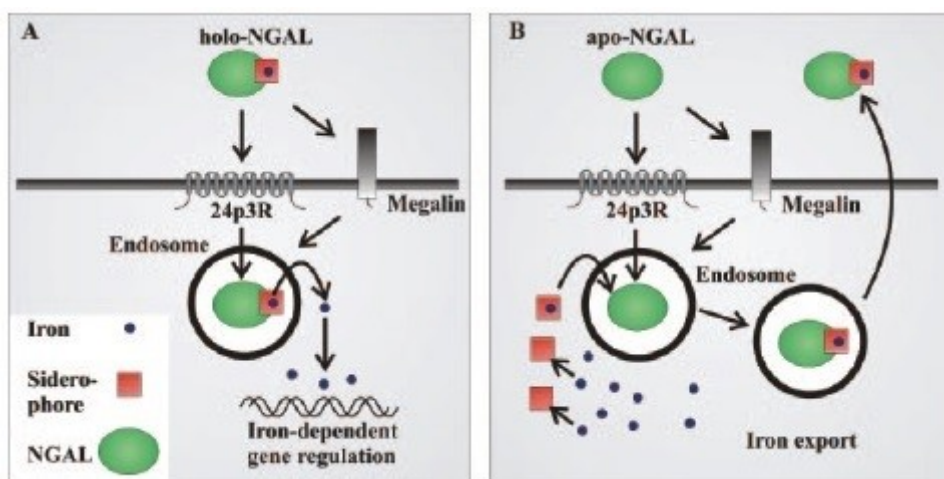


Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung der Mechanismen der zellulären Aufnahme von eisenbeladenem NGAL (A) und eisenfreiem NGAL (B). Die Aufnahme ist je nach Zelltyp über den spezifischen Rezeptor 24p3R (Slc22a17) oder über den unspezifischen Megalin-Rezeptor möglich. Im Falle einer Aufnahme von eisenbeladenem NGAL führt die intrazelluläre Freisetzung des Eisens zu einer Genregulation eisensensitiver Gene (A); im Falle der Aufnahme von eisenfreiem NGAL ist dieses in der Lage intrazelluläres Eisen zu exportieren (in Abhängigkeit des Vorhandenseins eines endogenen Siderophores) (B) (Schmidt-Ott et al. 2007).

In einer weiteren Arbeit wurde die Interaktion zwischen NGAL und seinem Rezeptor auf molekularer Ebene charakterisiert, hierbei konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die extrazelluläre N-terminale Domäne des Rezeptors eine bevorzugte Affinität zu apo-NGAL aufweist, diese Interaktion jedoch nicht ausreicht um die Internalisierung des Komplexes zu erklären (Cabedo Martinez et al. 2016). Dies ist jedoch ein Hinweis dafür, dass der NGAL-Rezeptor möglicherweise eine unterschiedliche Affinität für apo- und holo-NGAL besitzt, was für die biologische Funktion des NGAL von wesentlicher Bedeutung wäre.

Darüber hinaus kann NGAL über den unspezifischen Megalin-Rezeptor aufgenommen werden, dieser spielt v.a. am proximalen Nierentubulus eine Rolle, wo er für die Aufnahme einer Vielzahl von Liganden verantwortlich ist (verschiedenste Proteine, Hormone, Toxine, etc.), daneben wird er jedoch auch von weiteren Geweben exprimiert, zu nennen sind hier Typ II-Pneumozyten und das intestinale Epithel (Christensen und Birn 2002, Mori et al. 2005). Der Megalin-Rezeptor kann sowohl apo- als auch holo-NGAL mit gleicher Affinität aufnehmen (Hvidberg et al. 2005).

1.3.3 Beteiligung von NGAL in der Regulation des Eisenmetabolismus bei systemischen Infektionen

NGAL stellt durch seine spezifischen, nicht redundanten Funktionen bei der Regulation des Eisenstoffwechsels im Rahmen einer bakteriellen Infektion einen wichtigen Faktor des angeborenen Immunsystems dar, dies soll nachfolgend erläutert werden.

Vor dem Hintergrund, dass Bakterien Eisen als essentiellen Cofaktor für ihr Wachstum benötigen und freies Eisen außerdem (als Katalysator für die Bildung freier Radikale) einen Mediator von oxidativem Stress darstellt, existieren mehrere Wirtsmechanismen, den Gewebs- oder Plasmaspiegel an freiem Eisen in engen Grenzen zu regulieren (Schaible und Kaufmann 2004, Ganz und Nemeth 2015). So kommt es im Rahmen einer systemischen Inflammation zur Ausbildung einer sog. Entzündungsanämie, hierbei wird die Hepcidin-Ferroportin-Achse als Hauptregulator angenommen (Xiao et al. 2017). Weiterhin kommt es bei einer systemischen Inflammation zu einer Umverteilung des Eisens nach intrazellulär, mit der Folge eines funktionellen Eisendefizites (Schaible und Kaufmann 2004). Diese Konstellation findet sich auch bei den allermeisten kritisch kranken und septischen Patienten vor

(Darveau et al. 2004). Hierzu passend konnte gezeigt werden, dass Parameter, die eine erhöhte Verfügbarkeit von Eisen im Serum anzeigen (v.a. die Transferrin-Sättigung) ein starker Prädiktor für ein negatives Outcome bei Intensivpatienten sind (Tacke et al. 2016). Am Beginn der Kaskade steht zunächst eine Akute-Phase-Reaktion mit der Sekretion proinflammatorischer Zytokine, IL-6 stimuliert hierbei die Bildung des wichtigsten Regulators des Eisenstoffwechsels Hepcidin in der Leber, dieses hemmt den transmembranösen Eisenexporter Ferroportin, sodass der Eisenexport aus Enterozyten, Hepatozyten und Makrophagen reduziert wird (Nemeth et al. 2004). Zum anderen wird die Expression von Ferritin über IL-1 und TNF- α stimuliert, sodass Eisen in der Zelle gespeichert wird (Torti und Torti 2002). Daneben existieren jedoch weitere, von Hepcidin unabhängige Mechanismen der Eisensequestrierung, z.B. durch Lactoferrin, NGAL oder *natural resistance-associated macrophage protein 1* (NRAMP1), die nicht redundante Funktionen in der Wirtsabwehr darstellen (Ganz und Nemeth 2015). Dementsprechend wurde auch bei Hepcidin-depletierten Mäusen eine 15% Reduktion des zirkulierenden Eisens beobachtet (Xiao et al. 2017).

Aus Versuchen mit NGAL-depletierten Mäusen ist bekannt, dass diese im Vergleich zum Wildtyp wesentlich anfälliger für bakterielle Infektionen sind (Berger et al. 2006, Flo et al. 2004) und erhöhte intrazelluläre Spiegel an freiem „labilem“ Eisen in den Makrophagen aufweisen (Nairz et al. 2009); dieses wiederum kann über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zur Schädigung zellulärer Makromoleküle führen (Halliwell und Gutteridge 1990, Hentze et al. 2004). Weiterhin zeigten NGAL-depletierte Mäuse nach LPS-Injektion eine Dysregulation des Eisenstoffwechsels mit einer im Vergleich deutlich verzögerten Hypoferrämie, obwohl die Hepcidin-Spiegel unverändert waren (Srinivasan et al. 2012). In einer Arbeit ergab sich im Mausmodell der akuten Colitis, dass bei Wildtyp-Mäusen NGAL im Serum ansteigt und sich im Gegenzug sowohl das Gesamteisen im Serum als auch das freie Eisen im Serum absenkt, hierbei korreliert der NGAL-Anstieg negativ mit dem Absinken des Eisens, diese Reaktion blieb bei den NGAL-depletierten Mäusen aus. Hierzu bestätigend sank die Konzentration des freien Eisens durch die Gabe von rekombinantem siderophor-freiem NGAL deutlich ab (Xiao et al. 2016). Anders verhält es sich bei einer Infektion mit intrazellulären Pathogenen (z.B. Salmonella oder Mycobakterien), hier entwickelt sich eine extrazelluläre Hyperferrämie und eine intrazelluläre Hypoferrämie, in dem der zelluläre Eisenexport stimuliert wird. Auch hier spielt NGAL

(neben anderen Mechanismen) eine maßgebliche Rolle, in dem es intrazelluläres siderophor-gebundenes Eisen aus der Zelle exportiert (Soares und Weiss 2015, Nairz et al. 2015, Nairz et al. 2009).

Um die Veränderungen des Eisenstoffwechsels in unserem Modell der polymikrobiellen Sepsis näher zu charakterisieren und mögliche Zusammenhänge mit einer erhöhten *Ngal*-Expression zu diskutieren wurden neben der Expression von *Ngal* wesentliche Parameter des Eisenstoffwechsels (Ferritin und Transferrin-Rezeptor) auf Organebene gemessen.

1.3.4 Gewebsexpression und Regulation

NGAL-Protein findet sich in Neutrophilen sowie in einer Vielzahl menschlicher Gewebe, hier v.a. in Geweben, die Mikroorganismen ausgesetzt sind (Kjeldsen et al. 2000). Damit zeigt das Expressionsmuster von NGAL viele Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen die sich in Neutrophilen finden (wie z.B. Lysozym oder Lactoferrin). In RNA Dot-Blot-Analysen zeigte sich eine im Vergleich deutlich erhöhte Expression in der Trachea und im Knochenmark (Kjeldsen et al. 2000, Cowland und Borregaard 1997). In den peripheren Neutrophilen findet sich NGAL-Protein in sekundären Granula, es wird während der Myelopoese im Knochenmark gebildet (Borregaard et al. 1995), für eine *de-novo*-Synthese in peripheren Neutrophilen gibt es keine Hinweise. Bei der Maus wurde ebenfalls eine Expression in verschiedenen gesunden Geweben nachgewiesen, hierbei konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Ngal*-RNA-Transkripten in den Geweben Lunge, Milz und Niere mit zunehmendem Alter abnimmt und in diesen Organen nach spätestens 10 Wochen nicht mehr nachweisbar ist (Garay-Rojas et al. 1996), jedoch ist nicht beschrieben, um welchen Mausstamm es sich hierbei handelte.

Eine Erhöhung der *Ngal*-Expression in unterschiedlichen Organen wurde sowohl beim Menschen als auch im Mausmodell bei einer Vielzahl von Stimuli, wie Infektionen, aseptischer Inflammation, gutartigen Erkrankungen (cerebrovaskuläre Erkrankungen, Nierenerkrankungen) als auch bei verschiedenen Malignomen beobachtet (Schmidt-Ott et al. 2007, Yang und Moses 2009, Chakraborty et al. 2012).

Die Regulation von NGAL unterliegt komplexen Mechanismen und kann je nach Gewebe und dort vorhandenen Co-Faktoren über verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert bzw. reguliert werden. Dabei spielen vor allem proinflammatorische Zytokine und Mediatoren (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, IL-22,

TLR4, IGF-1) eine Rolle für die Induktion. Bei IL-1 β , TNF- α und TLR4 konnte gezeigt werden, dass die Regulation über den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt wird (Chakraborty et al. 2012).

Nachfolgend soll der aktuelle Wissensstand auf der Ebene der in dieser Arbeit untersuchten Organe beschrieben werden. Dabei wurden Studien ausgewählt, die von Relevanz für die Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit sind, d.h. sich v.a. mit dem Verhalten der *Ngal*-Expression im Rahmen einer Inflammation und/oder Infektion beschäftigen.

1.3.5 NGAL als Akute-Phase-Protein der Leber

Am Beispiel einer sterilen Entzündung im Mausmodell (mittels intraperitonealer bzw. intramuskulärer Terpentin-Injektion) konnte in zwei Studien demonstriert werden, dass NGAL im Rahmen einer Akute-Phase-Reaktion von der Leber synthetisiert wird und zu einer Erhöhung des NGAL-Plasmaspiegels führt (Liu und Nilsen-Hamilton 1995, Sultan et al. 2012), hierbei zeigten sich jedoch keine relevanten

Expressionserhöhungen der *Ngal*-mRNA in den weiteren untersuchten Organen (u.a. Lunge, Niere, Herz). In einer anderen Arbeit wurde im Rahmen einer systemischen Infektion (durch eine intraperitoneale *E. coli*- bzw. *K. pneumoniae*-Injektion im Mausmodell) - neben der Erhöhung der mRNA in der Leber (30-fach) - auch eine leichte Erhöhung der mRNA-Expression in der Lunge und Milz (knapp 3-fach) gezeigt, die Niere wurde in dieser Arbeit nicht untersucht (Xu et al. 2015).

Desweiteren wurde in derselben Publikation bei hepatozytenspezifischen NGAL-depletierten Mäusen gezeigt, dass diese eine deutlich geringere Lebenserwartung bei systemischer Infektion im Vergleich zum Wildtyp aufweisen und zudem der NGAL-Plasmaspiegel deutlich niedriger war, sodass die Hepatozyten in diesem Modell für die Synthese eines Großteiles des plasmatischen NGAL während einer Infektion verantwortlich gemacht wurden. Hierbei untersuchte man außerdem IL-6- und STAT3-depletierte Mäuse hinsichtlich der *Ngal*-mRNA-Expression in Hepatozyten (*in vitro*), diese zeigte sich deutlich reduziert, sodass IL-6 über den STAT3-Signalweg maßgeblich an der Expression der *Ngal*-mRNA beteiligt zu sein scheint (Xu et al. 2015). In einer weiteren Arbeit wurde mittels des LPS-Modells eine akute Endotoxämie ausgelöst und die mRNA-Expressionsveränderungen der Leber und Lunge gemessen, hier wurde gezeigt, dass neben den Hepatozyten auch die in der Leber ansässigen Makrophagen zur Synthese von NGAL befähigt sind (Sunil et al. 2007). Desweiteren konnte am CLP-Modell (*cecal ligation and puncture*, CLP)

eine Expressionserhöhung von *Ngal* in Leber und Lunge mittels RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) gezeigt werden.

1.3.6 NGAL bei akuter Lungenschädigung

Ergänzend zu der in Abschnitt 1.3.4 genannten ausgeprägten Expression von *Ngal* in der Trachea konnte diese immunhistochemisch in nicht entzündetem Lungengewebe in den Becherzellen und in geringem Ausmaß in den Alveolarzellen festgestellt werden, im entzündeten Lungengewebe hingegen kam es zu einer deutlichen Expressionssteigerung sowohl im Bronchialepithel selbst (nicht den Becherzellen) als auch alveolär in Typ II-Pneumozyten (Cowland et al. 2003), hierbei konnte in Zellkulturen eine Selektivität für den IL-1-Signalweg identifiziert werden, durch TNF- α oder LPS alleine konnte keine Hochregulation ausgelöst werden (Cowland et al. 2003). Hingegen zeigte eine andere Arbeit *in vivo* im Mausmodell (intraperitoneale Injektion mit *E. coli*- LPS) eine pulmonale Expressionssteigerung von *Ngal*, beteiligt waren hier sowohl Typ II-Pneumozyten als auch alveoläre Makrophagen (Sunil et al. 2007). Darüber hinaus wurden auch mesenchymale Stammzellen (MSC) als Faktor für die Hochregulation von *Ngal* bei einer Pneumonie im Mausmodell identifiziert: MSC sind in der Lage in Kombination mit alveolären Makrophagen NGAL zu produzieren, als wichtige Mediatoren wurden hier erneut TNF- α (induziert durch LPS) genannt (Gupta et al. 2012). Auch in der Lunge konnte ein protektiver Effekt von NGAL im Mausmodell nachgewiesen werden, beispielsweise wird es bei einer Infektion mit *K. pneumoniae* stark induziert und wirkt der Infektion über die Bindung der bakteriellen Siderophore effektiv entgegen, hierbei spielen TLR4 als auch IL-1 β jeweils unabhängig voneinander eine wichtige Rolle (Chan et al. 2009). Dabei hemmt NGAL insbesondere die perivaskuläre Ausbreitung der Klebsiellen-Infektion, bei Expression anderer Siderophore, die NGAL nicht bindet (z.B. Yersiniabactin (Ybt)) verhindert hingegen Transferrin die perivaskuläre Ausbreitung, sodass dieses komplexe Zusammenspiel den Ort und die Ausbreitung der Infektion determiniert und begrenzt (Bachman et al. 2012). Weiterhin zeigte sich bei NGAL-depletierten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp eine höhere Letalität bei einer endotrachealen Infektion mit *E. coli* (Wu et al. 2010). Über die bakteriostatischen Effekte hinaus hat NGAL zusätzlich proinflammatorische Effekte durch Rekrutierung von Neutrophilen über IL-8 (Bachman et al. 2009), bei Infektionen mit *M. tuberculosis* wurde dies bestätigt, darüber hinaus jedoch eine geringere Rekrutierung von Lymphozyten über eine verminderte Chemokin-Produktion gezeigt (Guglani et al. 2012), sodass NGAL nicht

ausschließlich als proinflammatorisch bezeichnet werden kann. Ähnlicherweise kommt es bei einer Infektion mit dem grampositiven nicht siderophor-abhängigen *Streptococcus pneumoniae* zu einer ausgeprägten *Ngal*-Expression durch deaktivierte Makrophagen, was über eine Erhöhung der IL-10-Produktion zu einer antiinflammatorischen Antwort führt und hierdurch die Elimination der Bakterien negativ beeinflusst (Warszawska et al. 2013), sodass man festhalten muss, dass sich je nach Art des Pathogen unterschiedliche, teilweise gegensätzliche NGAL-Effekte zeigen.

1.3.7 NGAL im Rahmen der akuten Nierenschädigung (AKI)

Eine Steigerung der renalen *Ngal*-Expression wurde zunächst im Rahmen einer akuten ischämischen Nierenschädigung mit konsekutiver Reperfusion (*ischemia-reperfusion injury*) entdeckt. Hierbei konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das proximale Tubulusepithel in der Lage ist, NGAL zu synthetisieren (Mishra et al. 2003) und NGAL unmittelbar nach der Nierenschädigung im Urin messbar ist. Es wurde zudem festgestellt, dass NGAL das Ausmaß der Nierenschädigung begrenzt, indem es den tubulären Zelltod hemmt und die Re-Epithelialisierung fördert (Mishra et al. 2003, Mishra et al. 2004), diese Effekte sind zytokinabhängig. Die regenerativen Prozesse durch NGAL treten hierbei erst in der späteren Regenerationsphase (nach 96h) ein, da das initial proinflammatorische Milieu in der frühen Reperfusionsphase (<24h) über eine Reduktion der *Ngal-Rezeptor*-Expression die regenerative Wirkung von NGAL abschwächt (Vinuesa et al. 2008). Es wurde demonstriert, dass nach Injektion von rekombinantem NGAL dieses im proximalen Tubulussystem über den Megalin-Rezeptor aufgenommen wird (Mishra et al. 2004, Mori et al. 2005, Kuwabara et al. 2009) und dies das Ausmaß der Nierenschädigung deutlich begrenzt, was maßgeblich durch Regulation des intrazellulären Eisens durch NGAL vermittelt wird (Mishra et al. 2004). NGAL wird bei einer akuten Nierenschädigung unterschiedlicher Genese unmittelbar von geschädigten Zellen des distalen Tubulus sowie der Sammelrohre synthetisiert, dies wird bei Infektionen mit Uropathogenen über TLR4- und NF- κ B- vermittelt (Kuwabara et al. 2009, Paragas et al. 2011, Paragas et al. 2014). Dass eine akute Nierenschädigung auch zu einer systemischen NGAL-Erhöhung im Sinne eines erhöhten NGAL-Plasmaspiegels führt, zeigte sich in Studien eines Maus- Modells der einseitigen Ureter-Obstruktion, in dem NGAL sowohl im Serum als auch im proximalen Tubulus der gesunden, nicht obstruktiven Niere nachgewiesen wurde (Kuwabara et al. 2009, Paragas et al. 2012). Aus der

Beobachtung, dass NGAL im Serum und Urin bei einer akuten Nierenschädigung unmittelbar ansteigt, entwickelte sich die Hypothese, NGAL könne als Biomarker der akuten Nierenschädigung dienen (Schmidt-Ott et al. 2006), woraus sich eine ganze Reihe weiterer Studien ableitete, die diese Eignung kontrovers diskutieren. Eine Metaanalyse (mit 2538 Patienten) stellte bezüglich der Eignung von NGAL eine akute Nierenschädigung zu erkennen eine Fläche unter der ROC-Kurve (AUC-ROC) von 0,78 bei Erwachsenen und von 0,93 bei Kindern fest (unabhängig von der Ursache des AKI), bei kritisch kranken Patienten zeigte sich ein geringerer Wert von 0,73, wohingegen sich bei kontrastmittelinduzierter Nierenschädigung ein deutlich besserer Wert von 0,89 zeigte (Haase et al. 2009). Obwohl diese Werte NGAL insgesamt eine verhältnismäßig gute Performance zur Erkennung eines AKI bescheinigen, lässt sich anhand dieser Zahlen erkennen, dass sich die Performance je nach Ursache des AKI, Alter des Patienten und Komorbidität deutlich unterscheidet, sodass in Bezug auf den Einsatz in der klinischen Routine weiterhin einige Fragen offen bleiben. Auch ein aktuelles Review über mögliche neue Biomarker des AKI stellt fest, dass diese Fragen bis dato nicht hinreichend geklärt sind und weitere große prospektive Studien notwendig sind, um den klinischen Nutzen bestimmen zu können (Beker et al. 2018).

1.3.8 NGAL im Rahmen der (septischen) myokardialen Dysfunktion

Bezüglich der Veränderungen von *Ngal* im Rahmen der septischen Kardiomyopathie liegen keine Daten vor. Es ist jedoch bekannt, dass *Ngal* im Rahmen der akuten und chronischen Herzinsuffizienz im Herzen hochreguliert wird und der NGAL-Plasmaspiegel ansteigt. In einem aktuellen Review kommen die Autoren anhand der Analyse mehrerer Studien mit unterschiedlichen Kohorten zum Schluss, dass es eine deutliche Evidenz für NGAL als Biomarker zur Bestimmung des Schweregrades, der Prognose und der Mortalität einer Herzinsuffizienz gibt (Chan et al. 2015). Gezeigt werden konnte in verschiedenen Modellen der Herzschränkung, dass Kardiomyozyten befähigt sind, NGAL zu synthetisieren und dies durch proinflammatorische Zytokine, insbesondere IL-1 β induzierbar ist (Yndestad et al. 2009, Ding et al. 2010). Die funktionelle Rolle von NGAL bei der Herzerkrankung ist bis dato weitgehend unbekannt, es gibt jedoch Hinweise, dass eine Beteiligung an der Regulation des Eisenstoffwechsels der Kardiomyozyten eine Rolle spielt (Chan et al. 2015).

2 Ziele der Arbeit / Fragestellung

Systembiologische Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten eine Hochregulation der *Ngal*-Expression im Mausmodell der polymikrobiellen Sepsis (PCI-Modell). Auch in der Literatur finden sich Hinweise für eine Hochregulation von *Ngal* bei bakteriellen Infektionen und systemischen Entzündungsreaktionen, dabei scheint NGAL durch die Beteiligung an der Regulation des Plasmaeisenpiegels eine bakteriostatische (und damit protektive) Funktion zu haben, darüber hinaus wurden weitere wichtige immunmodulatorische Effekte beschrieben. Da bis dato keine Untersuchungen über das Expressionsverhalten von *Ngal* im Rahmen der polymikrobiellen Sepsis im PCI-Modell vorliegen, sollte dies in der vorliegenden Studie untersucht werden: Die Analyse der *Ngal*-Expression auf Organebene sollte Auskunft über die Syntheseorte geben, was im Vergleich zur alleinigen Messung des NGAL-Plasmaspiegels eine differenziertere Betrachtungsweise ermöglicht. Hierzu wurden bei einer Sepsis maßgeblich beteiligte Organe (Leber, Lunge, Niere und Herz) mittels RT-PCR im PCI-Modell der polymikrobiellen Sepsis 6h und 24h nach Behandlung sowie nach Scheinbehandlung (Sham) hinsichtlich der Expressionsveränderungen von *Ngal*, des NGAL-Rezeptors (*Slc22a17*) sowie der Eisenparameter Ferritin (*Fth1* und *Ftl1*) und Transferrin-Rezeptor (*Tfrc*) untersucht (siehe Abbildung 5). Die Messung zu unterschiedlichen Zeitpunkten sollte Informationen über die Dynamik der Expressionsveränderungen liefern.

Folgende Fragestellungen ergaben sich für diese Arbeit:

1. Genexpressionanalyse:
 - a) Ist *Ngal* in den septischen Mäusen gegenüber scheinbehandelten Mäusen erhöht? In welchem Ausmaß?
 - b) In welchen Geweben zeigt sich eine Erhöhung von *Ngal*? Wie ist die Dynamik der *Ngal*-Expression zu den beiden Untersuchungszeitpunkten 6h und 24h nach Behandlung in den einzelnen Organen? Gibt es eine einheitliche Reaktion?
 - c) Wie verhält sich die Expression des *Ngal*-Rezeptors sowie wichtiger Parameter des Eisenmetabolismus im PCI-Modell? Lässt sich eine Korrelation zur *Ngal*-Expression ableiten?
2. Immunhistochemische Untersuchungen:

- Lässt sich NGAL auf Proteinebene im Gewebe nachweisen? Korreliert dies mit den Expressionsveränderungen auf mRNA-Ebene?
- Lässt sich eine zellspezifische Lokalisation im jeweiligen Gewebe identifizieren?

Abschließend soll anhand der Ergebnisse das Expressionsverhalten von NGAL im Rahmen der polymikrobiellen Sepsis bewertet und Hypothesen über die funktionelle Rolle von NGAL in der Sepsis generiert werden.

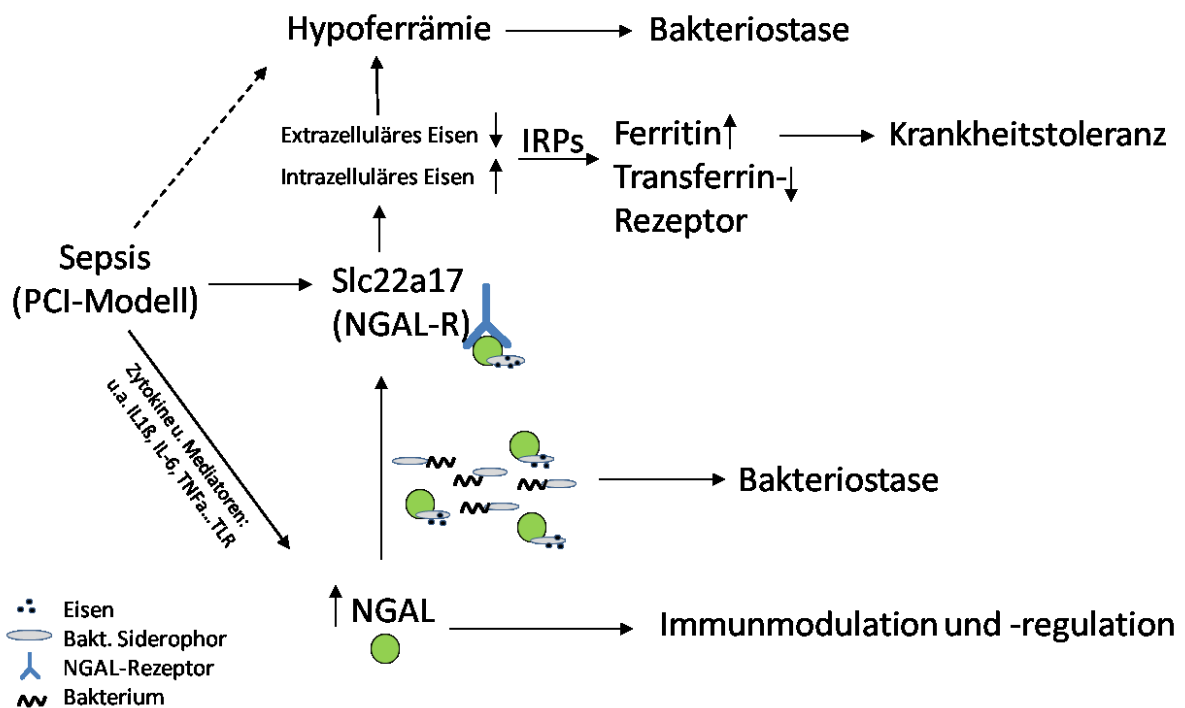


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des NGAL-Metabolismus im Rahmen der Sepsis als Rationale für die Auswahl der Zielgene (Ngal, Slc22a17, Ferritin, Transferrin-Rezeptor)

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine tierexperimentelle Studie am Mausmodell der polymikrobiellen Peritonitis.

Die Einteilung in Gruppen erfolgte anhand der Organentnahme zum Zeitpunkt 6h und 24h nach intraperitonealer Injektion einer humanen Faeces-Suspension von $5,5 \times 10^6$ KBE pro Maus.

Für die weiteren Analysen in dieser Arbeit wurden die Organe Leber, Lunge und Niere verwendet.

Weiterhin wurden jeweils für jedes Organ Sham-Gruppen zu beiden oben genannten Zeitpunkten sowie eine unbehandelte Gruppe mitgeführt, um rein experimentell bedingte Effekte von Infektionseffekten zu unterscheiden (Abbildung 7)

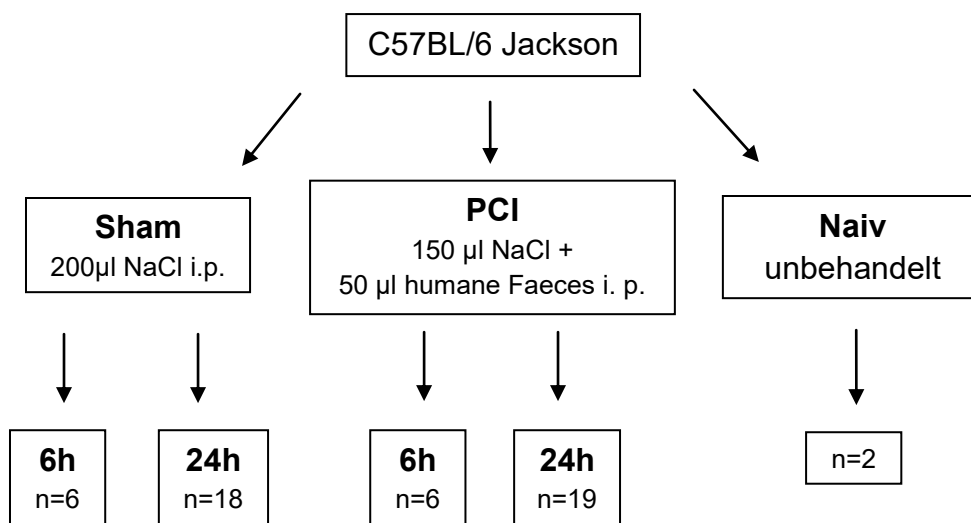


Abbildung 7: Studiendesign

Weibliche, 8 Wochen alte C57BL/6 Jackson-Mäuse wurden intraperitoneal (i. p.) mit NaCl und humaner Faeces im Verhältnis 3+1 (PCI) oder reiner physiologischer Kochsalzlösung (Sham) injiziert und nach 6 bzw. 24 h zur Organentnahme getötet. Des Weiteren wurde eine Gruppe unbehandelter Mäuse in die Studie eingeschlossen. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist gekennzeichnet

3.2 Tierexperimente

Die Tierversuche wurden bereits zu einem früheren Zeitpunkt von Frau Dr. med. Martina Weber und Frau Dipl.-Biol. Jana Lemm durchgeführt. Zu Beginn dieser Arbeit lag ein Teil der oben genannten Organe schockgefroren und bei -80°C gelagert vor,

der zweite Teil eines jeden Organes lag in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet für weiterführende histologische Untersuchungen vor.

Alle Tierversuche wurden durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (Abteilung gesundheitlicher Verbraucherschutz, Veterinärwesen, Pharmazie) in Bad Langensalza genehmigt (Aktenzeichen Nr. 02-51/07) und in den Experimentierräumen des Infektionstierhauses 5 am Forschungszentrum Beutenberg, Jena durchgeführt.

3.2.1 Versuchstiere

Für die Tierexperimente wurden weibliche, 8 Wochen alte Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6 Jackson (Charles River, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 16 – 20 g verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte in einer separaten Einheit des Infektionstierhauses bei Raumtemperatur und einer relativen Luftfeuchte von 50 – 60% sowie einem Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 h. Alle Tiere hatten freien Zugang zu autoklavierter, pelletierter Standardnahrung und autoklaviertem, angesäuertem Wasser (pH 2,5 – 3,0).

3.2.2 Polymikrobielle Peritonitis

Nach lokaler Sprühdesinfektion wurde den Mäusen intraperitoneal (i.p.) durch Punktion des linken unteren Abdomens je 200 µl einer humanen Faeces-Suspension (siehe Tabelle 1) verabreicht, bestehend aus 50 µl Ausgangs-Faeces vermischt mit 150 µl steriler physiologischer Kochsalzlösung, was einer Infektionsdosis von $5,5 \times 10^6$ KBE entspricht. Dieses auch als PCI-Modell bezeichnete Verfahren (modifiziertes PCI-Modell) (Lorenz et al. 1994, Bauhofer et al. 2002) simuliert eine polymikrobielle Peritonitis, wie sie beispielsweise nach Perforation des Darmes auftreten kann (Gonnert et al. 2011). Die Letalität des hier angewandten Modells lag bei 50 – 70 % nach 24-stündiger Behandlungsdauer. Bei den überlebenden Tieren wurde zum Zeitpunkt 6h bzw. 24h nach Infektion die Organentnahme durchgeführt.

Entsprechend wurde mit den unbehandelten Tieren und Sham-Gruppen verfahren. Letztere durchliefen prinzipiell die gleiche experimentelle Prozedur wie die Mäuse in den Infektionsgruppen, erhielten jedoch statt Faeces-Suspension isotonische Kochsalzlösung injiziert, um Effekte, die allein schon durch die experimentelle Vorgehensweise hervorgerufen werden, identifizieren zu können.

Tabelle 1: Bakterielle Zusammensetzung der humanen Faeces.

Die Ermittlung der Werte erfolgte aus der gepoolten humanen Faeces von fünf gesunden Nicht-Vegetariern und wurde vom Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jenanach Standardverfahren vorgenommen. Angabe der Keimzahl in Kolonie bildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml).

Bakteriengenus/Bakterienspezies	Keimzahl (KBE/ml)
<i>Escherichia coli</i>	$4,8 \times 10^5$
<i>G Streptokokken</i>	2×10^5
<i>Enterokokken</i>	5×10^5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5×10^4
<i>Peptostreptokokken</i>	$3,6 \times 10^7$
<i>Veillonella</i>	$3,2 \times 10^7$
<i>Bacteroides</i>	$4,1 \times 10^7$
<i>Pervotella</i>	1×10^6
Gesamtkeimzahl	$1,11 \times 10^8$

Übergeordnete Gruppen	Keimzahl (KBE/ml)
Aerobier	$1,23 \times 10^6$
Anaerobier	$1,1 \times 10^8$
Gram-positiv	$3,67 \times 10^7$
Gram-negativ	$7,45 \times 10^7$

3.2.3 Euthanasie und Organentnahme

Die Versuchstiere wurden durch intraperitoneale Gabe einer letalen Ketamindosis (Ketavet 1:1 verdünnt mit isotonischer Kochsalzlösung; 200 µl pro Tier) narkotisiert. Danach erfolgte die Eröffnung des Peritonealraumes, Freilegung und Punktion der *Vena cava caudalis* zur Blutentnahme sowie Herauspräparieren von Herz, Lunge, Leber, Nieren und Milz. Die Organe wurden geteilt und jeweils ein Stück für RNA-Extraktion mit anschließender Genexpressionsanalyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die zweite Hälfte wurde 24 h in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert, um später histologische Untersuchungen durchzuführen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolierung

Die Gewebe wurden auf einer sterilen, auf Trockeneis lagernden Petrischale mit einem sterilen Einweg-Skalpell geschnitten und sofort auf einer Präzisionswaage gewogen, sodass ein Antauen und eine damit verbundene RNA-Degradierung verhindert wurde. Um eine möglichst große Menge an RNA zu extrahieren, wurde den Vorgaben des Isolationskits folgend (RNeasy Mini, Qiagen) zwischen 20-30µg Gewebe in ein 2ml Eppendorf-Safe-Lock-Tube eingesetzt und mit 600 µl RLT-Puffer versetzt (pro ml RLT-Puffer wurden 10µl β-Mercaptoethanol verwendet), anschließend wurde eine autoklavierte Stahlkugel hinzugefügt und das Gewebe mit einem Tissue Lyser (Qiagen) für 4 min bei 30/s zerkleinert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Sarstedt-Tube überführt und bei 16000x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde anschließend vorsichtig abgesaugt und in ein neues 2 ml Eppendorf-Safe-Lock-Tube eingesetzt. Nach protokollgerechter Beladung des QIAcube Systems und Kontrolle des Füllstandes der Reagenzien wurden die weiteren Isolierungsschritte vollautomatisch durch den QIAcube (Protokoll: RNeasy Mini, animal tissues and cells, large samples) durchgeführt.

3.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit am Nano-Drop Spectrophotometer

Die isolierte RNA wurde zunächst kurz bei 60° für 5 min erhitzt um eine optimale Entfaltung der RNA zu erhalten. Die Proben wurden auf einem Nano-Drop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) System zweifach vermessen (Software „ND-1000 V 3.7“), bei Abweichungen beider Werte von >10% wurde eine dritte Messung durchgeführt und anschließend der Wert mit der größeren Abweichung vom Mittelwert gestrichen. Die Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260nm vermessen, neben der RNA-Konzentration lassen sich durch die Quotienten A260/280 und A260/230 Aussagen über die Reinheit der isolierten RNA treffen, die Werte lagen hier weitgehend über 1,8. Aufgrund der Verwendung des RNeasy-Kits-Systems zur RNA-Isolation, das die RNA spezifisch an einer Säule bindet, wird eine Kontamination durch Phenole, DNA und/oder Proteine weitgehend verhindert, sodass die mittels NanoDrop ermittelten Quotienten nicht weiter prozessiert wurden.

3.3.3 Qualitative RNA-Analyse am Experion-Elektrophorese-System

Um eine ausreichend hohe Qualität und Integrität der RNA für die nachfolgende cDNA-Synthese zu gewährleisten, wurden die Proben am Experion Elektrophorese-System (Bio-Rad) analysiert (Imbeaud et al. 2005). Dies ist notwendig, da die RNA-Integrität einen Einfluss auf die Ergebnisse der nachfolgenden qRT-PCR hat und diese bei zu starker Degradierung zu falsch niedrigen Wertebereichen verzerren kann (Fleige und Pfaffl 2006, Gingrich 2008). Anhand des elektrophoretischen Profils der jeweiligen Probe wird mittels eines Algorithmus ein sog. RQI-Wert (max. 10, min. 1) errechnet, der ein Maß für die Qualität/Integrität der RNA ist (Denisov 2008). Vom Experion-System erfolgt anhand des RQI-Wertes eine farbkodierte Klassifizierung (grün, gelb, rot), hierbei werden RQI-Werte <4,0 rot markiert, diese gelten aufgrund der zu hohen Degradierung als qualitativ nicht ausreichend für weitere Analysen (Gingrich 2008).

Für die Messungen wurde das RNA Standard Sens Kit verwendet, das RNA-Konzentrationen zwischen 5ng/µl und 500ng/µl analysiert, sodass die Proben zunächst auf 100ng/µl mit DEPC-Wasser verdünnt wurden. Laut Protokoll wurde nach Reinigen der Elektroden und Bereiten der Reagenzien (G- und GS-Lösung) je 2µl jeder Probe sowie der mitgelieferten RNA-Ladder für 2 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurde der Analyse-Chip durch Einsetzen der G- und GS-Lösung vorbereitet, dann die entsprechenden Slots des Chips mit 5 µl Loading Buffer versetzt und anschließend 1µl jeder Probe sowie der Ladder eingesetzt und nach Mischen im dafür vorgesehenen Vortexer abschließend auf das Eindringen von Luftblasen kontrolliert, diese wurden gegebenenfalls durch eine sterile Kanüle entfernt. Nach Abschluss der Messung wurde das Ergebnis dargestellt (siehe Abbildung 8).

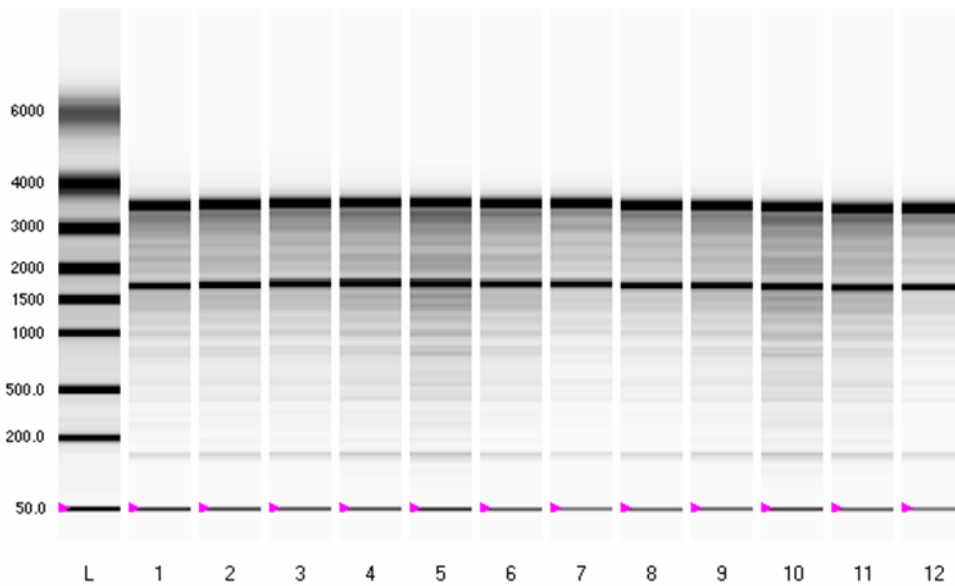


Abbildung 8: Repräsentatives Ergebnis einer RNA-Analyse mit dem Experion-Elektrophorese-System. Nach Analyse der Ladder (L), werden 12 zu analysierenden Proben vermessen. Anhand der Trennschärfe der Banden wird ein RQI-Quotient errechnet, der ein Maß für die Qualität der isolierten RNA darstellt. RQI=10 keine Degradierung, beste Qualität. RQI=1 vollständig

3.3.4 Ergebnisse der RNA-Analyse am Experion-System

In den Leber- und Nierenproben zeigte sich eine gleichbleibend hohe RNA-Qualität mit hohen RQI-Werten meist über 7, sodass hier eine geringe Degradierung und somit eine hohe Integrität sichergestellt werden konnte.

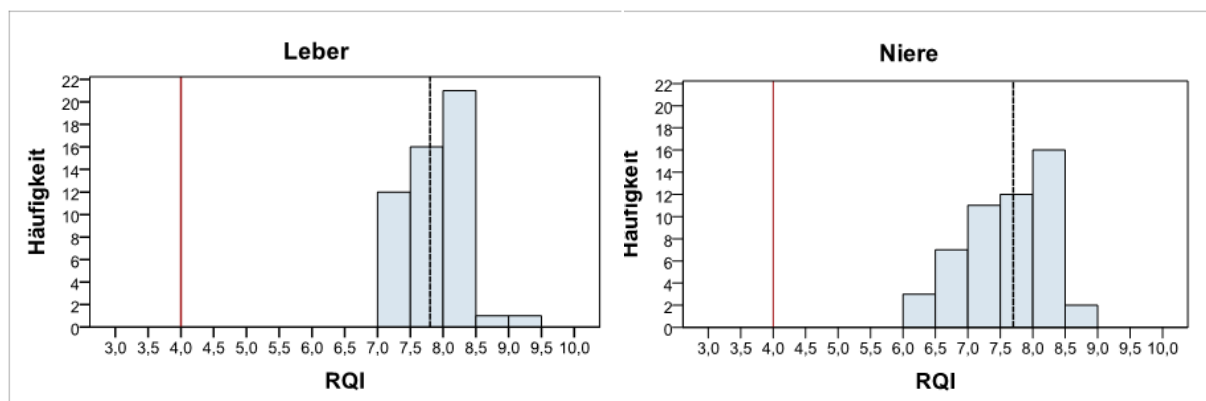


Abbildung 9: Häufigkeiten und Verteilung der einzelnen RQI-Werte der isolierten RNA aus den Leber- und Nierenproben. Die vertikale Linie bei 4,0 markiert den gewählten Cut-Off-Wert für eine noch ausreichende Probenqualität. Die gestrichelte Linie zeigt den Medianwert an. Es zeigt sich eine hohe Integrität der RNA, wenige Nierenproben weisen eine geringe Degradierung auf.

Die Lungenproben zeigten größtenteils ebenfalls hohe, zufriedenstellende RQI-Werte, jedoch lag der Median mit 6,7 hier niedriger als bei den Leber- und

Nierenproben (7,8 bzw. 7,7). Insgesamt wurden 6 Lungenproben, deren RQI-Werte <4,0 waren, aufgrund der mangelnden Qualität für die weiteren Analysen ausgeschlossen (siehe Abbildung 10).

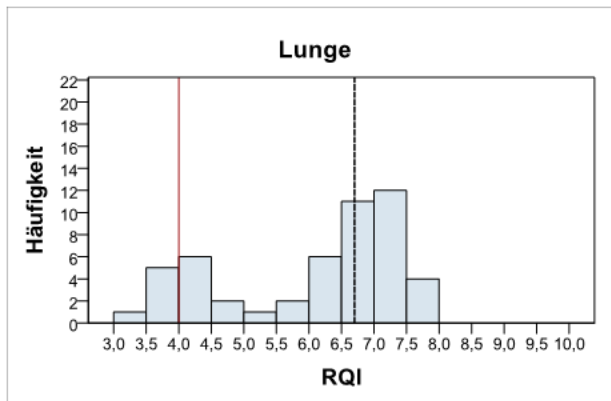


Abbildung 10: Häufigkeiten und Verteilung der einzelnen RQI-Werte der isolierten RNA aus den Lungenproben.

Die vertikale Linie bei 4,0 markiert den gewählten Cut-Off-Wert für eine noch ausreichende Probenqualität. Die gestrichelte Linie zeigt den Medianwert an. Es zeigt sich eine überwiegend hohe Integrität der RNA (Median bei 6,7), jedoch weisen einige Lungenproben eine verstärkte Degradierung auf, sodass insgesamt 6 Lungenproben aufgrund eines $RQI < 4,0$ für weitere Analysen ausgeschlossen wurden.

3.3.5 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription der isolierten RNA zu cDNA erfolgte mittels RevertAid first Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Zunächst wurden von den Proben der Versuchsreihe Aliquots von je 20 μl und einer Konzentration von 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ durch Verdünnung mit DEPC hergestellt.

Anschließend wurde jeweils ein Prä- und Maininkubationsmix für alle Proben der jeweiligen Versuchsreihe angefertigt, um die Wahrscheinlichkeit von Pipettierfehlern zu minimieren. Nach Herstellen des Präinkubations-Mix, der pro Einzelreaktion 9,8 μl RNA (100 $\text{ng}/\mu\text{l}$), 1,2 μl Oligo(dT) sowie 1 μl Random Hexamer enthielt, wurde dieser für 5 min bei 65°C inkubiert und für 2 min auf Eis abgekühlt. Im Anschluss wurde der Maininkubationsmix hergestellt, pro Einzelreaktion bestehend aus 4 μl 5x Reaction Buffer, 2 μl dNTP(10mM), 1 μl RiboLock RNase Inhibitor sowie 1 μl RevertAid RT. Dieser wurde mit den abgekühlten 8 μl des Präinkubations-Mix vorsichtig gemixt und anschließend im Thermal Cycler für 70 Minuten inkubiert (5 min/25°C, 60 min/42°C, 5 min/70°C). Es wurde aufgrund der Verwendung eines etablierten Verfahrens angenommen, dass die eingesetzte RNA nahezu vollständig und hocheffektiv in cDNA umgeschrieben wurde, sodass eine Konzentration der cDNA von 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ resultierte. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C aufbewahrt.

3.3.6 Primerdesign

Die Sequenzen für das nachfolgende Primerdesign wurden mit Hilfe der NCBI Nucleotide-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) ermittelt und über die Software Primer3 (v. 0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) erstellt. Dabei wurden die Primer-Sequenzen möglichst nahe an die Sonden-Sequenz der Microarray-basierten Voruntersuchungen platziert, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der mit beiden Methoden erhaltenen Expressionswerte zu gewährleisten. Abschließend wurden die gewählten Primer einer Analyse mit dem BLAST-Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) unterzogen, um die mögliche Bildung von unspezifischen PCR-Produkten zu erkennen, die durch Bindung des ausgewählten Primerpaares an eine, der Zielsequenz ähnliche, Sequenz entstehen. Die Herstellung der Primer erfolgte bei biomers.net, Ulm. Die in Tabelle 2 ersichtlichen Primersequenzen wurden ermittelt.

Tabelle 2: Primersequenzen für die Genexpressionsanalyse mittels real-time qPCR
Sequenzen der „forward“ (fw)- und „reverse“ (rv)-Primer für alle im Rahmen dieser Studie untersuchten Zielgene

<i>Primer</i>	Sequenz	Produktlänge in bp	NCBI Referenz-Sequenz
<i>Lcn2 fw</i>	ATGGAAGAACCAAGGAGCTG	104	NM_008491.1
<i>Lcn2 rv</i>	GGTGGGGACAGAGAAGATGA		
<i>Slc22a17 fw</i>	AGCAGCCTTTGAGCCTAGTGGGA	86	NM_021551.4
<i>Slc22a17 rv</i>	TGGGGTAGCCTTGCCTTCCTGT		
<i>Fth1 fw</i>	ACGCAAGATGGGTGCCCTG	104	NM_010239.1
<i>Fth1 rv</i>	ACGTGGCTTTGGGGAAGTCAGC		
<i>Ftl1 fw</i>	CAACCATCTGACCAACCTCCGCA	86	NM_010240.2
<i>Ftl1 rv</i>	AGAGATACTCGCCCAGAGACCCCT		
<i>Tfr3 fw</i>	GCAGCGGAAGTGGCTGGTCA	186	NM_011638.4
<i>Tfr3 rv</i>	ACGGAAGTAGTCTCCACGAGCGG		
<i>Gusb fw</i>	GAAACCCGCCGCATATTAC	109	NM_010368.1
<i>Gusb rv</i>	CCCCAGGTCTGCATCATATT		
<i>Actb fw</i>	GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT	92	NM_007393.1
<i>Actb rv</i>	CGGATGTCAACGTCACACTT		
<i>Gapdh fw</i>	CAACAGCAACTCCCACTCTTC	164	NM_008084.2
<i>Gapdh rv</i>	GGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT		
<i>Hprt1 fw</i>	TGACACTGGTAAAACAATGCA	94	NM_013556.2
<i>Hprt1 rv</i>	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT		

3.3.7 Real-Time-qPCR

Die cDNA wurde zunächst auf eine Konzentration von 5ng/µl mit DEPC-Wasser verdünnt, anschließend wurden die Komponenten der qPCR mit Hilfe des Precision Liquid Handling System CAS-1200 (Corbett Life Science) zusammenpipettiert. Hierbei kam folgender Reaktionsansatz zur Anwendung:

10 µl Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix, Stratagene

5 µl Primer Mix (2µM fw, 2µM rv)

5 µl Sample (eingestellt auf 5ng/µl)

Die anschließende Vermessung der Proben geschah am Rotor-Gene 6000 rotary analyzer (Corbett Life Science) nach folgendem Schema:

Aktivierung der Polymerase bei 95°C/10 min

Denaturierung 95°C/15s
Annealing 60°C/30s
Extension 72°C/30s

} 40 Zyklen

Bei jeder Messung wurde eine Negativprobe (DEPC-Wasser) sowie eine non-template-control (Primermix + DEPC-Wasser) mitgeführt, um sowohl Verunreinigungen durch Fremd-DNA als auch ein hohes Selfpriming des jeweiligen Primers auszuschließen.

3.3.8 Bestimmung von Ct-Werten

Um die gewonnenen qPCR-Daten quantitativ zu analysieren, wurde zunächst der *cycle threshold* (Ct-Wert) bestimmt. Diese Größe beschreibt den Zyklus, bei dem die Amplifikationskurve eine a priori festgelegte Fluoreszenzintensität übersteigt. Als Grenzwert (*threshold*) für die Fluoreszenzintensität wurde der Wert 10^{-1} gewählt, da sich die Amplifikationskurve hier in der exponentiellen Phase befindet und somit ein Überschuss an Reagenzien vorliegt, sodass eine Hemmung der Reaktion durch limitierte Reagenzien wie in der Plateau-Phase äußerst unwahrscheinlich ist. Der gewählte Grenzwert wurde über alle Analysen hinweg beibehalten, um eine Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten.

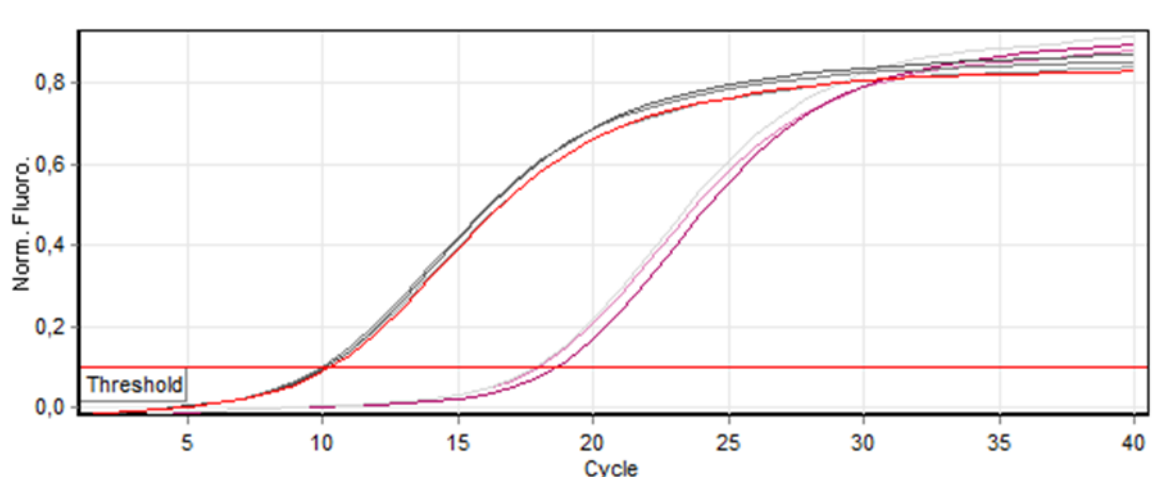


Abbildung 11: Mehrere Amplifikationskurven in linearer Skalierung zur Veranschaulichung. Der gewählte Grenzwert der Fluoreszenzintensität („threshold“) ist als rote Linie dargestellt und liegt wie beschrieben bei 10^{-1} . Die Ct-Werte werden durch den Schnittpunkt der jeweiligen Amplifikationskurve mit dem Grenzwert ermittelt. Da eine hohe Ausgangsmenge des Zieltranskriptes zu einer schnelleren Amplifikation führt und es dadurch zu einem früheren Anstieg der gemessenen Fluoreszenzintensität kommt, stellt der Ct-Wert ein indirektes Maß für die in der jeweiligen Probe enthaltene Transkriptmenge dar und ist daher für die relative Quantifizierung essentiell.

3.3.9 Schmelzkurvenanalyse

Im Anschluss an jede PCR-Reaktion wurde zur genaueren Charakterisierung der amplifizierten PCR-Produkte eine Schmelzkurve aufgezeichnet (siehe Abbildung 12). Hierbei wurde die Temperatur in Intervallen von 0.2 K von 72°C-95°C erhöht, dabei kommt es bei Erreichen einer spezifischen Temperatur (Schmelztemperatur) zur Abtrennung der amplifizierten DNA-Stränge in ihre Einzelstränge und infolgedessen zur Abnahme der gemessenen Fluoreszenzintensität. Die vom Programm des RotorGene 6000 ausgegebene Schmelzkurve stellte die erste Ableitung der Fluoreszenzmessungen dar. Die darauf ersichtlichen Peaks zeigen die Schmelztemperatur des jeweiligen PCR-Produktes sowie –falls vorhanden– unspezifische Produkte oder Primer-Dimere, wobei diese durch eine niedrigere Schmelztemperatur als das spezifische PCR-Produkt erkennbar sind.

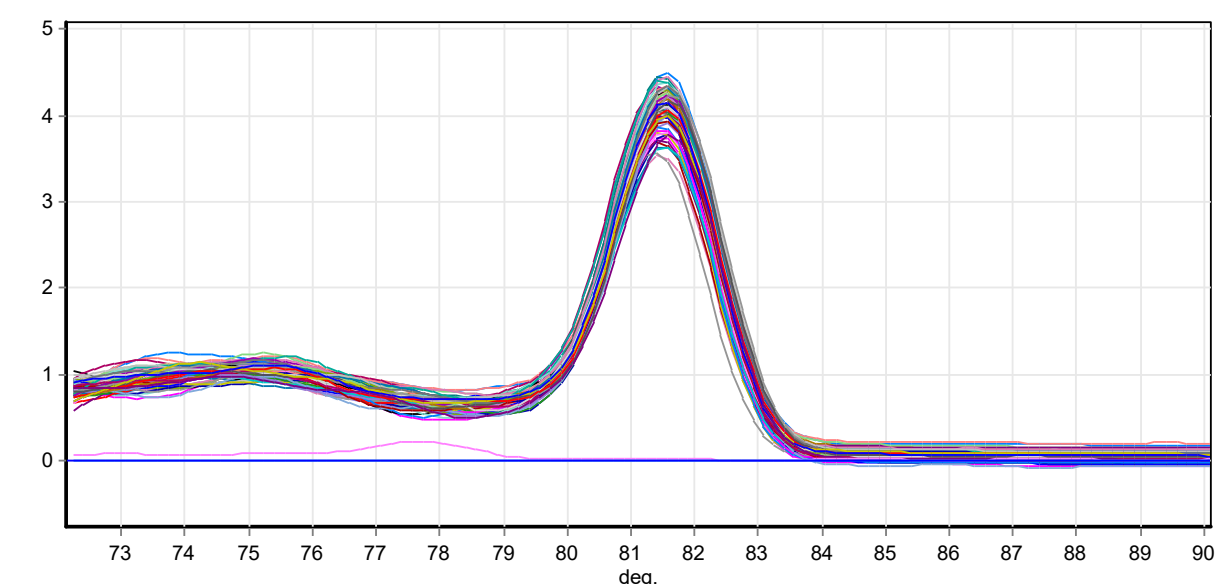


Abbildung 12: Darstellung der Schmelzkurve für das PCR-Produkt des LCN2-Primers im Programm RotorGene 6000.

Es zeigt sich ein einheitlicher Peak als spezifischer Schmelzpunkt, da keine weiteren Peaks zur Darstellung kommen spricht dies gegen die Bildung von Primer-Dimeren oder unspezifischen PCR-Produkten. Die Höhe der Peaks zeigt die jeweilige Menge des Produktes an.

3.3.10 DNA-Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Produkte

Um sicherzustellen, dass die verwendeten Primer die gewünschte Sequenz amplifizieren, wurde eine DNA-Gelelektrophorese auf einem 1,5% Agarosegel angefertigt. Zunächst wurde das Gel durch Mischen von 1,2 g Agarose mit 80 ml 1x TAE-Puffer und anschließendem Erhitzen hergestellt. Nach Abkühlen bis ca.40°C sowie Zugabe von 2µl SYBR Green, wurde das Gel in die Gießkammer eingefüllt und anschließend unter Lichtschutz für 60 Minuten ausgehärtet. Nachfolgend wurde das

Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingelegt und die Kammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt, sodass das Gel mind. 0,5 cm mit Puffer bedeckt war, anschließend wurden die Kämme entfernt. Zur Probenvorbereitung wurden 4µl DEPC-H₂O + 2µl Ladepuffer (6x Orange Loading Dye Solution) + 2µl der zu analysierenden Probe gemischt und kurz abzentrifugiert.

Weiterhin wurden ein Größenstandard (O'Gene Ruler 100bp DNA Ladder, Fermentas) zur Skalierung sowie eine Negativkontrolle (H₂O) zum Ausschluss von Verunreinigungen verwendet. Die fertigen Probengemische wurden nun in die vorgesehenen Geltaschen eingefüllt und das Gerät bei 80V für 60 Min angestellt. Die Auswertung der Gelelektrophorese erfolgte mit Hilfe des UV-Detektionsgerätes der Firma Qiagen (QIAxcel ScreenGel 1.0.2.0), siehe Abbildung 13.

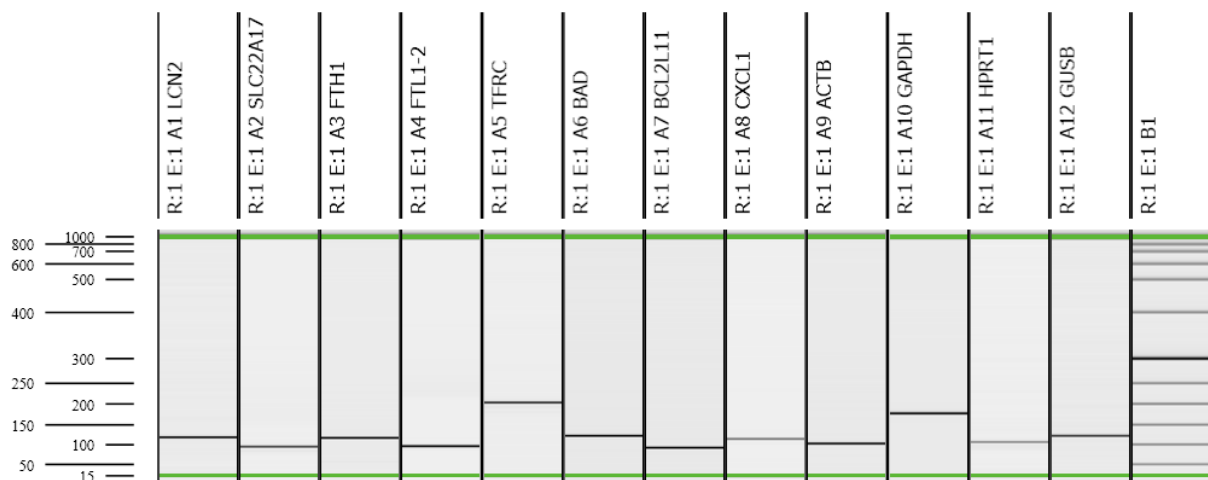


Abbildung 13: DNA-Gelelektrophorese mit PCR-Produkten der verwendeten Primer und anschließende automatisierte Auswertung (QIAxcel ScreenGel 1.0.2.0.)

Anhand der linksseitig dargestellten Ladder als Größenstandard lassen sich die Produktlängen der einzelnen Primer bestimmen, diese entsprechen den theoretischen Werten aus dem Primerdesign. Andere unspezifische Amplifikate, wie beispielsweise Primerdimere, waren nicht zu erkennen.

3.3.11 Ermittlung der Primereffizienzen

Das Konzept der RT-PCR geht davon aus, dass in jedem Zyklus eine Verdopplung der PCR-Produkte stattfindet, dies setzt eine Primereffizienz von 100% voraus. Da die Primereffizienzen in der Realität jedoch zwischen 70%-100% schwanken, müssen diese bestimmt und bei der Quantifizierung berücksichtigt werden (Yuan et al. 2008). Dementsprechend hat die ermittelte Primereffizienz bei der Berechnung der Expressionsveränderungen nach der Pfaffl-Methode erheblichen Einfluss auf das Ergebnis (Pfaffl 2001). In dieser Arbeit wurde die experimentelle Bestimmung mit Hilfe serieller Verdünnungsreihen gewählt, da dies eine etablierte Methode darstellt (Pfaffl 2001), es soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass durch Verdünnungsreihen

errechnete Effizienzen tendenziell etwas höher erscheinen als die realen Effizienzen der Primer, da hierbei stark idealisierte Reaktionsbedingungen vorherrschen (aufgereinigtes PCR-Produkt als „template“, keine störenden Fremdtranskripte, etc.).

Pro Primermix wurden jeweils drei PCR-Reaktionsansätze gepoolt und die so erhaltenen 50µl PCR-Produkt mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, anschließend wurde die Konzentration der aufgereinigten DNA am Nano-Drop Photospectrometer bestimmt und mit DEPC-Wasser auf 10 ng/µl eingestellt. Für die Ermittlung der Primereffizienzen wurden 7-fach-Verdünnungen mit seriellen Verdünnungsschritten von 1:10 ausgehend von einer Konzentration von 1 pg/µl mit Hilfe des Precision Liquid Handling System CAS-1200 (Corbett Life Science) für jeden Primer erstellt, folglich ergaben sich folgende Verdünnungsschritte: 1 pg/µl, 100 fg/µl, 10 fg/µl, 1 fg/µl, 100 ag/µl, 10 ag/µl, 1 ag/µl. Jede Konzentrationsstufe wurde anschließend in Dreifachbestimmung am RotorGene 6000 (Corbett Life Science) vermessen.

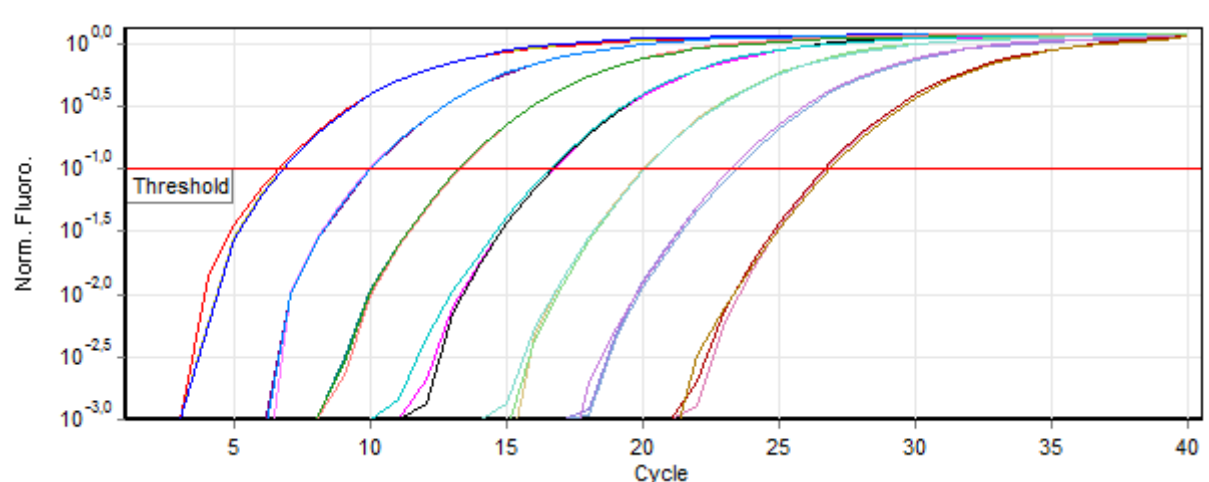


Abbildung 14: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Primereffizienz in logarithmischer Skalierung.

Die Amplifikationskurven der Proben mit gleicher Konzentrationsstufe verlaufen im Idealfall gleich und haben einen identischen Ct-Wert, was hier annähernd zur Darstellung kommen soll.

Durch Auftragen der jeweiligen Ct-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration des PCR-Produktes erhält man eine abfallende lineare Funktion, aus deren negativem Anstieg die Primereffizienz E mit folgender Formel (Pfaffl 2001) berechnet werden kann:

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

$$E [\%] = (10^{-1/\text{Anstieg}} - 1) \cdot 100$$

3.3.12 Referenzgen-Analyse mittels *geNorm* und *NormFinder*

Da bei der delta-delta-Ct-Methode die Genexpressionsveränderungen der Zielgene in Relation zu einem oder mehreren Referenzgenen gesetzt werden, ist die Ermittlung der am besten geeigneten Referenzgene notwendig. Hierfür stehen mehrere Anwendungen zur Verfügung, die über unterschiedliche Verfahren diejenigen Referenzgene ermitteln, die eine möglichst stabile Expression zeigen. In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck die beiden etablierten Excel-Anwendungen „geNorm“ (Vandesompele et al. 2002) und „NormFinder“ verwendet (Andersen et al. 2004). Mit „geNorm“ wird für jedes Gen ein Expressionsstabilitätswert M, als die mittlere paarweise Variation dieses Gens, im Verhältnis zu allen anderen getesteten Referenzgenen, berechnet. Hierbei wird vorausgesetzt, dass keine Co-Regulation vorliegt. Durch schrittweisen Ausschluss des Gens mit dem höchsten Stabilitätswert M kann eine Rangfolge der getesteten Gene nach der Stabilität der Genexpression erstellt werden. Ein kleiner M-Wert eines getesteten Referenzgens bedeutet demnach eine hohe Expressionsstabilität. Um die Genauigkeit der nachfolgenden Genexpressionsmessungen zu erhöhen, wird empfohlen mehrere Referenzgene mit einzubeziehen (Vandesompele et al. 2002). Dies erfolgt, indem durch die Bestimmung des geometrischen Mittels der stabilsten Gene ein Normalisierungsfaktor errechnet wird. Durch paarweisen Vergleich der Variation zweier Normalisierungsfaktoren (V-Wert), die aus einer ansteigenden Anzahl von Referenzgenen berechnet wurden, kann außerdem die optimale Anzahl an Referenzgenen bestimmt werden, hier dient als Cut-Off der V-Wert 0,15. Bei höheren Werten wird der Einschluss eines weiteren Referenzgens zur Berechnung des Normalisierungsfaktors empfohlen.

Der „NormFinder“-Algorithmus ist ein mathematisches Modell, welches nicht nur die Gesamt-Variation der jeweiligen getesteten Referenzgene bestimmt, sondern sowohl die Variation innerhalb der Sub-Gruppen (*intra-group variation*) als auch zwischen den Sub-Gruppen (*inter-group variation*) vergleicht und wichtet, dieser Ansatz ist daher weniger anfällig für Fehlinterpretationen, die durch Co-Regulation von potentiellen Referenzgenen entstehen können (Andersen et al. 2004). Die möglichen Referenzgene (*Actb*, *Gapdh*, *Hprt1*, *Gusb*) wurden für das jeweilige Organ mit beiden Berechnungsmodellen untersucht.

3.3.13 Ergebnisse der Referenzgen-Analyse

Die Daten der für die Normalisierung in Frage kommenden Referenzgene *Actb*, *Gapdh*, *Hprt1*, *Gusb* wurden mit den Excel-Anwendungen geNorm und NormFinder für jedes Organ einzeln analysiert. Bei den Leberproben ergaben die beiden Analysemethoden konsistente Ergebnisse, sodass die Referenzgene *Gapdh* und *Hprt1* ausgewählt wurden (siehe Abbildung 15).

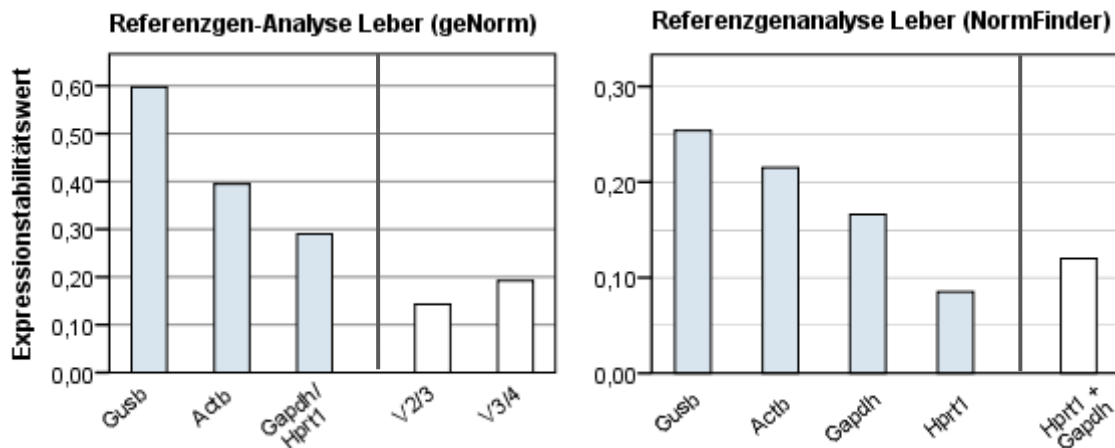


Abbildung 15: Referenzgenanalyse für das Organ Leber.

Je geringer der Expressionsstabilitätswert M ist, desto höher ist die Expressionsstabilität. In der geNorm-Analyse wird zusätzlich die optimale Anzahl an Referenzgenen ermittelt (leere Balken), hier zeigt sich bei V2/3 ein Wert unterhalb des Cut-Off-Wertes von 0,15, sodass bei zwei Referenzgenen die Hinzunahme eines dritten Referenzgens nicht notwendig ist. NormFinder analysiert zusätzlich die beste Kombination zweier Referenzgene. Bei beiden Berechnungsmodellen (geNorm bzw. NormFinder) erwiesen sich die Referenzgene *Hprt1* und *Gapdh* als die stabilsten.

Auch bei den Nierenproben waren die Ergebnisse mit beiden Methoden konsistent, *Gapdh* und *Actb* wurden als geeignete Referenzgene zur Normalisierung der Daten identifiziert (siehe Abbildung 16). Zum Zeitpunkt der Analysen wurde der geNorm-Wert für die Bestimmung der notwendigen Anzahl an Referenzgenen (V-Wert) offensichtlich fehlinterpretiert und dabei *Hprt1* als weiteres (eigentlich nicht erforderliches) Referenzgen mit einbezogen. Mitunter wird jedoch empfohlen standardisiert die drei stabilsten Referenzgene in den Normalisierungsfaktor mit einzubeziehen (Vandesompele et al. 2002), sodass dies auch unter Hinzunahme zweckdienlicher Literatur nicht als nachteilig für die nachfolgenden Expressionsanalysen zu werten ist.

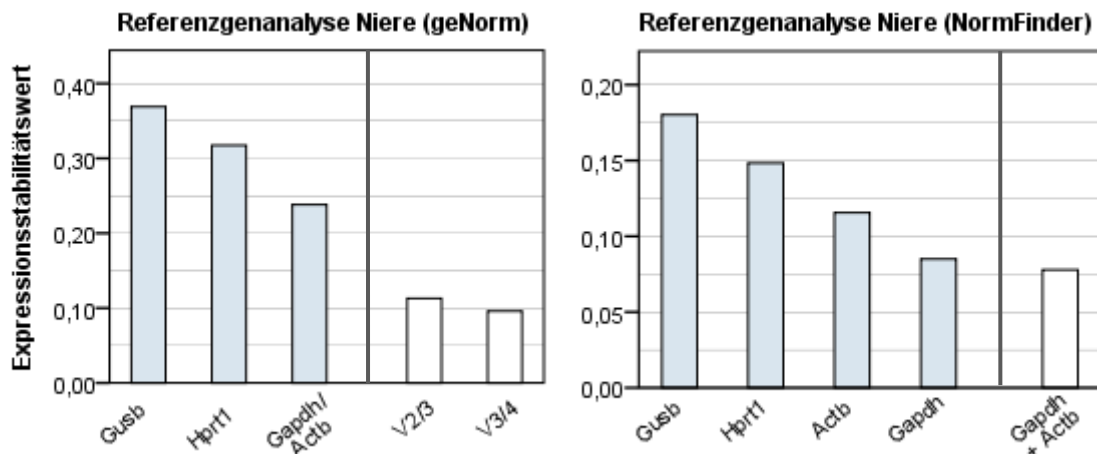


Abbildung 16: Referenzgenanalyse für das Organ Niere.

Bei beiden Berechnungsmodellen (geNorm bzw. NormFinder) weisen die Referenzgene *Gapdh* und *Actb* den geringsten Wert auf und besitzen somit die höchste Expressionsstabilität der getesteten Gene. Der Wert bei V2/3 liegt wiederum unter 0,15, sodass ein weiteres drittes Referenzgen nicht erforderlich ist.

Bei den Lungenproben ergaben sich mit den beiden Berechnungsmodellen unterschiedliche Ergebnisse (siehe Abbildung 17), es wurden daher die, von beiden Modellen als die drei stabilsten Referenzgene identifizierten Gene *Actb*, *Hprt1* und *Gapdh* ausgewählt.

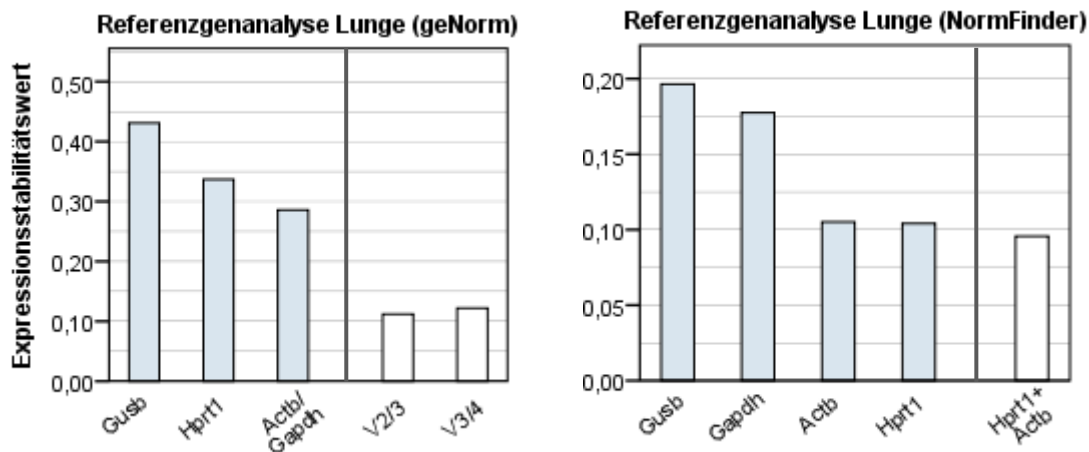


Abbildung 17: Referenzgenanalyse für das Organ Lunge.

Hier unterscheiden sich die Ergebnisse hinsichtlich der stabilsten Referenzgene. Während geNorm *Actb* und *Gapdh* ermittelte, zeigte NormFinder *Hprt1* gefolgt von *Actb* als geeignete Referenzgene an. Es wurden daher die (in beiden Modellen) drei stabilsten Referenzgenen zur Berechnung des Normalisierungsfaktors herangezogen.

Für die Herzproben zeigen beide Algorithmen die Referenzgene *Hprt1* und *Gapdh* als stabilste Gene an, die geNorm-Analyse ergibt keine Notwendigkeit für den Einschluss eines weiteren Referenzgens (V-Wert <0,15).

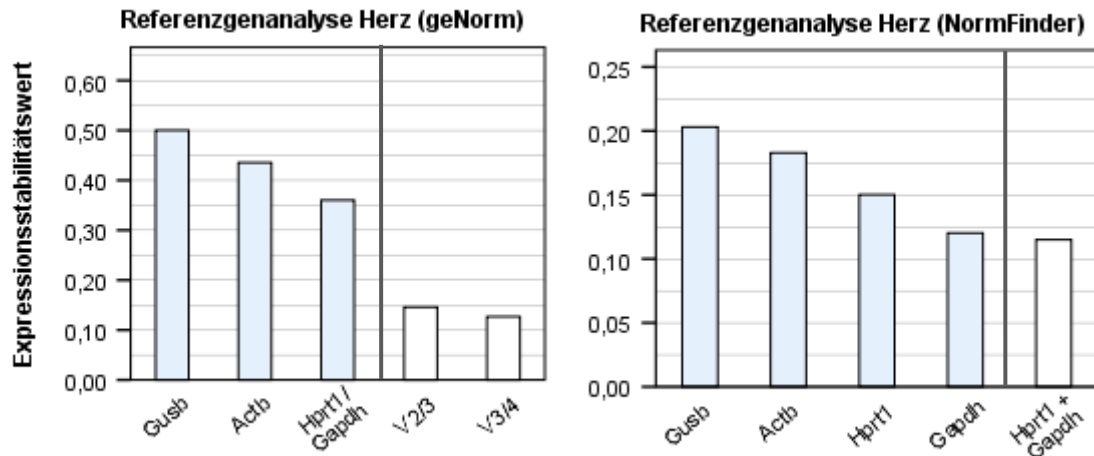


Abbildung 18: Referenzgenanalyse für das Organ Herz.

Konsistente Ergebnisse der beiden Berechnungsmodelle geNorm und Normfinder. *Hprt1* und *Gapdh* weisen den kleinsten Expressionsstabilitätswert auf und sind daher die stabilsten Referenzgene. NormFinder identifiziert die Kombination dieser beiden Gene als die am besten geeignete.

3.3.14 Relative Quantifizierung

Die Genexpressionsveränderungen wurden nach der etablierten delta-delta-Ct-Methode mit folgender Formel bestimmt (Pfaffl 2001).

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

In den Zähler der Formel geht die Effizienz des Primerpaares für das jeweilige Zielgen (*target*) potenziert mit der Differenz der Ct-Werte von unbehandelten (*control*) vs. septischen- bzw. sham-Proben (*sample*) ein. Analog dazu berechnet sich der Nenner für das Referenzgen (*reference*, *ref*), hierbei wurde jedoch der, aus den vorher ermittelten Referenzgenen errechnete, Normalisierungsfaktor eingesetzt. Die mit Hilfe der Pfaffl-Formel berechneten *ratios* zeigen bei einem Wert über 1 eine Hochregulation des Gens, bei Werten zwischen 0 und 1 eine Herabregulation des Gens an. Nachfolgend wurden die Daten \log_2 -transformiert, so dass Hochregulation bzw. Herabregulation nur mit positivem bzw. negativem Vorzeichen belegt sind.

3.3.15 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 19 ausgewertet.

Um das passende statistische Verfahren zur Prüfung auf signifikante Unterschiede der Expression eines Gens zwischen den Versuchsgruppen auszuwählen, wurde zunächst der Kolmogorov-Smirnov-Test (KS-Test) durchgeführt um zu prüfen, ob die Daten eines jeweiligen Gens normalverteilt sind: hierzu wurden jeweils alle Daten

eines Gens über alle Gruppen hinweg – nach Organen getrennt - herangezogen, da aufgrund der relativ geringen Gruppengröße zu wenige Daten vorlagen, um den KS-Test für jede Versuchsgruppe einzeln durchzuführen. Liegt der Wert der asymptotischen Signifikanz im KS-Test $<0,05$ weichen die Daten mit 95%-Wahrscheinlichkeit von einer Normalverteilung ab, sodass zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in diesem Falle der Mann-Whitney-U-Test als nicht parametrischer Test durchgeführt wurde. Im Falle der Normalverteilung wurde eine einfach-faktorielle Varianzanalyse mit anschließender Post hoc-Analyse mittels Bonferroni-Prozedur durchgeführt. Zur graphischen Veranschaulichung wurde bei nicht konsistent vorliegender Normalverteilung die Darstellung anhand von Whisker-Box-Plots gewählt. Bei den beschriebenen Tests wurde jeweils ein Fehlerniveau von 5% gewählt.

3.3.16 Histologische Methoden

Für die histologischen Untersuchungen lagen die Gewebe zu Beginn dieser Arbeit bereits in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet vor (siehe Abschnitt 3.1). Die Herstellung der Schnittpräparate und die anschließenden immunhistochemischen Färbungen mit einem NGAL-Antikörper (purified rabbit polyclonal Anti-LCN2, Cat.#AB2267, Milipore) wurden von Frau Brigitte Specht (AG Exp. Anästhesie, Uniklinikum Jena) durchgeführt. Es wurden jeweils drei Organe (Leber, Lunge, Niere) einer Nummer auf einem Objektträger platziert, ein Objektträger als Negativkontrolle. Folgendes Protokoll wurde für die immunhistochemische NGAL- Färbung verwendet:

Vorbereitung:

- Xylol und Ethanol für Entparaffinierung
- 1x Waschpuffer (wie DAKO) vorbereiten ca. 2 x 2 Liter, selbst hergestellt – ohne Tween
- Retrievalpuffer (DAKO) vorbereiten, evtl. schon vorrätig in Kühlschrank
- 1x PBS für Verdünnung Protein-Block
- POD-Blockierung, Fa. DAKO
- ABC-Kit Vectastain (PK 6101)
 - Blockierung: In 10 ml PBS (1x) 3 Tropfen Goat-Serum aus Kit
 - Sekundärantikörper
 - ABC-Reagenz
- DAB–Kit Vector
- Hämalaun nach Meyer 1:1 mit aq.dest verdünnt

- Feuchte Kammer
- Wässriges Eindeckmedium

Schritt 1: Entparaffinierung und Rehydrierung (nur bei Paraffinschnitten)

Xylol (1x a 10 Min, 1x 5 Min.), Ethanol (2 x 100% a 2 Min., aq.dest., jeweils 2 Min)

Schritt 2: Antigendemaskierung mit DAKO Retrieval-Puffer, pH 6,0 20 Minuten

- Danach 30 Minuten abkühlen lassen
- Danach 2 x 2 Minuten in Waschpuffer spülen

Schritt 3: Peroxidase-Blockierung mit POD-Blockierung von DAKO

- 30 Minuten Inkubation in der feuchten Kammer
- Danach 2 x 2 Min. in Waschpuffer spülen

Schritt 4: Protein-Blockierung aus ABC-Kit Vectastain – siehe Vorbereitung

- 20 Minuten Inkubation bei RT in der feuchten Kammer
- Danach 2 x 2 Minuten in Waschpuffer spülen

Schritt 5: Primärantikörper – Verdünnung in Protein- Blockierung 1:200

Je Schnitt 200 µl mit Pipette auftropfen

Negativ-Kontrolle: in der Nähe des Beschriftungsfeldes nur Protein-Blockierung auftropfen

Inkubation über Nacht bei 4°C

- Danach kurz unter fließendem aq.dest abspülen
- Danach 3 x 2 Minuten in Waschpuffer spülen

Schritt 6: Sekundärantikörper aus Vectastain – Kit

In 10 ml Protein – Blockierungslösung (– siehe Vorbereitung) 1 Tropfen Sek. AK (blaues Etikett)

- 30 Minuten Inkubation in feuchter Kammer
- Danach 3 x 2 Minuten in Waschpuffer spülen

Schritt 7: Vectastain – Elite ABC Reagenz

- In 5 ml PBS jeweils genau 2 Tropfen Reagenz A und B zugeben
- 30 Minuten bei RT stehen lassen
- Inkubation auf den Schnitten 30 Minuten
- Danach 2 x 2 Minuten in Waschpuffer spülen

Schritt 8: Färbung mit Vector – DAB –Kit:

In 5 ml aq.dest: 2 Tropfen Puffer aus Kit, 4 Tropfen DAB, 2 Tropfen Peroxid (– kein Nickel-Verstärker verwenden)

Sofort auf Schnitte aufbringen

Je nach Braunfärbung in Waschpuffer abstoppen

Dauer der Färbung 5 – 15 Minuten

Schritt 9: Gegenfärbung mit Hämalan 1:1 in aq.dest verdünnt

Färbung 5 Minuten

Wässern 7 Minuten

Schritt 10 : Eindecken mit Aqua Tex

4 Ergebnisse

4.1 Genexpressionsanalyse der Zielgene

In den folgenden Abbildungen sollen die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der ausgewählten Zielgene gezeigt werden. Die Darstellung erfolgt aufgrund der vorhandenen Daten (Abschnitt 3.3.15) anhand von Whisker-Box-Plots, hierbei enthält eine Box 50% der Daten, weiterhin ist der Median als horizontale Linie eingezeichnet, hierbei finden sich 50% der Daten ober- bzw. unterhalb dieses Wertes. Demnach befinden sich innerhalb der Box jeweils 25% der Daten ober- bzw. unterhalb des Medianwertes.

Die x-Achse beinhaltet die verschiedenen Versuchsgruppen, auf der y-Achse ist das Ausmaß der Expressionsveränderung als log₂-transformierter Datensatz dargestellt, sodass ein Wert von 0 keine Veränderung der Expression bedeutet, ein Wert von 1 kennzeichnet eine Verdopplung der Expression, entsprechend zeigt ein Wert von -1 eine Halbierung der Transkriptmenge an.

Es wurde die organübergreifende grafische Darstellung für jeweils ein Zielgen ausgewählt, um das Ausmaß der Expressionsveränderung zwischen den einzelnen Organen vergleichbar zu machen.

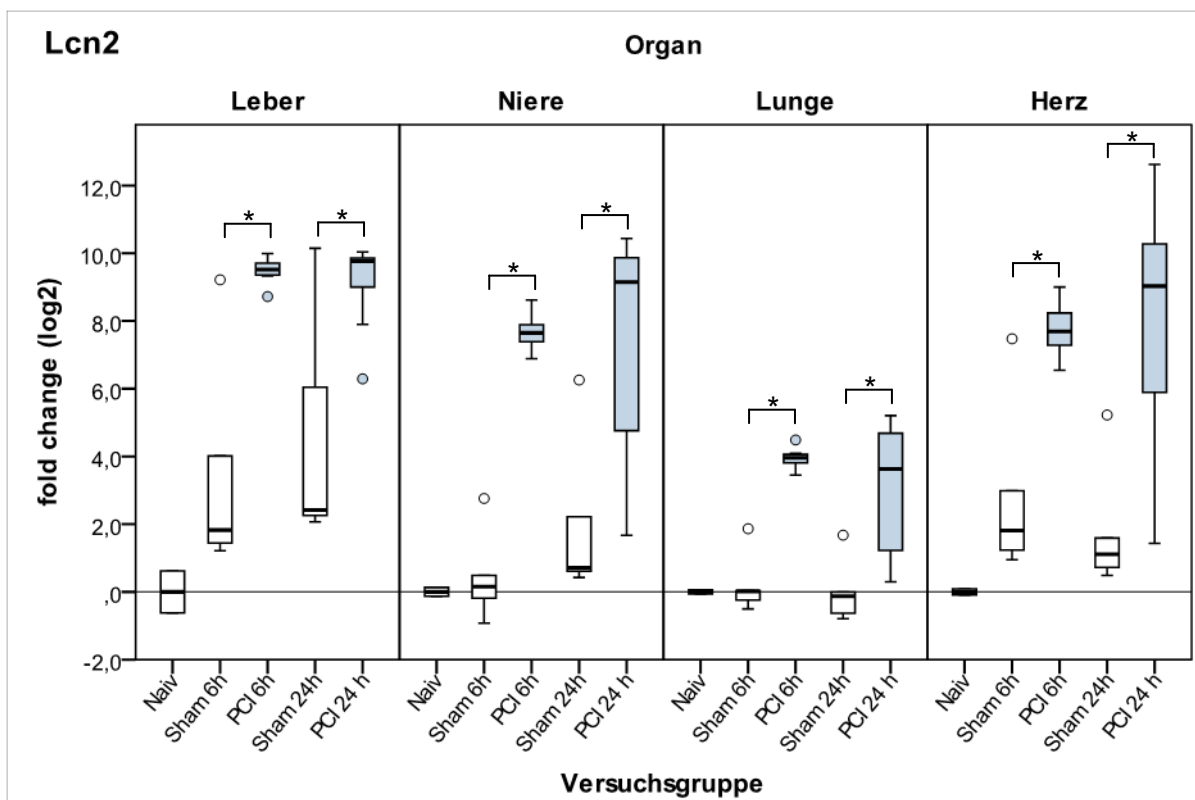


Abbildung 19: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für das Gen *Lcn2*

4.1.1 Ergebnisse der Genexpression für *Lcn2*

Für das Gen *Lcn2* liegen bei allen Organen nicht normalverteilte Daten vor, sodass der Mann Whitney-U-Test als nichtparametrischer Test zum Vergleich der Daten gewählt wurde.

Leber: Insgesamt lässt sich ein starker Anstieg der Expression von *Lcn2* bei den septischen Tieren im Vergleich zu den Sham-Tieren beobachten. Im Median-Vergleich der 6h PCI- mit den 6h Sham-Tieren zeigt sich ein 206-facher Anstieg, nach 24h ist die Expression der PCI-Tiere um das 163-fache angestiegen, wobei bereits die beiden Sham-Gruppen einen deutlichen Anstieg der Transkription auf das 3,5-fache (6h) bzw. 5,3-fache (24h) der unbehandelten Tiere aufweisen. Bei den Sham-Tieren ist zudem eine größere Streuung der Daten vor allem oberhalb des Medianwertes zu beobachten als bei den septischen Tieren. Weiterhin zeigt sich, dass die Werte der 24h PCI-Tiere deutlich stärker streuen als diejenigen der 6h PCI-Tiere.

Niere: Ähnlich zu den Leberproben zeigt sich in der Niere ebenfalls ein starker Anstieg der Transkription von *Lcn2* bei den septischen Tieren. Im Median-Vergleich der 6h PCI- mit den 6h Sham-Tieren steigt die Expression um das 180-fache. Vergleicht man die 24h PCI- mit den 24h Sham-Tieren ergibt sich ein Anstieg um das 347-fache. Die Sham-Tiere weisen lediglich nach 24h eine leichte Erhöhung der Expression (um 60%) auf. Auch in der Niere ist bei den 24h PCI-Tieren eine starke Streuung der Daten unterhalb des Medianwertes zu verzeichnen.

Lunge: Die Lungenproben der septischen Tiere zeigen ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Transkription im Vergleich zu den Sham-Tieren, verglichen mit den Leber- und Nierenproben steigen die Expressionswerte hier aber weniger stark an (15-fach bei 6h und 14-fach bei 24h). Die Sham-Tiere zeigen nur minimale Expressionsveränderungen verglichen mit den unbehandelten Tieren. Auch in der Lunge ist eine deutliche Streuung der Daten bei den 24h PCI-Tieren zu beobachten.

Herz: Auch bei den untersuchten Herzen steigt die Expression der septischen Tiere verglichen mit den Sham-Tieren stark (bei 6h 59-fach, bei 24h 242-fach). Die Sham-Tiere zeigen einen 2,2- bis 3,5-fachen (6h bzw. 24h) Anstieg der Expression verglichen mit den unbehandelten Tieren. Bei den 24h PCI-Tieren fällt eine starke

Streuung der Datenwerte auf beiden Seiten des Medianwertes auf, vor allem unterhalb des Medianwertes.

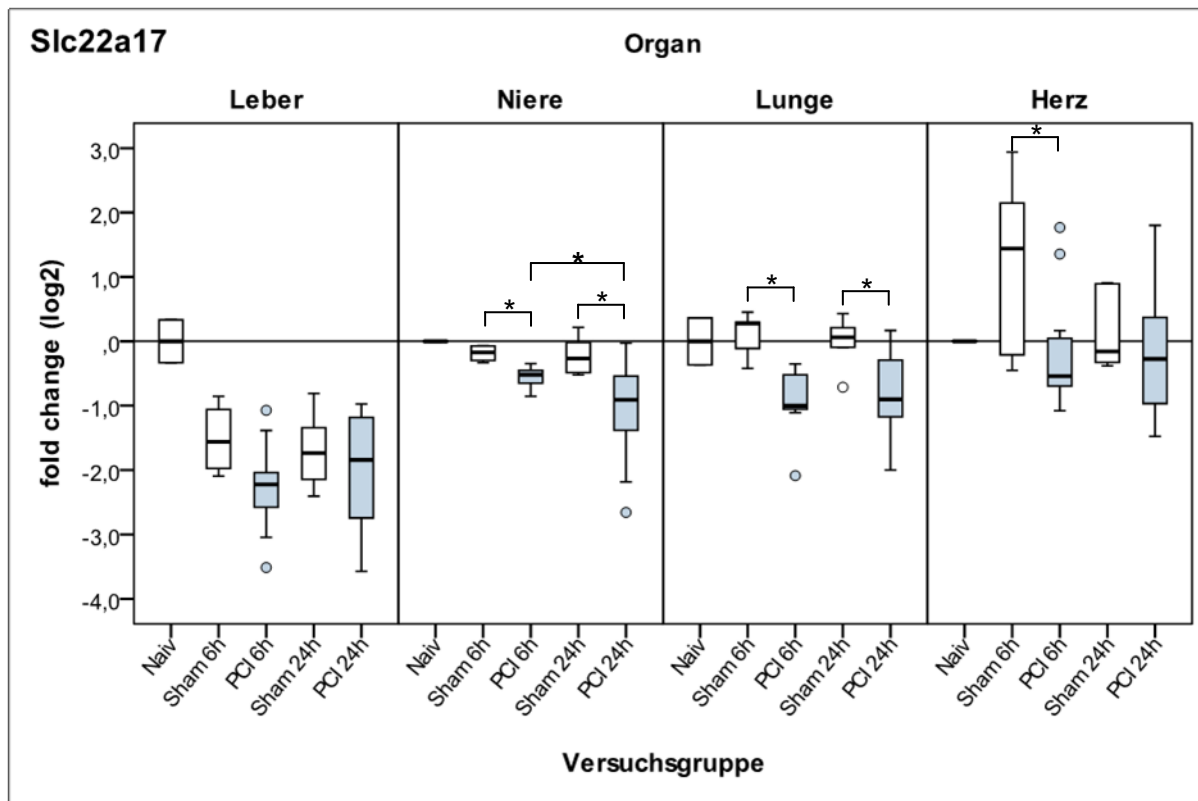


Abbildung 20: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für das Gen *Slc22a17*

4.1.2 Ergebnisse der Genexpression für *Slc22a17*

Leber: Insgesamt reagierten alle Behandlungsgruppen mit einer Herabregulation der Transkription von *Slc22a17*, bereits die Sham-Tiere senkten die Transkription um das 3-fache im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Im PCI-Modell ergab sich nach 6h eine leichte Expressionsminderung um 60%, nach 24h PCI-Behandlung zeigt sich eine nur minimale Herabregulation um 10% (jeweils im Vergleich zur entsprechenden Sham-Gruppe), wobei jedoch die Streuung der Daten zu beachten ist. Eine statistische Signifikanz bei einem Fehlerniveau von 5% liegt hier nicht vor.

Niere: In der Niere zeigte sich eine moderate Herabregulation von *Slc22a17*, nach 6h PCI vermindert sich die Transkriptmenge um 30%, nach 24h PCI kann eine 60% Herabregulation im Vergleich zur Sham-Gruppe beobachtet werden (jeweils statistisch signifikant). Die Sham-Tiere weisen nur geringe Veränderungen zu den unbehandelten Tieren auf (Herabregulation nach 6h und 24h um 10% bzw. 20%).

Die Streuung der Daten ist insgesamt gering, lediglich die Werte der 24h PCI-Tiere zeigen eine etwas stärkere Streuung.

Lunge: Hier sind ähnliche Ergebnisse wie bei den Nierenproben zu erkennen. Die Sham-Behandlung hatte auch hier nur eine minimale Auswirkung auf die Transkription von *Slc22a17*, jedoch reagierten die Tiere im PCI-Modell mit einer Herabregulation der Expression, bei 6h PCI um das 2,4-fache, bei 24h vermindert sich die Expression um 90% (jeweils zur entsprechenden Sham-Gruppe), diese Veränderungen sind statistisch signifikant (auf 5% Fehlerniveau). Auch in den Lungenproben ist im PCI-Modell nach 24h eine etwas stärkere Streuung der Daten zu sehen.

Herz: Im PCI-Modell zeigt sich nach 6h eine Herabregulation um das 3,9-fache, nach 24h ist der Effekt nur minimal (10% Senkung) und statistisch nicht signifikant. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Daten hier bereits bei beiden Sham-Behandlungsgruppen eine größere Streubreite aufweisen, der Median nach 6h Sham-Behandlung liegt 2,7-fach höher als bei den unbehandelten Tieren. Die 24h-Sham Tiere weisen wiederum nur minimale (10% Verminderung) zu den unbehandelten Tieren auf, jedoch sind auch hier die Daten etwas stärker gestreut.

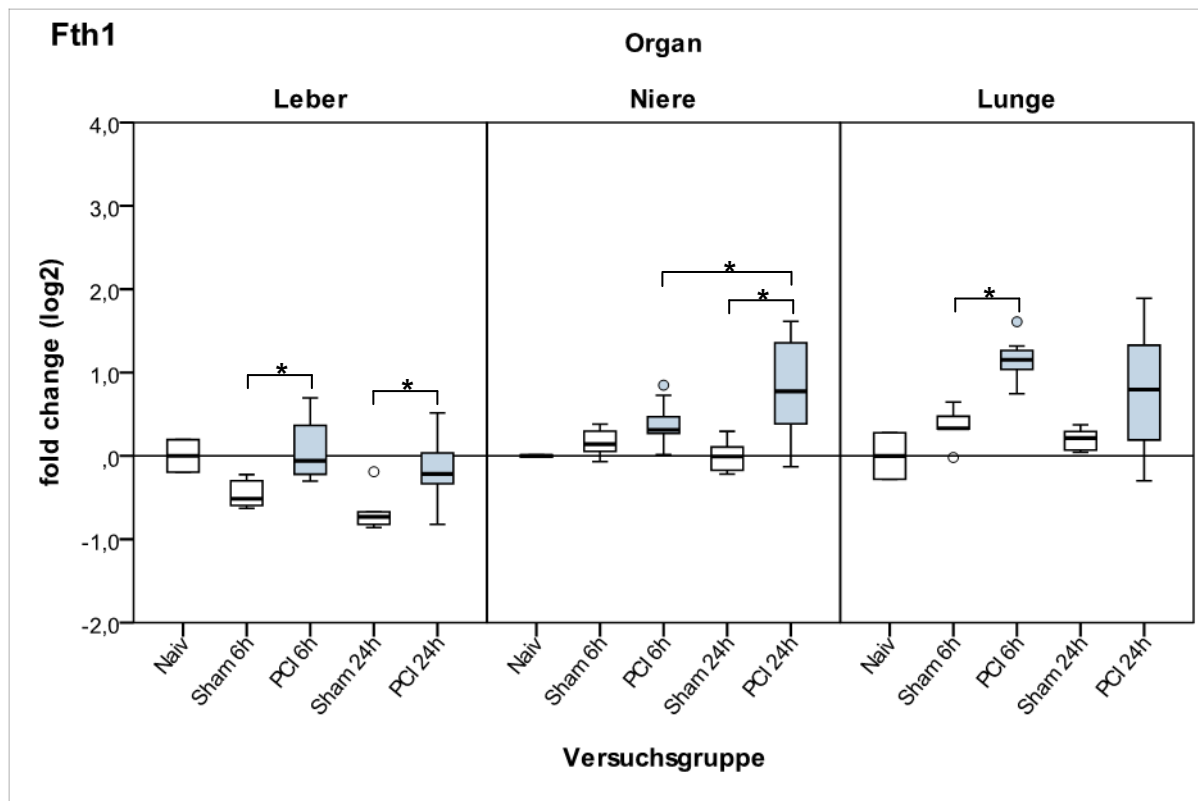


Abbildung 21: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für das Gen *Fth1*

4.1.3 Ergebnisse der Genexpression für *Fth1*

Leber: Die Expression des Gens *Fth1* veränderte sich in der Leber nur geringfügig. Beide PCI-Behandlungsgruppen zeigen bei moderater Streuung der Daten eine Erhöhung der Transkriptmenge um 40% verglichen mit der jeweiligen Sham-Gruppe. Jedoch wurde die Transkription von *Fth1* bei den Sham-Gruppen leicht herabreguliert, bei 6h um 40%, bei 24h um 70%.

Niere: Die Daten weisen eine leichte Hochregulation um 40% nach 6h PCI-Behandlung auf sowie um 70% nach 24h PCI-Behandlung (jeweils im Vergleich zur entsprechenden Sham-Behandlung). Bei den Sham-Gruppen sind im Vergleich zu den unbehandelten Tieren nur minimale Expressionsveränderungen zu sehen. Mit Ausnahme der 24h PCI-Gruppe ist die Streubreite der Daten relativ gering.

Lunge: Die Lungenproben weisen ein ähnliches Expressionsmuster wie die Nierenproben auf. Die Transkriptmenge erhöhte sich nach 6h PCI um 80% bzw. nach 24h PCI um 50% verglichen mit der entsprechenden Kontrollgruppe. Die Sham-Tiere zeigten eine leichte Hochregulation (um 30% nach 6h, um 20% nach 24h) gegenüber den unbehandelten Tieren. Ähnlich wie bei den Nierenproben ist vor allem bei den 24h PCI-Tieren eine deutliche Streuung der Daten zu erkennen.

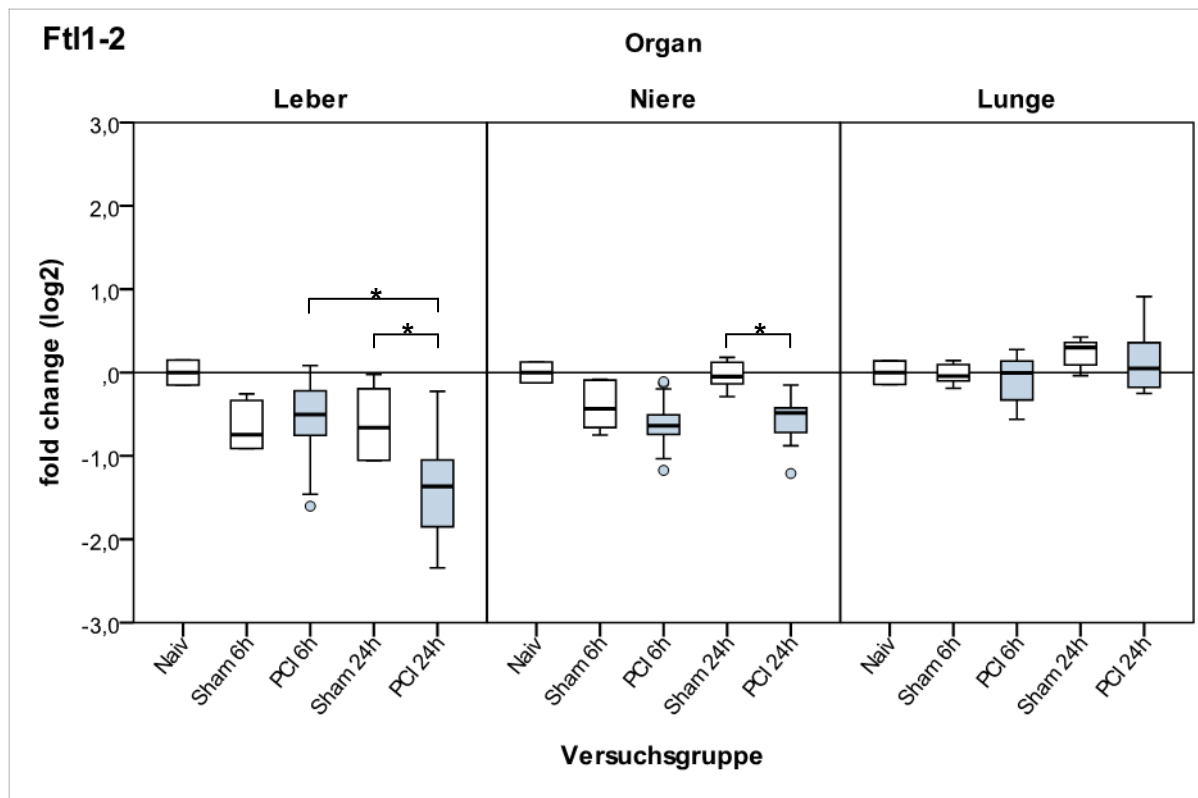


Abbildung 22: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für das Gen *Ftl1*

4.1.4 Ergebnisse der Genexpression für *Ftl1*

Leber: Insgesamt betrachtet fällt eine Herabregulation in allen Behandlungsgruppen auf. Vergleicht man die PCI-Tiere mit den Sham-Tieren zeigen sich inkonsistente Veränderungen: nach 6h PCI-Behandlung steigert sich die Expression um 20%, bei den 24h PCI-Proben zeigt sich jedoch eine Herabregulation des *Ftl1* Gens um 60% (jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe). Dabei sollte jedoch die Streuung der Daten beachtet werden, die vor allem bei den septischen Gruppen etwas höher ist.

Niere: Bei vergleichsweise geringen Veränderungen und geringer Streubreite der Daten, lässt sich eine Herabregulation der 6h PCI-Proben um 20% erkennen, während die 24h PCI-Proben eine etwas stärkere Verringerung der Transkriptmenge um 40% aufweisen. Bei den Sham-Proben zeigt sich lediglich nach 6h eine leichte Herabregulation um 40% im Vergleich zu den unbehandelten Tieren.

Lunge: In der Lunge lassen sich insgesamt nur geringfügige (statistisch nicht signifikante) Veränderungen beobachten. Die PCI-Gruppen zeigen nur nach 24h geringe Veränderungen (Steigerung der Expression um 20%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham). Die Streubreite der Daten ist überwiegend gering, die 24h PCI-Proben zeigen eine etwas erhöhte Streuung oberhalb des Medianwertes.

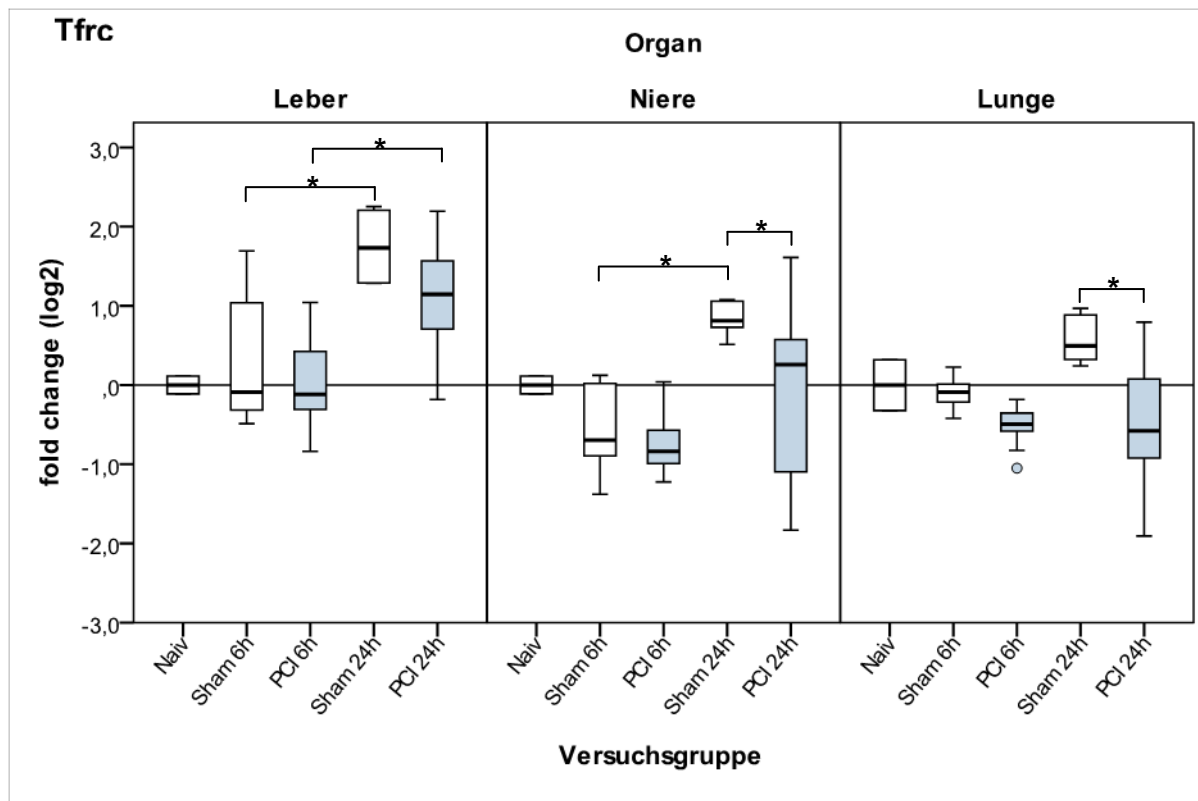


Abbildung 23: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für das Gen *TfrC*

4.1.5 Ergebnisse der Genexpression für *TfrC*

Leber: Die Daten für Transkripte des Transferrin-Rezeptors (*TfrC*) zeigen nach 6h PCI-Behandlung keine signifikanten Expressionsveränderungen, die 24h PCI-Gruppe zeigt eine leichte Herabregulation um 50% (jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe), aufgrund der Verteilung der Daten ist diese jedoch nicht statistisch signifikant. Weiterhin zu beachten ist, dass bereits die Sham-Proben im Vergleich zu den unbehandelten Tieren uneinheitliche Expressionsveränderungen abhängig von der Dauer der Behandlung aufweisen. Während die 6h Sham-Tiere nur minimale Veränderungen zeigten, erhöhte sich bei den 24h Sham-Tieren die Expression von *TfrC* deutlich (3,3-fach). Es ist außerdem eine moderate Streuung der Daten bei allen behandelten Tieren zu sehen.

Niere: Im Vergleich der septischen Tiere mit der entsprechenden Sham-Gruppe zeigt sich eine geringe Verminderung der Transkriptmenge für *TfrC* (6h PCI um 10%, 24h PCI um 50%). Die Sham-Behandlung hat jedoch sehr unterschiedliche Auswirkungen, nach 6h zeigt sich eine Herabregulation um 60%, wohingegen nach 24h eine Hochregulation um 80% zu beobachten ist. Weiterhin findet sich eine moderate Streuung der Daten bei den 6h Sham- und PCI-Tieren und eine größere Streubreite bei den 24h PCI-Proben.

Lunge: Das Expressionsmuster ähnelt dem der beiden anderen untersuchten Organe. Sowohl die Transkriptmenge der 6h PCI-Tiere als auch die der 24h PCI-Tiere wurden im Vergleich zur entsprechenden Sham-Gruppe herabreguliert (bei 6h um 30%, bei 24h 2,1-fach). Auch in der Lunge sind uneinheitliche Veränderungen der Sham-Proben im Vergleich zu den unbehandelten Tieren zu beobachten (bei 6h keine Veränderung, bei 24h Hochregulation um 40%). Eine erhöhte Streubreite zeigt sich vor allem bei den 24h PCI-Proben.

4.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

In den immunhistochemischen Untersuchungen erfolgte wie in Abschnitt 3.3.16 beschrieben eine Färbung des Gewebes mit einem Antikörper, der gegen NGAL gerichtet ist. Nachfolgend sollen die Ergebnisse der Färbungen in den untersuchten Organen Niere, Leber und Lunge dargestellt werden.

4.2.1 Niere

Bei den septischen Tieren zeigt sich sowohl nach 6h als auch nach 24h eine deutliche Ansammlung von NGAL im apikalen Bereich von vielen am ehesten proximalen Tubuli des Rindenlabyrinthes, eine sichere Differenzierung zwischen proximalen und distalen Tubuli ist jedoch nicht durchweg möglich. In den Glomeruli kann NGAL vereinzelt in Mesangiumzellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigen die übrigen Tubuli eine nur geringe Reaktion, wie bei den Sham-behandelten Tieren. Eine deutliche Betonung spezifischer Strukturen zeigt sich in den Sham-Gruppen nicht (siehe Abbildung 24). Die Negativkontrollen zeigten keine relevante Anfärbung (nicht dargestellt).

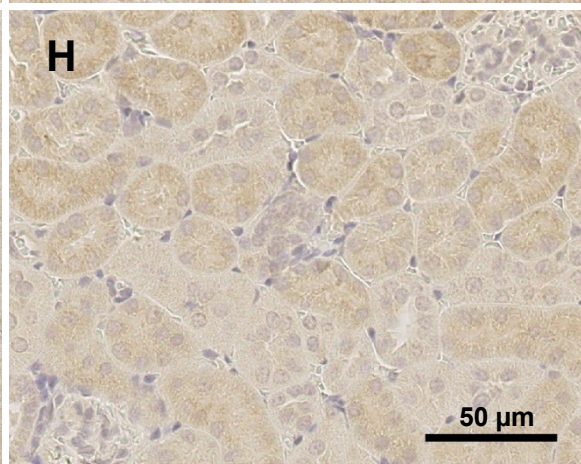
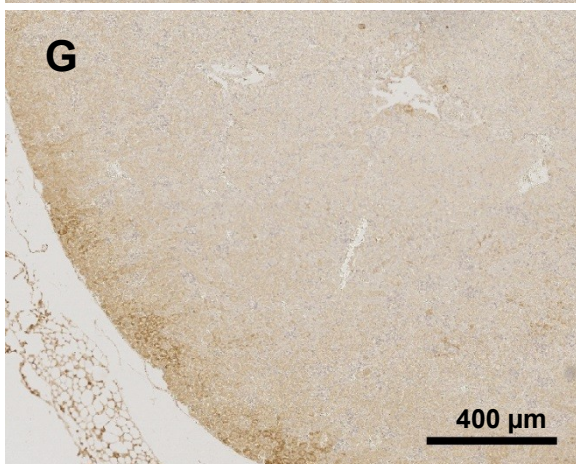
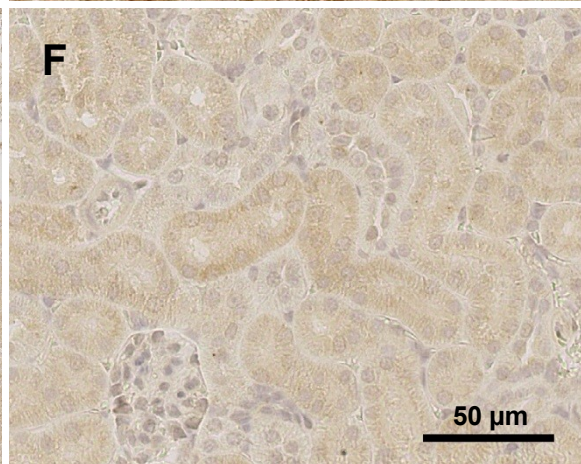
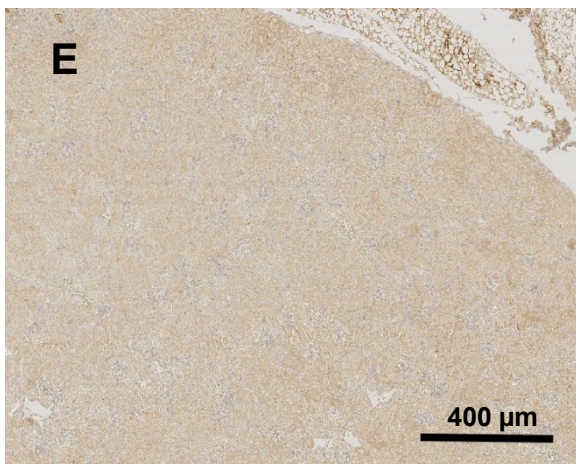
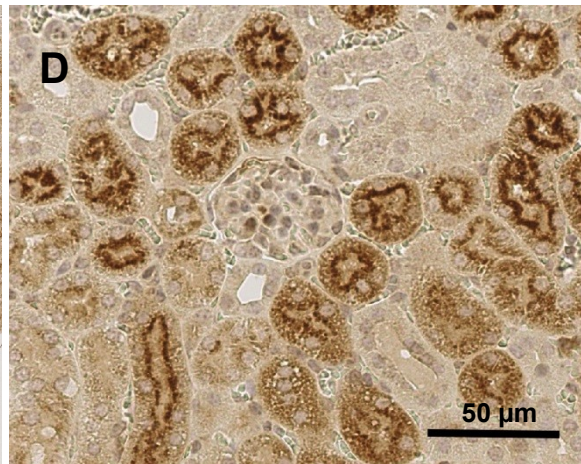
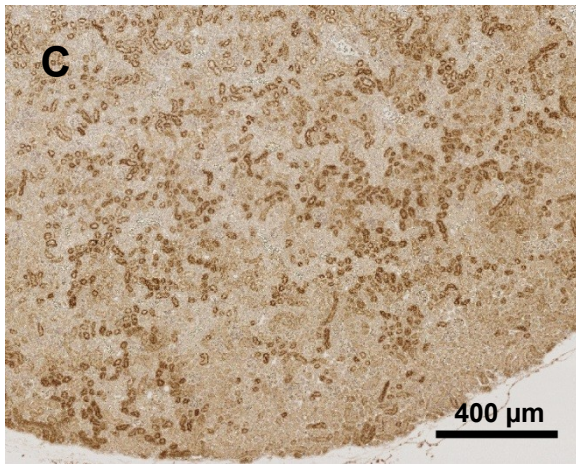
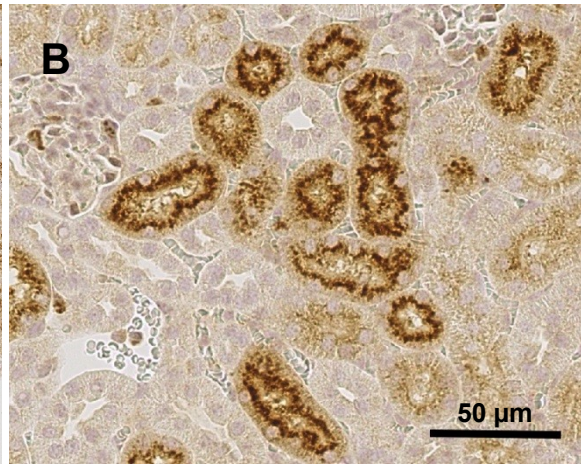
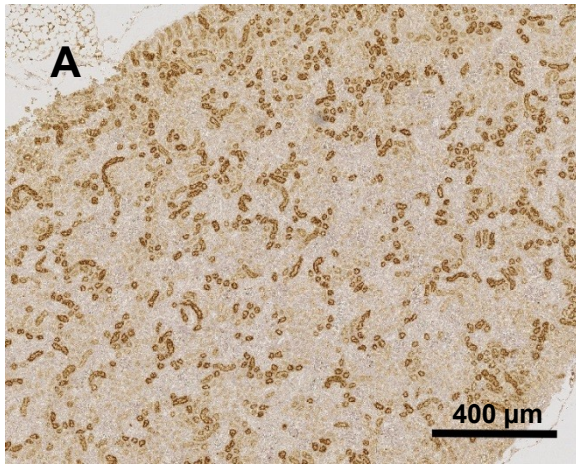


Abbildung 24: Darstellung der NGAL-Immunhistochemie der Niere.

A) und B) 6h PCI; C und D) 24h PCI; E) und F) 6h Sham; G) und H) 24h Sham.

A und C) Anschnitt der Nierenrinde in der Übersicht. Deutliche Anfärbung multipler Tubuli des Rindenlabyrinthes.

B und D) In der Vergrößerung zeigt sich eine kräftige Anfärbung mehrerer meist quer (vereinzelt auch längs) angeschnittener (proximaler) Tubuli. Weiterhin sind einzelne Nephrone mit einzelnen angefärbten Mesangiumzellen zu sehen. Bei den Tubuli mit deutlich sichtbarem Lumen handelt es sich um distale Tubuli. E) - H) jeweilige Sham-Gruppen in der Übersicht und in der Vergrößerung mit blasser Anfärbung einiger Tubuli, weiterhin einige Tubuli ohne Anfärbung, insgesamt keine kräftige Anfärbung spezifischer Strukturen wie bei den septischen Tieren.

4.2.2 Leber

In der Leber zeigt sich im PCI-Modell nach 6h ein Nachweis von NGAL in nahezu allen Hepatozyten, darüber hinaus in Kupffer-Zellen in den Sinusoiden und teilweise auch in der Portalvene selbst. 24h nach Instillation der humanen Faeces kann NGAL in den Hepatozyten nur in geringerem Umfang nachgewiesen werden, die ortsständigen Makrophagen sind jedoch weiterhin deutlich NGAL-positiv. Weiterhin zeigt sich 24h nach Instillation der humanen Faeces in einigen Proben eine deutliche Auflockerung der Zytoarchitektur mit Einlagerung von unterschiedlich großen Lipidtropfen.

Bei den Sham-Proben ergibt sich nach 6h und nach 24h ein geringgradiger Nachweis von NGAL in den Hepatozyten. Kupffer-Zellen sind im Vergleich zu den septischen Proben deutlich weniger angefärbt. Die Negativkontrollen zeigten keine relevante Anfärbung (nicht dargestellt). Für die Abbildung wurde versucht möglichst repräsentative Anschnitte zu wählen, dies war nur eingeschränkt zu gewährleisten, da sich innerhalb derselben Versuchsgruppe teilweise deutliche Schwankungen in der Färbeintensität zwischen den Proben zeigten (trotz Verwendung des in Material und Methoden beschriebenen standardisierten Färbeprotokolles).

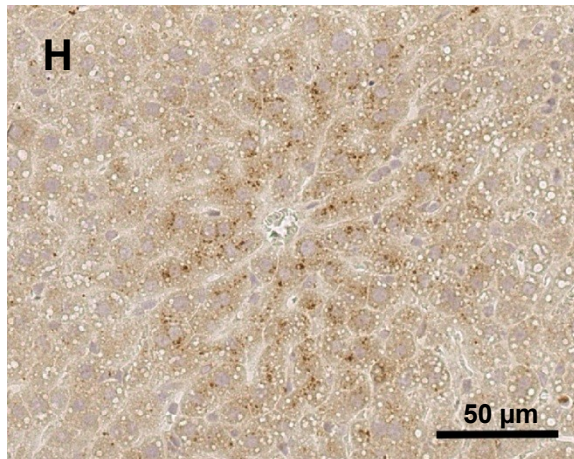
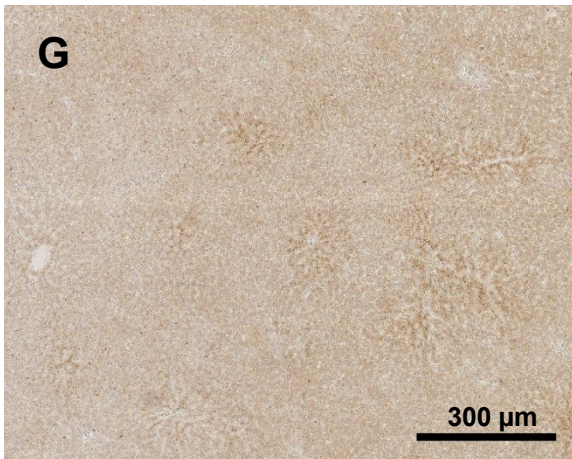
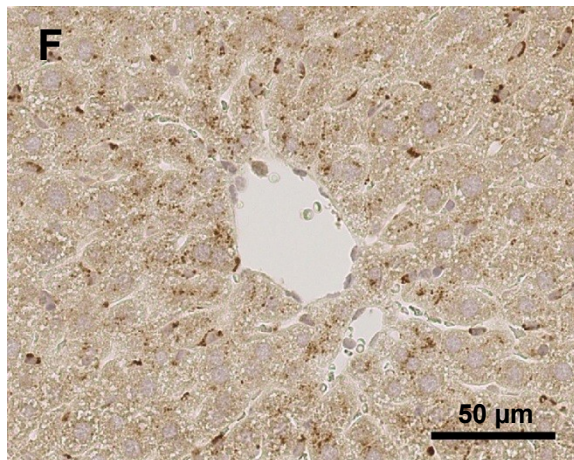
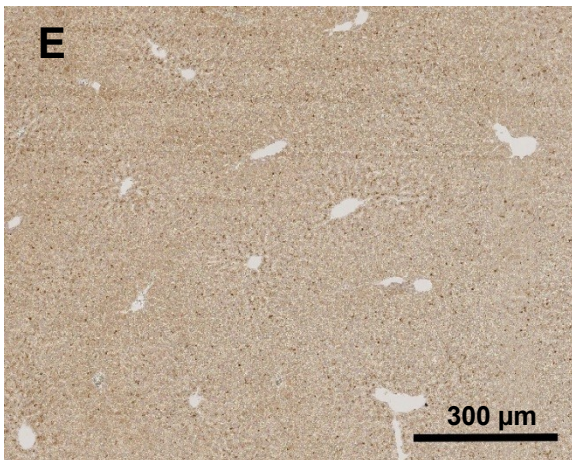
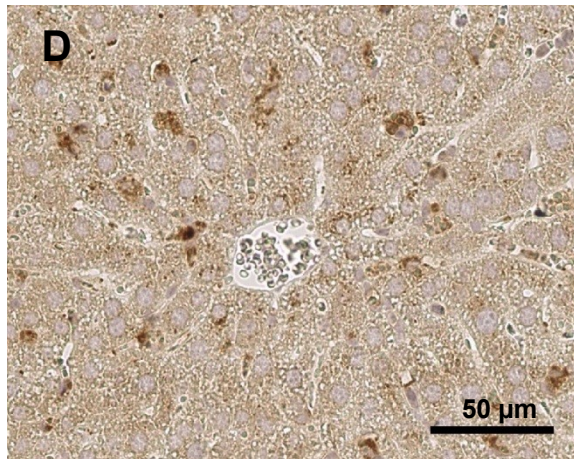
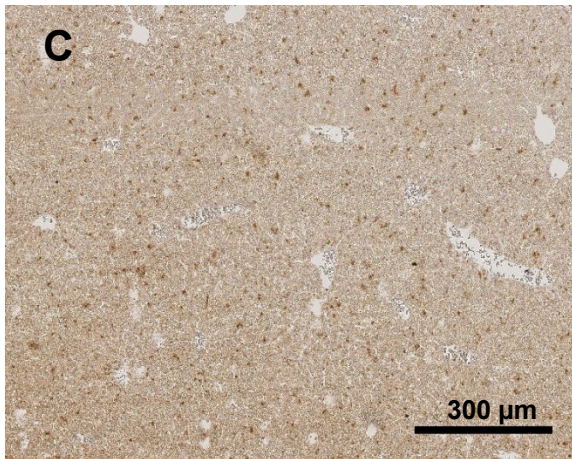
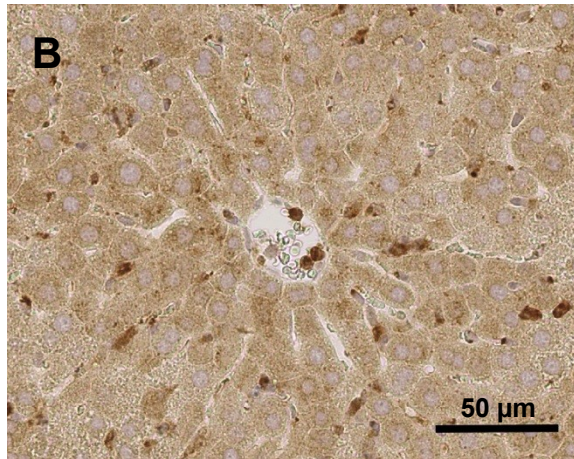
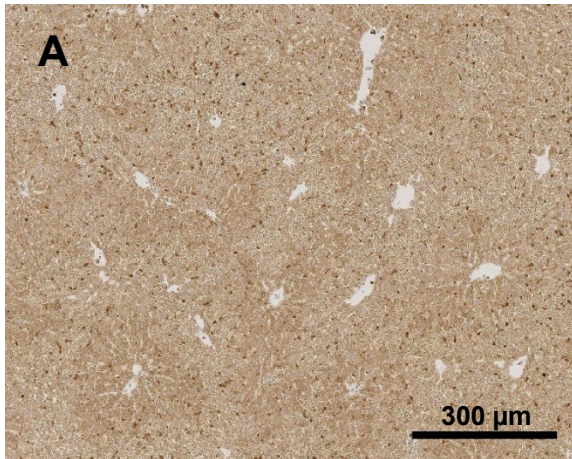


Abbildung 25: Darstellung der NGAL-Immunhistochemie der Leber.

A) und B) 6h PCI; C) und D) 24h PCI; E) und F) 6h Sham; G) und H) 24h Sham.

Es wurden möglichst repräsentative Schnitte gewählt, teilweise zeigten sich jedoch auch innerhalb der Gruppen deutliche Unterschiede in der Färbeintensität (am ehesten technisch bedingt).

In A) PCI 6h Übersicht: perizentral betont positive Farbreaktion im Zytoplasma der Hepatozyten, in B) ist mittig eine Zentralvene dargestellt, in den Sinusoiden zeigen einige Kupffer-Zellen eine intensivere Farbreaktion. An der Kerngegenfärbung erkennt man die Zellkerne der Hepatozyten, deren Zytoplasma ebenfalls NGAL-positiv ist C) 24h PCI mit insgesamt geringerer Anfärbung des Zytoplasmas der Hepatozyten, jedoch zeigt sich eine ähnlich deutliche Reaktion in den Kupffer-Zellen. D) Es zeigt sich eine gewisse Auflockerung der Zytoarchitektur und eine Einlagerung kleiner Fetttropfchen, daneben mehrere deutlich angefärbte Kupffer-Zellen. E-H) Die Anfärbung des Zytoplasmas unterscheidet sich hier kaum von 6h Sham zu 24h Sham und auch nur unwesentlich im Vergleich zu 24h PCI, in der Vergrößerung (F und H) zeigt sich jedoch eine deutlich geringere Anfärbung der Makrophagen im Vergleich zu PCI 6h und 24h. Nach 24h Sham-Behandlung zeigt sich weiterhin eine perivaskulär betonte punktförmige Anfärbung des Hepatozytenzytoplasmas.

4.2.3 Lunge

Bei der Auswertung der immunhistochemischen NGAL-Färbung der Lunge zeigte sich bei den septischen Tieren sowohl nach 6h als auch nach 24 h ein NGAL-Nachweis vor allem in Makrophagen, möglicherweise auch in einzelnen Typ II-Pneumozyten. Bei den Sham-behandelten Tieren ergaben sich zu beiden Zeitpunkten lediglich in vereinzelt Makrophagen eine Farbreaktion und damit ein NGAL-Nachweis. Die Negativkontrollen zeigten keine relevante Anfärbung (nicht abgebildet).

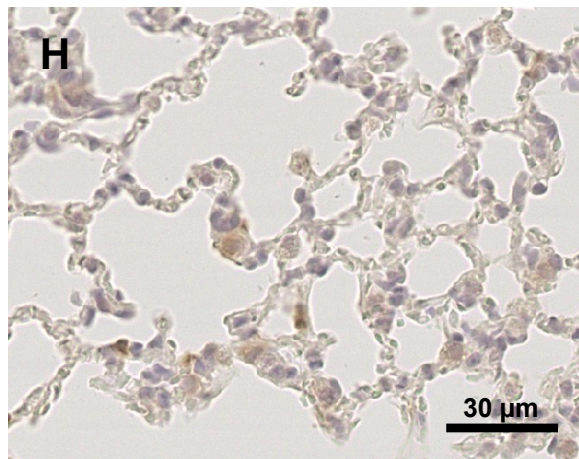
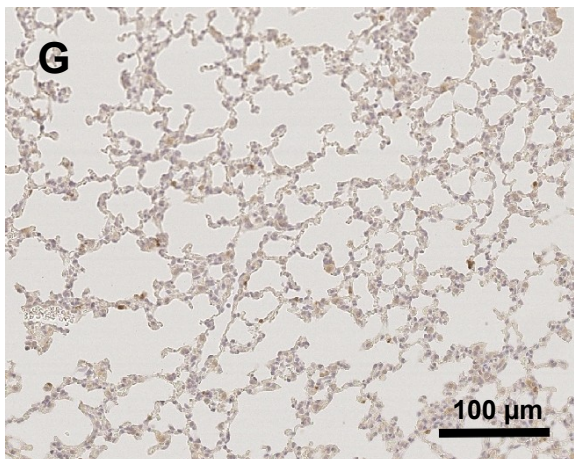
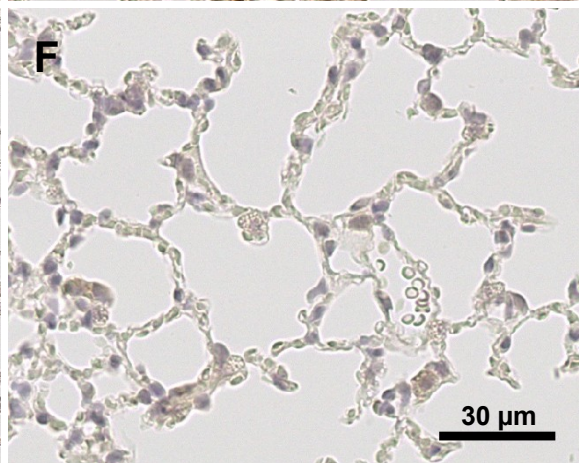
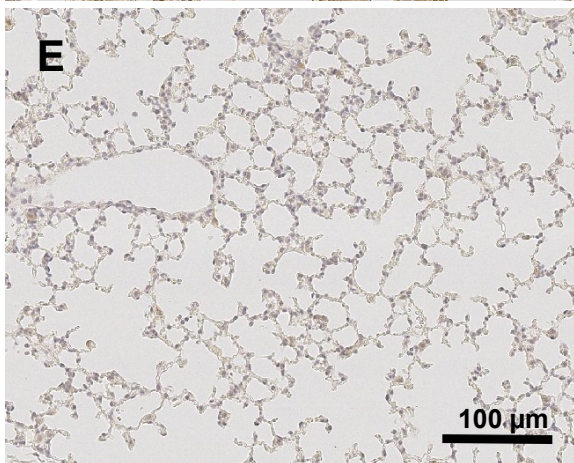
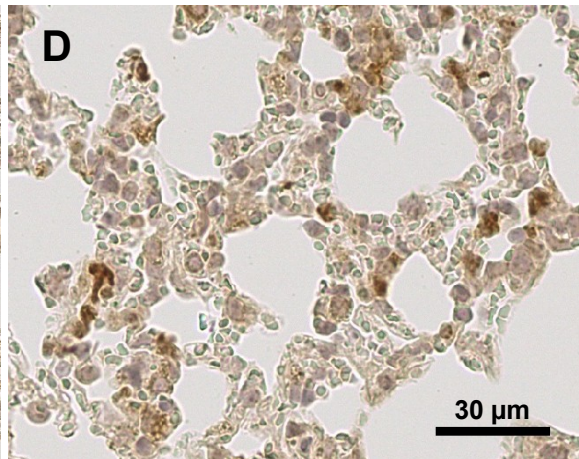
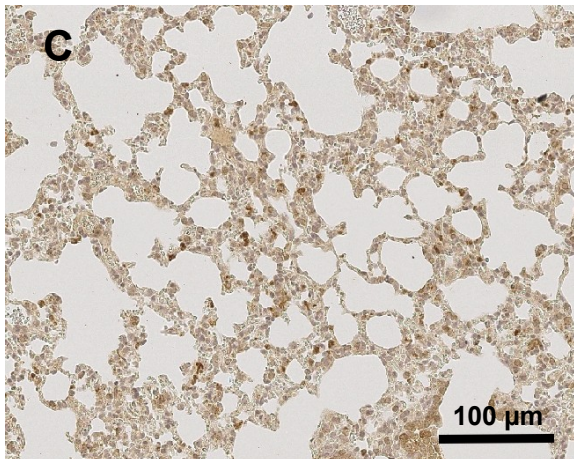
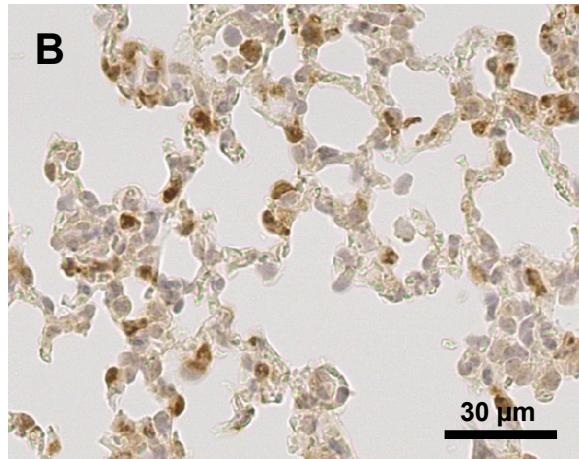
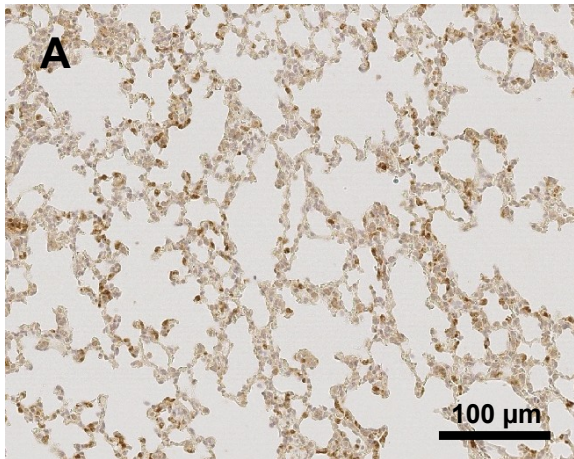


Abbildung 26: Darstellung der NGAL-Immunhistochemie der Lunge.

A) und B) 6h PCI; C) und D) 24h PCI; E) und F) 6h Sham; G) und H) 24h Sham.

In A) weitgehend intaktes Alveolarsystem, in B) erkennt man in der Vergrößerung die Alveolarwände, die Pneumozyten sowie interstitielle Makrophagen enthalten. Makrophagen sind NGAL-positiv, z.T. lassen sich auch NGAL-positive Pneumozyten abgrenzen. C) Die Alveolarstruktur erscheint teilweise kollabiert, in der Vergrößerung in D) ist eine Verdickung der Alveolarwände zu erkennen, hierbei eingelagerte NGAL-positive Zellen (am ehesten Makrophagen). E) und F) entsprechende 6h Sham-Probe mit sehr vereinzelt Nachweis NGAL-positiver Zellen. G) und H) entsprechende Sham-Gruppe nach 24h, wie in der 6h Sham-Gruppe erhaltene Alveolarstruktur und in der Vergrößerung nur vereinzelte dezent NGAL-positive Zellen.

5 Diskussion

5.1 Leitmotiv

Sepsis ist nach wie vor eine häufig auftretende Erkrankung mit inakzeptabel hoher Mortalitätsrate, deren komplexe Pathophysiologie trotz intensiver Forschungsbemühungen bis dato nur unvollständig verstanden ist. Daher besteht ein großes Interesse die Mechanismen der Sepsis weiter zu entschlüsseln und neue diagnostische sowie therapeutische Möglichkeiten zu entwickeln. In unserer Arbeitsgruppe wurden in einer Array-basierten Untersuchung Gene identifiziert, die im Rahmen einer Sepsis mit einer Hochregulation reagieren, um diese dann näher zu charakterisieren (Weber et al. 2012). Eines dieser in der Sepsis stark hochregulierten Gene ist Lipocalin 2 (*Ngal*), sodass dieses in dieser Arbeit genauer untersucht werden sollte. Trotz über 1000 Publikationen bei PubMed bei der Stichwortsuche „NGAL oder Lcn2 oder Lipocalin 2“ im Titel, lassen sich lediglich 15 Publikationen finden, wenn man o.g. Stichwortsuche und den Begriff „Sepsis“ kombiniert, davon beschäftigten sich wiederum nur sehr wenige Studien unmittelbar und systematisch mit NGAL im Rahmen der Sepsis, sodass dies ein weitgehend unerforschtes Feld ist. Großes Interesse entwickelte sich in den letzten Jahren über die Frage der Eignung des plasmatischen und Urin-NGAL als möglichen „frühen“ Biomarker der akuten Nierenschädigung: trotz intensiver Forschungsbemühungen erfolgt der Einsatz in der klinischen Routine aufgrund einiger noch offener Fragen bisher noch nicht. Während eine Messung des NGAL-Plasmaspiegels Informationen über das systemische Vorhandensein von NGAL unabhängig von dessen Syntheseort und Zielstruktur gibt, erlaubt die in dieser Arbeit angewendete organspezifische Messung der *Ngal*-mRNA einen Nachweis der Syntheseorte und dadurch eine differenziertere Betrachtungsweise des NGAL-Metabolismus. Um diesbezüglich neue Hypothesen über die Rolle von NGAL im Rahmen einer polymikrobiellen Sepsis generieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit die wichtigsten im Rahmen einer Sepsis beteiligten Organe hinsichtlich ihrer Genexpressionsveränderungen von *Ngal* und dessen Rezeptor *Slc22a17* im Tiermodell der Sepsis (murines PCI-Modell) auf mRNA-Ebene untersucht. Um Informationen über die Dynamik der Expressionsveränderungen zu erhalten, wurden zwei unterschiedliche Versuchszeitpunkte (6h und 24h *post infectionem*) gewählt. Die Quantifizierung der mRNA mittels qRT-PCR wurde gewählt, da dies eine präzise Messung der gesamten

Ngal-mRNA des jeweiligen Organes unabhängig von der genauen zellulären Herkunft erlaubt. Die ergänzende Immunhistochemie sollte einerseits das Vorhandensein des Proteins im Gewebe nachweisen, darüber hinaus durch den Nachweis einer möglicherweise zellspezifischen Lokalisation neue Hypothesen über die zellulären Syntheseorte innerhalb des untersuchten Organes ermöglichen.

5.2 Grundsätzliche Eignung des Tiermodells

5.2.1 Translationale Tiermodelle in der Sepsisforschung

Zur Erzeugung einer Sepsis im Tierexperiment stehen verschiedene Modelle zur Verfügung. Ein einfaches und häufig angewendetes Modell ist das LPS-Modell, bei dem durch Injektion von Lipopolysacchariden eine Endotoxämie erzeugt wird, dies induziert eine frühe überschießende proinflammatorische Reaktion bei allerdings fehlender Bakteriämie, was das klinische Bild einer polymikrobiellen humanen Sepsis jedoch weder in Dynamik noch Ausmaß der Wirtsreaktion adäquat widerspiegelt (Remick et al. 2000, Recknagel et al. 2013). Weiterhin existiert das weit verbreitete CLP-Modell (Hubbard et al. 2005), bei dem durch Ligatur und anschließende Punktion des Caecums eine Peritonitis hervorgerufen wird. Problematisch ist hierbei, dass verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel Veränderungen der bakteriellen Besiedlung im Darmtrakt oder das Trauma durch das operative Verfahren sowie die anhaltende Ischämie/Nekrose durch die Ligatur mit behandlungspflichtigen Abdominalschmerzen das Outcome wesentlich beeinflussen können und nicht vorhersagbar sind (Hubbard et al. 2005), zudem kommt es häufig zur Ausbildung eines Abszesses am Ort der Punktion(en), was die Entstehung einer diffusen Peritonitis, wie sie bei Sepsispatienten häufig vorkommt, verhindert (Maier et al. 2004). Beim modifizierten PCI-Modell (peritoneal contamination and infection, PCI) nach Bauhofer et al. (Gonnert et al. 2011) wird durch intraperitoneale Injektion einer festgelegten Menge einer charakterisierten humanen Faeces-Suspension eine Peritonitis induziert (bei annähernd gleichem Gewicht erhalten alle Tiere eine Infektionsdosis von $5,5 \cdot 10^6$ KBE), dies bietet gegenüber dem „Goldstandard“ des CLP-Modells vor allem den Vorteil, dass die Infektionsdosis und die Art der Erreger standardisiert werden kann, durch die Mischung aerober und anaerober Bakterien ein breites Erregerspektrum vorliegt (wie es bei einer humanen Peritonitis ebenfalls der Fall ist) (Stamme et al. 1999, Parker und Watkins 2001) und das Modell insgesamt eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit aufweist. Aufgrund dieser

Vorteile wurde in dieser Arbeit das PCI-Modell gewählt. Dieses unterscheidet sich auch im Hinblick auf die messbaren Zytokinspiegel deutlich vom CLP-Modell, so deuten mehrere Studien darauf hin, dass sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine im CLP-Modell bereits nach 24h auf das Ursprungsniveau absinken (Cauvi et al. 2012, Bhargava et al. 2013, Vazquez et al. 2015), wohingegen im PCI-Modell nach 24h ein weiterer Anstieg zu verzeichnen ist (Otto et al. 2013) In Bezug auf eine sepsisinduzierte Leberdysfunktion wurde gezeigt, dass sich die hierbei abspielenden Mechanismen im Vergleich eines Endotoxämie- bzw. LPS-Modells einerseits und dem PCI-Modell andererseits deutlich unterscheiden, so kommt es im PCI-Modell zu einer Störung der exkretorischen Leberfunktion, die auch im Kollektiv der Sepsispatienten gezeigt wurde. Im Gegensatz hierzu kommt es im LPS-Modell zu höheren Zytokinspiegeln und Markern des oxidativen Stresses, jedoch zu keiner signifikanten Störung der exkretorischen Leberfunktion (Recknagel et al. 2013). Auf dieser Grundlage kann postuliert werden, dass das PCI-Modell am ehesten die Auswirkungen einer Sepsis simuliert. Allerdings bestehen auch im PCI-Modell einige Limitationen: Zum einen wird die klinische Heterogenität der an Sepsis erkrankten Patienten insbesondere in Bezug auf Alter und Vorerkrankungen nicht abgebildet, was die Übertragbarkeit der Erkenntnisse in den klinischen Alltag deutlich einschränkt. Desweiteren wird im Tierexperiment meist der Spontanverlauf der Sepsis beobachtet, der im klinischen Setting jedoch bereits unmittelbar nach Diagnosestellung durch i.v.-Flüssigkeitssubstitution, Antibiotika, Nierenersatzverfahren und weitere Therapieeingriffe beeinflusst wird. In einem Vergleich der Genexpression von Blutproben des murinen PCI-Modells mit denjenigen von pädiatrischen Sepsispatienten konnten jedoch einige Gemeinsamkeiten im Transkriptom festgestellt werden (Lambeck et al. 2012), was zumindest in diesem Patientenkollektiv ein Hinweis für eine hinreichende Übertragbarkeit der Resultate geben könnte. Beim Vergleich des PCI-Modells mit Candida-Infektionen (i.v. und i.p.) konnte wie in Abschnitt 1.2.2 ausführlicher beschrieben, gezeigt werden, dass es im PCI-Modell zu einer erregerspezifischen molekularen Signatur auf transkriptioneller und metabolischer Ebene kommt.

5.3 Einordnung der Ergebnisse in das klinische Umfeld

5.3.1 Vorbemerkung

Insgesamt zeigt sich in den Ergebnissen dieser Arbeit eine starke Hochregulation der *Ngal*-mRNA (*Lcn2*) in allen untersuchten septischen Organen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe und noch ausgeprägter im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Es zeigt sich, dass bereits die Sham-Behandlung teilweise einen deutlichen Effekt auf die *Ngal*-Expression (1,1 – 5,3 fache Erhöhung zu naiv) hat.

In den Organen Leber, Niere und im Herzen war die Expressionssteigerung im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe besonders ausgeprägt. Bezüglich des *Ngal*-Rezeptors (*Slc22a17*) zeigte sich in allen Organen eine moderate Herabregulation im Vergleich zur Sham-Behandlung. In der Leber nach 6h und 24h und im Herzen nach 24h waren die Unterschiede hierbei statistisch nicht signifikant, in Niere und Lunge waren die Unterschiede deutlicher und dementsprechend auch statistisch signifikant (auf 5% Niveau). Da sich die Expression des *Ngal*-Rezeptors scheinbar gegensätzlich zur *Ngal*-Expression verhielt, stellte sich die Frage ob eine negative Korrelation zwischen *Ngal* und *Ngal*-Rezeptor-Expression besteht, dies wurde anhand einer Rangkorrelationsanalyse nach Spearman ermittelt. Hierbei zeigte sich in allen untersuchten Organen eine negative Korrelation, in der Leber und im Herz mit mittlerem Effekt ($r = -0,46$ bzw. $-0,34$, $p < 0,05$), in der Niere und Lunge mit starkem Effekt ($r = -0,82$ bzw. $-0,88$, $p < 0,01$).

Im Folgenden sollen diese Veränderungen auf Ebene der einzelnen Organe diskutiert werden und im Kontext einer polymikrobiellen Sepsis betrachtet werden.

5.3.2 Leber

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen eine massive Hochregulation der *Ngal*-mRNA in der Leber im PCI-Modell, dieser Effekt ist bereits nach 6h in voller Ausprägung messbar und hält bei den meisten Tieren nach 24h an. Insgesamt zeigt sich eine robuste, gleichförmige Reaktion mit vergleichsweise geringer Streubreite.

Interessanterweise zeigten auch einige (>25%) der Tiere in der scheinoperierten Kontrollgruppe (i.p. Kochsalzinjektion) nach 24h eine deutliche Erhöhung der *Ngal*-Werte (bis 1000-fach). Da NGAL als Akute-Phase-Protein in der Leber auch bei steriler Entzündung beschrieben wurde (Liu und Nilsen-Hamilton 1995, Sultan et al. 2012), könnte die Scheinoperation bei manchen Tieren einen entzündlichen Stimulus dargestellt haben, der eine Akute-Phase-Reaktion mit hochsensitiver *Ngal*-

Hochregulation bewirkte. Eine Expressionssteigerung von *Ngal* im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion bzw. Infektion wurde auch in anderen Arbeiten in der Literatur beschrieben, die Vergleichbarkeit ist jedoch eingeschränkt, da es sich bei diesen Arbeiten entweder um ein LPS-Modell (Sunil et al. 2007) oder um eine monobakterielle intraperitoneale Injektion handelte (Xu et al. 2015, Li et al. 2018). Dass sich die Mechanismen der septischen Leberdysfunktion maßgeblich unterscheiden je nachdem ob ein LPS-Modell oder ein PCI-Modell angewendet wird, wurde bereits in Abschnitt 5.2.1 beschrieben (Recknagel et al. 2013).

Näherungsweise vergleichbar sind die Ergebnisse mit der Studie von Vazquez et al., die im CLP-Modell am selben Mausstamm die mRNA-Expression mittels qRT-PCR in Leber und Lunge bestimmten und hier ebenfalls deutlich erhöhte Werte feststellten (Vazquez et al. 2015), allerdings wurde hier lediglich ein Referenz-Gen (*Gapdh*) zur Normalisierung verwendet (Perez et al. 2007), was eine gewisse Ungenauigkeit der Ergebnisse bedingen könnte. In einer weiteren Arbeit konnte eine deutliche Korrelation der *Ngal*-Expression mit dem Grad der Leberschädigung und der daraus resultierenden inflammatorischen Antwort gezeigt werden (Borkham-Kamphorst et al. 2011), sodass NGAL als Marker der Leberschädigung diskutiert wurde. Betrachtet man die starke Erhöhung von *Ngal* in den Daten der vorliegenden Arbeit, könnte man mutmaßen, dies sei der Ausdruck einer ausgeprägten Leberschädigung. Da allerdings auch Sham-operierte Tiere teilweise stark erhöhte Werte zeigten, scheint dies eher mit dem proinflammatorischen Stimulus assoziiert zu sein und nicht unbedingt mit der Schädigung der Leberzellen an sich, zudem ließ sich NGAL immunhistochemisch vor allem in den ortsständigen spezialisierten Makrophagen der Leber (Kupffer-Zellen) nachweisen, in geringerem Umfang auch in den Hepatozyten. Dass IL-1 β , TNF- α und IL-6 als zentrale proinflammatorische Zytokine die Expression von *Ngal* induzieren ist in der Literatur in mehreren methodisch unterschiedlichen Studien beschrieben (Borkham-Kamphorst et al. 2011, Xu et al. 2015, Sultan et al. 2012).

Immunhistochemisch zeigt sich weiterhin im PCI-Modell nach 6h eine etwas kräftigerer Nachweis von NGAL im Zytoplasma der Hepatozyten als nach 24h (bei vergleichbarer mRNA-Menge), dies könnte an einer Störung der Proteinbiosynthese liegen, da histologisch ein feinblasig aufgelockertes Zytoplasma als Zeichen für eine beginnende Zellschädigung erkennbar war. Eher gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass der NGAL-Plasmaspiegel im PCI-Modell nach 24h noch höher ist als

nach 6h (Otto et al. 2013) und die Leber im Mausmodell maßgeblich für den NGAL-Plasmaspiegel bei Infektionen verantwortlich ist (Xu et al. 2015, Li et al. 2018). In Bezug auf die NGAL-positiven Makrophagen bleibt die Frage offen, ob es sich um in den Makrophagen synthetisiertes NGAL handelt oder dieses aus dem Plasma stammt und (evtl. nach Bindung bakterieller Siderophore und Eisen) von Makrophagen aufgenommen wurde. Prinzipiell existieren in der Literatur mehrere Nachweise, dass sowohl Hepatozyten als auch Makrophagen zur Synthese von NGAL befähigt sind (Sunil et al. 2007, Borkham-Kamphorst et al. 2011, Xu et al. 2015, Sultan et al. 2012), dies unterstützt die immunhistochemischen Befunde. Insgesamt spiegelt sich die starke Hochregulation der *Ngal*-mRNA jedoch in eher moderatem Umfang auf Proteinebene in den immunhistochemischen Untersuchungen wider (insbesondere in der 24h PCI-Gruppe), mögliche Erklärungen sind technischer Art (unzureichende Epitopfreilegung im Rahmen des Färbeprozesses, Proteindegradierung, Schnittdicke), möglich erscheint jedoch auch, dass es zu einer sofortigen Sezernierung des NGAL-Proteins in das Plasma kommt. Die immunhistochemischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich weitgehend mit den Ergebnissen der Arbeit von Li et. al, die bei intraperitonealer Infektion mit *K. pneumoniae* eine ausgeprägte *Ngal*-Hochregulation feststellten, bei jedoch immunhistochemisch nur geringem Nachweis von NGAL-Protein in den Hepatozyten, sodass die Autoren eine schnelle Sekretion des NGAL in das Plasma als Ursache vermuteten, darüber hinaus konnte mittels MPO-/LCN2-Doppelfärbung gezeigt werden, dass sich mehr als 80% des NGAL im Lebergewebe in myeloiden Zellen befindet (Li et al. 2018). Dass durch posttranskriptionelle Regulation nur ein geringer Teil der mRNA zum Protein translatiert wird, erscheint in Anbetracht der vorhandenen Literatur unwahrscheinlich, so resultierte sowohl im CLP- als auch im LPS-Modell die *Ngal*-mRNA-Expressionssteigerung in einer entsprechenden Steigerung der NGAL-Proteinsynthese (Vazquez et al. 2015, Sunil et al. 2007). Es stellt sich die Frage, welche Rolle die starke Erhöhung von NGAL (mRNA und Protein) in der Leber in Bezug auf eine systemische Wirkung im Organismus hat. Da die Leber einen Großteil ihres Blutflusses aus dem splanchniko-mesenterialen Gefäßbett bezieht, kommt ihr bei der Elimination von aus dem Darm translozierten Bakterien im Rahmen einer Sepsis eine Schlüsselrolle zu. Vor dem Hintergrund seiner bakteriostatischen Funktionen spielt NGAL hier also vermutlich eine bedeutende Rolle bei der Eindämmung der Infektion. Gezeigt werden konnte dies

unter anderem in der Arbeit von Xu et al., die eine erhöhte Sterblichkeit von hepatozytenspezifischen NGAL-depletierten Mäusen bei systemischer Infektion zeigte (die Sterblichkeit unterschied sich dabei nicht von global NGAL-depletierten Mäusen), zudem trugen die Hepatozyten zu >90% des Serum-NGAL nach einer monobakteriellen Infektion mit *E. coli* oder *K. pneumoniae* bei, dabei zeigten sich stark erhöhte Serumspiegel bis 6000ng/ml was einer 100-fachen Erhöhung des Basallevels entsprach (Xu et al. 2015), siehe Abbildung 27. Ähnliche Ergebnisse erzielte auch die bereits erwähnte Arbeit von Li et al. durch eine intraperitoneale Injektion mit *K. pneumoniae* (Li et al. 2018).

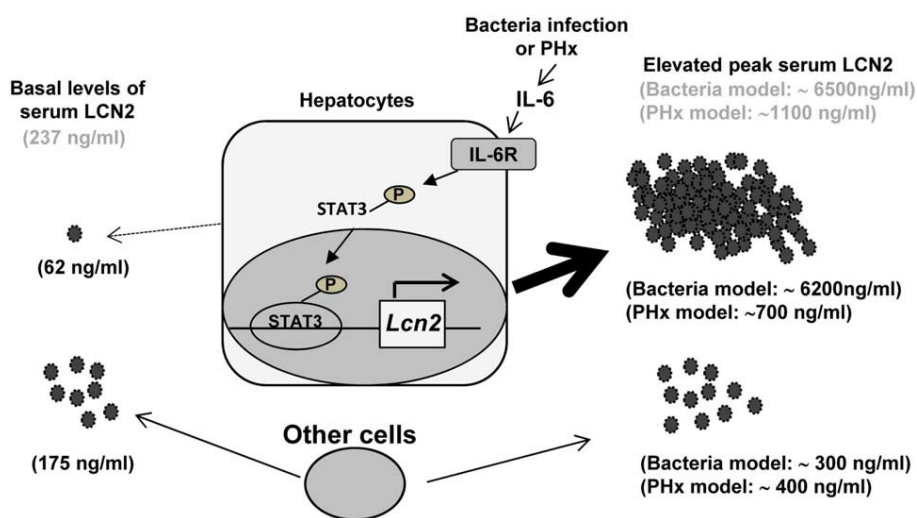


Abbildung 27: Modellhafte Darstellung der *Ngal*-Induktion in Hepatozyten und deren Beitrag zum NGAL-Serumspiegel (Mausmodell: C57BL/6J).

Im physiologischen Zustand tragen die Hepatozyten nur einen geringen Teil zum NGAL-Serumspiegel bei, dies ändert sich bei Vorhandensein einer bakteriellen Infektion: hierbei wird über proinflammatorische Zytokine (v.a. IL-6) eine Erhöhung der *Ngal*-Expression in den Hepatozyten induziert, dies führt dann zu einer starken Erhöhung des NGAL-Serumspiegels. (Xu et al. 2015)

Da es sich in der Arbeit von Xu et. al um eine monobakterielle Infektion handelte, muss die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das Modell der polymikrobiellen Sepsis noch verifiziert werden. Es ist zudem anzunehmen, dass die Funktion von NGAL weitaus komplexer ist und nicht auf die bakteriostatischen Funktionen reduziert werden kann. Es gibt Hinweise, dass NGAL eine wichtige Rolle in der Regulation der Lipid-Homöostase der Leber über eine Regulation von Perilipin 5 (PLIN5) spielt und so vor lipotoxischen Effekten schützt (Asimakopoulou et al. 2014). Weiterhin konnte in verschiedenen Modellen der akuten Leberschädigung im NGAL-Knock-Out-Modell gezeigt werden, dass bei NGAL-depletierten Mäusen deutlich höhere Zytokinspiegel von proinflammatorischen Zytokinen vorherrschen, welche dann über eine überschießende Immunantwort zu Zellschäden führen, sodass NGAL einen

protektiven Effekt durch die Regulation der Immunantwort hat, der unabhängig von seiner bakteriostatischen Funktion ist (Borkham-Kamphorst et al. 2013). Auch schützt NGAL die Hepatozyten unter inflammatorischen Bedingungen bzw. anderen Arten von Zellstress vor einer exzessiven Antwort auf ungefaltete Proteine (*unfolded protein response*, UPR) was eine vermehrte Apoptose von Hepatozyten verhindert (Borkham-Kamphorst et al. 2019). Darüber hinaus konnte in einer Arbeit von Labbus et. al im Vergleich von NGAL-depletierten Mäusen mit Wildtyp-Mäusen eine Reihe von differentiell exprimierten Genen sowohl im unbehandelten Zustand als auch nach LPS-Injektion identifiziert werden, dies zeigt das NGAL grundlegende Funktionen in der Leberhomöostase hat (Labbus et al. 2013), zudem fördert NGAL die Rekrutierung von Neutrophilen über die Produktion von Chemokinen, eine ähnliche Reaktion wurde bereits in der Lunge beschrieben, sodass die Autoren schlussfolgern, dass es sich hierbei vermutlich um eine organübergreifende Funktion handelt (Asimakopoulou et al. 2016).

5.3.3 Niere

Die Daten dieser Untersuchung zeigen auch in der Niere eine starke Erhöhung der *Ngal*-mRNA im PCI-Modell nach 6h und 24h, wobei nach 24h eine deutliche Streuung der Daten zu erkennen ist, d.h. bei über 25% eine deutlich niedrigere Expression als nach 6h zu verzeichnen war, während bei über 50% die Expression der *Ngal*-mRNA noch höher als nach 6h lag. Die Sham-behandelten Tiere wiesen nach 6h keine relevante Erhöhung der *Ngal*-mRNA auf, nach 24h zeigte sich eine geringgradige Hochregulation. Eine mögliche Erklärung für die starke Streuung der Daten im PCI-Modell nach 24h ist ein unterschiedliches Ausmaß der Nierenschädigung. Da es sich bei den Versuchstieren um gleich alte Tiere ohne bekannte Vorerkrankungen handelte und eine standardisierte Infektionsdosis appliziert wurde, wäre dieser Effekt am ehesten durch eine interindividuell unterschiedliche Vulnerabilität aufgrund genetischer Faktoren erklärbar (Hotchkiss und Karl 2003). In anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe am identischen PCI-Modell konnte belegt werden, dass das verwendete Infektionsmodell prinzipiell eine Nierenschädigung auslöst (Otto et al. 2013, Sossdorf et al. 2013), histopathologisch zeigten sich hierbei eine epitheliale Vakuolisierung, Abflachung des Tubulusepithels sowie atypisch geformte Zellkerne (Sossdorf et al. 2013). Genaue Daten zur Nierenfunktion liegen nicht vor, eine genaue Bestimmung der Nierenfunktion wäre letztlich nur durch die exakte Bestimmung der GFR (durch Messung der Inulin-

Clearence) möglich (Bhargava et al. 2013).

In der Literatur wird eine Hochregulation der *Ngal*-mRNA im Rahmen einer Nierenschädigung unterschiedlicher Genese berichtet (siehe Abschnitt 1.3.7), hierbei wurde im Allgemeinen das tubuläre Epithel als Syntheseort identifiziert, die genauen zellulären Syntheseorte werden jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert. Einerseits konnten Mishra et al. zeigen, dass proximale Tubulusepithelien *in vitro* bei ATP-Depletion (als Modell der Ischämie) mit einer Hochregulation der *Ngal*-mRNA und NGAL-Proteinsekretion in das Medium reagieren und auch *in vivo* im Mausmodell der Ischämie und Reperfusion NGAL-Protein in den proximalen Tubulusepithelien nachweisbar ist (Mishra et al. 2003). Zudem zeigte eine weitere Arbeit das Auftreten von NGAL-Protein im proximalen Tubulus anhand menschlicher histologischer Proben bei akuter Nierenschädigung unterschiedlicher Genese, hierunter auch bei septischer Nierenschädigung (Mori et al. 2005), weiterhin konnte *Ngal*-mRNA im proximalen Tubulus nach Injektion von LPS im Mausmodell nachgewiesen werden (Han et al. 2012). Andererseits wurden in anderen Arbeiten der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife und alpha-interkalierende Zellen der Sammelrohe als Syntheseorte in der Niere im Rahmen einer Nierenschädigung durch Ischämie und Reperfusion bzw. intraperitonealer Injektion von Lipid A (als Bestandteil von bakteriellem Endotoxin) identifiziert (Paragas et al. 2011, Paragas et al. 2012). Teilweise in Einklang bringen lassen sich diese unterschiedlichen - scheinbar widersprüchlichen - Ergebnisse mit der Hypothese, dass in Abhängigkeit von der Noxe und deren Dosis unterschiedliche Abschnitte der Nierenepithelien geschädigt werden und dies eine entsprechende, lokal beschränkte *Ngal*-Expression im geschädigten Teil nach sich zieht. Im Allgemeinen finden sich im Rahmen einer akuten Niereninsuffizienz häufig pathologische Veränderungen im Bereich des proximalen Tubulus und hier insbesondere im S3-Segment, der distale Tubulus ist weniger empfindlich in Bezug auf ischämische und toxische Einflüsse (Siegenthaler 2006), ob dies allerdings auch für das septische Nierenversagen gilt, ist unklar, da sich die Pathophysiologie des septischen Nierenversagen grundsätzlich unterscheidet und gezeigt werden konnte, dass die septische Nierenschädigung oftmals mit nur geringen histopathologischen Veränderungen einhergeht. Immunhistochemisch gelang in dieser Arbeit ein deutlicher Nachweis von NGAL-Protein im PCI-Modell sowohl nach 6h als auch nach 24h überwiegend in proximalen Tubuli, die sich bei den Sham-behandelten Tieren nur in geringem Umfang zeigt. In

den angefärbten Tubuli ergeben sich Hinweise für einen Tubulusschaden, dessen genaue Quantifizierung anhand der vorliegenden Färbungen jedoch nicht möglich ist, Hinweise für Apoptose oder Nekrose ergeben sich nicht. Da das proximale Tubulussystem u.a. für die Rückresorption glomerulär filtrierter Proteine verantwortlich ist, erlaubt der Nachweis von NGAL-Protein im proximalen Tubulus zunächst keine genauen Rückschlüsse über dessen Herkunftsort. Zum Einen kann es sich um glomerulär filtriertes und im proximalen Tubulus reabsorbiertes NGAL aus dem Plasma handeln (Mori et al. 2005, Kuwabara et al. 2009, Mishra et al. 2004), z.B. hepatischen Ursprunges oder durch Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Zum Anderen kann es sich wie oben beschrieben um lokal synthetisiertes NGAL handeln (Mishra et al. 2003, Mori et al. 2005, Han et al. 2012). Die deutliche Hochregulation von *Ngal* in der Niere deutet jedoch darauf hin, dass ein relevanter Anteil des nachgewiesenen NGAL-Proteins im proximalen Tubulus durch lokale Synthese zustande gekommen ist, insbesondere da sich in den anderen Teilen der Niere ein allenfalls sehr geringer immunhistochemischer Nachweis von NGAL-Protein ergibt. Bezüglich der Frage welche Effekte bzw. biologische Funktionen die Expressionssteigerung von *Ngal* in der Niere hat, ergeben sich verschiedene Erklärungsansätze: Da NGAL in bestimmten Zellen an der Regulation der Apoptose beteiligt ist, erscheint es plausibel, dass NGAL über die Einleitung der Apoptose in Zellen des Immunsystems (z.B. Neutrophilen) die Entzündungsreaktion (Devireddy et al. 2001, Ryon et al. 2002) und so auch den resultierenden Nierenschaden begrenzt. In Bezug auf das akute ischämische Nierenversagen konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen der Schädigung proximaler Tubuluszellen zu komplexen Vorgängen wie beispielsweise Verlust der Zellpolarität, Zelltod durch Apoptose oder Nekrose, Entdifferenzierung überlebender Zellen und deren Re-Epithelialisierung kommt (Mishra et al. 2004, Mishra et al. 2003). Weiterhin konnte die frühe Gabe von rekombinantem NGAL im Modell der Ischämie und Reperfusion die Schädigung der Tubuluszellen sowie einen Anstieg des Plasma-Kreatinins deutlich reduzieren, hierbei war die Anzahl apoptotischer Zellen (gemessen mittels TUNEL-Assay) deutlich reduziert, hingegen war die Zahl PCNA-positiver Tubulusepithelien (als Marker der Zellteilung) deutlich erhöht (Mishra et al. 2004, Mori et al. 2005), sodass NGAL die Apoptose der Tubulusepithelien hemmt und die Regeneration/Re-Epithelialisierung induziert. Eine andere Gruppe zeigte hierbei *in vitro*, dass NGAL die Expression des anti-apoptotischen Faktors BCL-2 induziert und die Expression

pro-apoptotischer Faktoren (Bax, Fas und FasL) reduziert. Hierbei spielt auch die Expression des spezifischen *Ngal*-Rezeptors eine Rolle, da sich bei Überexpression des Rezeptors die genannten Effekte auf die Apoptosefaktoren verstärken (Zang et al. 2014). Mori et. al zeigten, dass die beschriebenen regenerativen NGAL-Effekte vom Vorhandensein eines NGAL-Siderophore-Eisen-Komplexes abhängig sind, der Eisen nach intrazellulär transportiert und die NGAL-Effekte zudem letztlich von der Aktivität der Hämoxxygenase-1 (HO-1) abhängen, die wiederum unter anderem durch NGAL induziert wird (Mori et al. 2005). Da es im Rahmen der Nierenschädigung und anschließender Regeneration zu einer Loslösung zugrunde gegangener Tubulusepithelien kommt, könnte NGAL auch dazu dienen, frei werdendes Eisen zu binden und so zytotoxische Effekte des freien Eisens (über die Bildung von ROS) zu verhindern. Anhand eines Modells spezifisch in den proximalen Nierentubuli Ferritin-H-depletierter Mäuse mit konsekutiver Erhöhung von NGAL und anderer eisenbindender Proteine im Urin (Zarjou et al. 2013) wurde dargestellt, dass ein komplexes Zusammenspiel multipler Regulationsfaktoren des Eisenstoffwechsels in der Niere besteht, das bis dato noch weitgehend unverstanden ist.

Zusammenfassend basieren diese Erklärungsansätze für die *Ngal*-Hochregulation in der Niere maßgeblich auf Studien, die auf dem Modell der Ischämie und nachfolgenden Reperfusion als Modell der akuten Nierenschädigung aufgebaut wurden, hierbei kommt es zu einer akuten Tubulusnekrose (ATN). Wie bereits erwähnt unterscheidet sich die Pathophysiologie des septischen Nierenversagens von derjenigen der akuten ischämischen Niereninsuffizienz, dabei finden sich beim septischen Niereninsuffizienz häufig keine Nachweise einer Apoptose oder Nekrose, sodass die beschriebenen Mechanismen anhand weiterer Studien auch für das septische Nierenversagen verifiziert werden müssen. Hier könnte man die Arbeitshypothese aufstellen, dass gerade wegen der ausgeprägten *Ngal*-Hochregulation beim septischen Nierenversagen die Entstehung von Apoptose und Nekrose vermindert oder verhindert wird. Dies gilt es in weiteren Studien zu prüfen.

5.3.4 Lunge

Auch in der Lunge wurde eine Hochregulation der *Ngal*-mRNA im PCI-Modell verzeichnet, diese war im Vergleich zu den anderen untersuchten Organen zwar erheblich geringer, absolut gesehen zeigt sich dennoch sowohl nach 6h als auch nach 24h eine deutliche Hochregulation. Wie in der Niere und im Herzen zeigt sich auch in der Lunge eine stärkere Streuung der Werte nach 24h, was auch hier am

ehosten mit einer unterschiedlichen Suszeptibilität auf den septischen Stimulus erklärt werden könnte. Knapp 50% der Tiere regulieren die *Ngal*-Expression nach 24h wieder geringfügig herab, während ein Teil der Tiere mit einer weiteren Erhöhung reagiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit am PCI-Modell bestätigen die Ergebnisse von Vazquez et al., die im CLP-Modell der Maus eine Expressionserhöhung der *Ngal*-mRNA in der Lunge und Leber nachweisen konnten (Vazquez et al. 2015). Immunhistochemisch konnte NGAL-Protein in der vorliegenden Arbeit vor allem in alveolären Makrophagen und im respiratorischen Flimmerepithel (zytoplasmatisch) nachgewiesen werden, vereinzelt scheinen auch Pneumozyten positiv, diese ließen sich jedoch nicht immer sicher abgrenzen. Insgesamt zeigt sich immunhistochemisch nach 6h und 24h PCI-Behandlung eine intensivere Anfärbung der Alveolarmakrophagen und Pneumozyten, der Unterschied zur Sham-Behandlung war in Anbetracht der ca. 16-fachen Hochregulation der mRNA jedoch eher gering, was sich jedoch methodenbedingt schlecht quantifizieren lässt. In der Literatur wurde NGAL-Protein in Alveolarmakrophagen und Typ-II-Pneumozyten in der Ratte im LPS-Modell sowohl mittels Western-Blot als auch immunhistochemisch nachgewiesen (Sunil et al. 2007), weiterhin in entzündetem humanem Bronchialepithel und Typ-II-Pneumozyten (Cowland et al. 2003) sowie in Alveolarmakrophagen und Typ-II-Zellen von mit *Mycobacterium bovis* (BCG) infizierten Mäusen (Saiga et al. 2008), sodass die vorliegende Arbeit ähnliche Ergebnisse auch für die septische Lungenschädigung nachweist. Auf funktioneller Ebene konnte am Mausmodell auch in der Lunge gezeigt werden, dass NGAL durch seine bakteriostatischen und immunmodulatorischen Funktionen eine nicht redundante Bedeutung für die Eindämmung einer Infektion besitzt. Nachgewiesen wurde dies am Mausmodell u.a. für Infektionen mit *K. pneumoniae*, *E. coli*, *M. tuberculosis* (Chan et al. 2009, Bachman et al. 2012, Wu et al. 2010). Darüber hinaus sind jedoch auch weitere immunmodulierende Effekte beschrieben, wie z.B. die Verstärkung der IL-8-Expression in Zellkulturen respiratorischer Zellen bei Bindung des Siderophores *Ent* (Bachman et al. 2009), andererseits jedoch auch antiinflammatorische Effekte bei pulmonaler Infektion mit dem gram-positiven Keim *S. pneumoniae* (Warszawska et al. 2013). Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Induzierbarkeit von NGAL in der Lunge durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IL-17 (Cowland et al. 2003, Chan et al. 2009, Gupta et al. 2012) erscheint es plausibel, dass NGAL im Rahmen der Sepsis von den

ortsständigen Zellen des alveolären Systems produziert wird und so als Teil des angeborenen Immunsystems der Erregerabwehr dient. Bei einer endotrachealen Infektion mit *K. pneumoniae* zeigt sich eine deutliche Reduktion von NGAL in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und immunhistochemisch in der Lunge bei myeloid-spezifischer NGAL-Depletion, jedoch nicht bei hepatozyten-spezifischer NGAL-Depletion. Zudem ist in diesem Modell auch die Bakterienlast bei den myeloid-spezifisch NGAL-depletierten Mäusen in der BAL erhöht, dies bedeutet, dass das von Neutrophilen/Makrophagen produzierte NGAL wesentlicher Bestandteil bei der Elimination bestimmter respiratorischer Infektionen ist (Li et al. 2018).

Dementsprechend ist zu vermuten, dass es wesentlich vom Infektionsort abhängt welches Gewebe in welchem Ausmaß NGAL produziert und so zur Elimination der Infektion beiträgt. Darüber hinaus konnte am Beispiel der Pneumonie gezeigt werden, dass es erregerspezifisch zu einer Organ-Organ-Interaktion zwischen Lunge und Leber kommt. Dabei konnte anhand einer Analyse der Transkriptomik und Metabolomik bei Pneumonie durch unterschiedliche Pneumokokkenstämme eine Induktion der Cholesterolsynthese in der Leber in Abhängigkeit des Vorhandenseins von Pneumolysin (als Virulenzfaktor) identifiziert werden (Weber et al. 2012). Inwiefern vergleichbare Mechanismen für die Expression von NGAL in der Lunge eine Rolle spielen, bleibt zu klären. Für die in der vorliegenden Arbeit gemessene, vergleichsweise moderate Erhöhung der *Ngal*-mRNA in der Lunge im Vergleich zur Leber kommen mehrere Erklärungen in Frage. Zum einen war in unserem Sepsismodell die Bauchhöhle die primäre Eintrittspforte der Erreger, sodass die Leber über das Pfortadersystem zumindest initial einer wesentlich höheren Infektionsdosis ausgesetzt sein dürfte. Zum anderen ist die Lunge nicht primär für die systemische Produktion von Akute-Phase-Proteinen zuständig, sodass NGAL in der Lunge wahrscheinlich primär an der lokalen Eindämmung der Infektion beteiligt ist, jedoch ist bis dato nicht bekannt in welchem Umfang in der Lunge produziertes NGAL der systemischen Zirkulation zugeführt wird. Eine andere Publikation untersuchte differentiell exprimierte Gene im Vollblut bei Patienten mit Sepsis und ARDS im Vergleich zu Patienten mit alleiniger Sepsis und identifizierte mehrere hochregulierte Gene, hierunter *NGAL*, dies bestätigte sich auch auf Proteinebene. Diese Assoziation war auch nach Adjustierung für den Kreatinin-Wert vorhanden, sodass die Autoren eine direkte Bedeutung von NGAL in der Pathogenese des ARDS vermuten (Kangelaris et al. 2015). Auch wenn in dieser Studie eine

Adjustierung für das Alter, Geschlecht, die Zahl der Leukozyten und Neutrophilen sowie das Vorhandensein einer vorbestehenden Lungenschädigung erfolgte, bleibt der Ursprung der gemessenen plasmatischen *NGAL*-mRNA und des *NGAL*-Proteins unklar. Zudem waren die Patienten in der Gruppe, die ein ARDS entwickelten insgesamt kränker als diejenigen in der Nicht-ARDS-Gruppe. Auch eine andere Studie am Mausmodell postulierte, dass *NGAL* zur Unterscheidung von septischen Mäusen mit akuter Lungenschädigung (ALI) gegenüber denjenigen ohne Lungenschädigung geeignet sei (Zeng et al. 2014). Zwar lagen die Kriterien für ein experimentelles ALI nach Expertenkonsens der American Thoracic Society vor, jedoch waren in dieser Studie, die Tiere, welche ein ALI entwickelten in denjenigen Versuchsgruppen, die eine höhere Infektionsdosis erhielten (LPS- und CLP-Modell). Aufgrund der Limitierungen der beiden genannten Studien könnte abgeleitet werden, dass die Schwere der Sepsis für das ALI/ARDS verantwortlich ist und *NGAL* dieses nur sekundär widerspiegelt, dies muss anhand weiterer Studien überprüft werden.

5.3.5 Herz

Im Herzen zeigte sich in den septischen Proben ein sehr ähnliches Expressionsmuster wie in der Niere mit einer deutlichen Erhöhung der *Ngal*-mRNA nach 6h Stunden, welche sich nach 24h bei über 50% der Tiere weiter steigerte, bei mindestens 25% findet sich jedoch eine Verminderung nach 24h (entsprechend resultiert in der 24h PCI-Gruppe eine hohe Streubreite). In den Sham-Proben zeigten sich nur geringfügige Erhöhungen. Immunhistochemische Untersuchungen des Herzens liegen in dieser Arbeit nicht vor, sodass die Frage der zellulären Lokalisation des *NGAL*-Protein nicht beantwortet werden kann. Aus einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe liegen histologische Untersuchungen des Herzens am identischen Tiermodell vor, die lichtmikroskopisch in allen Gruppen einen unauffälligen Befund zeigten (Lemm 2009). Dementsprechend kann die Erhöhung der *Ngal*-mRNA im Herzen aufgrund der fehlenden Infiltration von Entzündungszellen (insb. Makrophagen) nur im Rahmen einer lokalen Synthese durch Kardiomyozyten erklärt werden. In der Literatur liegen bisher keine Studien über die kardiale *Ngal*-Expression bei der Sepsis vor. Es konnte jedoch am Modell einer experimentellen autoimmunen Myokarditis (EAM) bzw. der experimentellen Herzinsuffizienz als auch am Myokard herzinsuffizienter Patienten gezeigt werden, dass *Ngal* v.a. in den betroffenen Kardiomyozyten stark hochreguliert wurde und mit proinflammatorischen Zytokinen assoziiert ist (Ding et al. 2010, Yndestad et al. 2009). Die funktionelle

Rolle, die NGAL hierbei spielt, ist nicht hinreichend verstanden, zum Einen scheint NGAL durch die Regulation des intrazellulären Eisenspiegels einen Einfluss zu haben, so wurden im Tiermodell pro-apoptotische Effekte auf die Kardiomyozyten durch Akkumulation von intrazellulärem Eisen nachgewiesen (Xu et al. 2012). Zum Anderen spielen proinflammatorische Prozesse eine Rolle. Hierbei kann NGAL die kardiale Inflammation durch eine Stimulierung der Polarisation des proinflammatorischen Makrophagen M1-Phänotyps fördern, was wiederum über die Expression von TNF- α und anderen Zytokinen zur Expression von *Ngal* führt (Chan et al. 2015). In wieweit diese Mechanismen bei der septischen Kardiomyopathie eine Rolle spielen, bleibt spekulativ und muss in weiteren Studien untersucht werden. Bekannt ist jedoch, dass proinflammatorische Zytokine neben weiteren in Abschnitt 1.3.8 genannten Mechanismen an der Entstehung der myokardialen Depression bei der Sepsis beteiligt sind. Eine zentrale Rolle spielen hierbei erneut die Zytokine TNF- α , IL-1 und IL-6, denen jeweils kardiodepressive Effekte zugeschrieben werden, zudem spielt auch eine über TLR4-vermittelte Inflammation eine Rolle (Antonucci et al. 2014). Mehrfach beschrieben wurde bereits, dass diese zentralen Zytokine wiederum zur Expression von *Ngal* führen, was die in dieser Arbeit gemessenen Werte pathomechanistisch erklären kann, ohne dass sich hieraus Rückschlüsse auf die biologische Funktion von NGAL im septischen Herzen ableiten lassen.

5.3.6 NGAL-Rezeptor (*Slc22a17*)

Die Messung der *Ngal*-Rezeptor mRNA (*Slc22a17*) zeigt in der Leber eine deutliche Herabregulation (ca. 4-fach im Vergleich zu naiv), allerdings scheint bereits die experimentelle Prozedur an sich einen maßgeblich Effekt zu haben, da auch die Sham-behandelten Tiere eine ähnlich starke Herabregulation zeigen. In der Niere und Lunge hat die experimentelle Prozedur kaum einen Einfluss auf die *Ngal*-Rezeptor-Expression, hingegen zeigt sich eine signifikante Herabregulation des *Ngal*-Rezeptors bei den septischen Tieren zu beiden Zeitpunkten. Im Herzen zeigt sich dieselbe Tendenz bei den septischen Tieren, allerdings führt die Sham-Behandlung hier v.a. nach 6h eher zu einer Hochregulation des *Ngal*-Rezeptors. Bereits erwähnt wurde eine negative Korrelation zwischen der *Ngal*-Hochregulation und einer Herabregulation des *Ngal*-Rezeptors (*Slc22a17*), hierbei zeigte sich in der Leber und im Herzen eine mittlere Effektstärke, in der Niere und Lunge war der Effekt stark. Es stellt sich die Frage eines ursächlichen Zusammenhanges. Die Beobachtung, dass die Leber im Vergleich zu den anderen Organen die stärkste

Herabregulation des Rezeptors zeigt, könnte mit ihrer Sonderstellung im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion zusammenhängen, so erschien es plausibel, dass das in der Leber stark hochregulierte und ins Plasma sezernierte NGAL primär eine systemische Funktion ausübt und z.B. der Erregerabwehr über die Bindung bakterieller Siderophore dient, eine Wiederaufnahme in die Leber über seinen Rezeptor wäre hierbei hinderlich. Dies könnte auch für die anderen Organe in ähnlicher Weise gelten, demnach könnte man spekulieren, ob die Herabregulation der *Ngal*-Rezeptor mRNA Teil einer allgemeinen Abwehrreaktion des Wirtes im Rahmen der Sepsis ist. Erste Hinweise, dass es eine Art Feedback-Mechanismus zwischen NGAL und seinem Rezeptor geben könnte, ergaben sich aus einer *in vitro*-Studie, in der die Expression beider *Ngal*-Rezeptoren gemessen wurde und festgestellt wurde, dass diese nach Zufuhr von NGAL herabreguliert wurden (Zang et al. 2014); über welche Mechanismen dies vermittelt wird, blieb jedoch unklar. Für die meisten der NGAL-Effekte konnte gezeigt werden, dass diese rezeptorabhängig sind und über den Transport von Eisen in oder aus der Zelle vermittelt werden, es ist jedoch unsicher, ob alle NGAL-Effekte über einen der beiden bekannten Rezeptoren vermittelt werden oder ob es auch rezeptorunabhängige Mechanismen gibt; auch konnte bisher kein löslicher *Ngal*-Rezeptor identifiziert werden.

Vergleichende Daten in der Literatur in Bezug auf das Expressionsverhalten des *Ngal*-Rezeptors im Rahmen systemischer Entzündungen liegen nicht vor. Daher sind weitere Studien zwingend notwendig, um weitere Daten zur Charakterisierung des Rezeptors zu gewinnen und so den komplexen Metabolismus von NGAL weiter zu entschlüsseln.

5.3.7 Veränderungen wichtiger Eisenparameter im Modell der polymikrobiellen Sepsis und mögliche Zusammenhänge mit der *Ngal*-Expression

Aufgrund der in Abschnitt 1.3.3 beschriebenen Veränderungen der Eisenparameter im Rahmen einer Entzündungsreaktion einerseits und der Erkenntnis, dass NGAL selbst hierbei eine maßgebliche Rolle spielt, erschien es von Interesse, die wichtigsten Eisenparameter im PCI-Modell zu messen, aufgrund der vorhandenen Literatur erschienen hierzu Ferritin und der Transferrin-Rezeptor von Interesse. Für Ferritin existiert eine L- und eine H-Untereinheit (Tsuji et al. 1999, Torti und Torti 2002), die beide auf mRNA-Ebene gemessen wurden. Hierbei zeigte sich in allen Organen eine geringe Hochregulation der H-Untereinheit im Vergleich der PCI-Behandlung mit der jeweiligen Kontrollgruppe (Sham), die jedoch nicht in allen

Organen statistisch signifikant war. In Bezug auf die L-Untereinheit war das Reaktionsmuster inhomogen, es kam jedoch in allen Organen zu einer geringen Herabregulation nach 24h nach PCI-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe, nach 6h zeigten sich keine signifikanten Veränderungen und keine eindeutige Tendenz. Insgesamt fällt auf, dass die Expressionsveränderungen gering ausgeprägt sind. Letzteres erklärt sich dadurch, dass Ferritin und der Transferrin-Rezeptor vorrangig posttranskriptionell über den Eisenspiegel reguliert werden (Torti und Torti 2002). Da jedoch auch eine transkriptionelle Regulation durch proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- α existiert und diese zu einer bevorzugten Erhöhung der H-Untereinheit führen, kann die gemessene Erhöhung der H-Untereinheit hierdurch erklärt werden. Da der H-Subtyp im Gegensatz zum L-Subtyp eine schnelle Aufnahme des Eisens ermöglicht, werden die Zellen so wahrscheinlich besser vor erhöhtem oxidativem Stress geschützt (Tsuji et al. 1999). Im CLP-Modell konnte gezeigt werden, dass Ferritin H bei der polymikrobiellen Sepsis hochreguliert wird und dies zu einer erhöhten Krankheitstoleranz bei einer Sepsis führt; bedeutsam ist hierbei, dass die Bindung von freiem Eisen zu einer Stabilisierung der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase-Aktivität führt und dies dazu beiträgt den Blutzuckerspiegel in einem „dynamischen“ Bereich zu halten, was sich letztlich günstig auf das Überleben auswirkt (Weis et al. 2017). Die Untersuchung des Transferrin-Rezeptors im PCI-Modell zeigte eine Herabregulation bei den septischen Proben in der Leber und Nieren im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe, dies wird jedoch erst nach 24h statistisch signifikant. In der Lunge lagen keinerlei signifikante Veränderungen vor. Eine Herabregulation des Transferrin-Rezeptors über proinflammatorische Zytokine ist in vitro beschrieben (Ryu et al. 2000).

Bekannt ist, dass NGAL in der Lage ist, Eisen in die Zelle zu transportieren und im Rahmen einer Infektion mit extrazellulären Bakterien deren Wachstum durch die Ausbildung einer Hypoferrämie begrenzt (Ganz und Nemeth 2015). Das erhöhte intrazelluläre Eisen führt dann über die Bindung an „iron binding proteins“ (IRPs) zu einer Erhöhung von Ferritin und Erniedrigung des Transferrin-Rezeptors, dies stellt jedoch einen vorrangig posttranskriptionellen Mechanismus dar, sodass NGAL vermutlich keinen direkten Einfluss auf die Transkription von Ferritin und Transferrin hat. Um den Einfluss bzw. mögliche Zusammenhänge der *Ngal*-Expression auf den Eisenmetabolismus in der Sepsis zu charakterisieren sind weitergehende Analysen notwendig, die unter anderem die Messung der Eisenparameter auf Proteinebene

beinhalten. Wie in Abschnitt 1.3.3 bereits erläutert wird angenommen, dass NGAL nicht redundante Funktionen in der Regulation des Eisenstoffwechsels und der Ausbildung einer Entzündungsanämie hat. Dies konnte zwar auch in Vergleichen von Wildtyp-Mäusen mit NGAL-depletierten Mäusen in zwei Infektionsmodellen (LPS-Modell (Srinivasan et al. 2012) / Colitis-Modell (Xiao et al. 2016)) gezeigt werden, jedoch liegen keine Untersuchungen in einem validen Sepsismodell vor, sodass eine Analyse des Eisenmetabolismus im PCI-Modell mit NGAL-depletierten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp den Einfluss von NGAL in der Sepsis weiter charakterisieren könnte.

5.3.8 Überlegungen über die funktionelle Rolle von NGAL im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion

Ngal wird im Modell der polymikrobiellen Sepsis in allen untersuchten Organen stark hochreguliert. Welche funktionelle Rolle NGAL dabei im Gesamtorganismus spielt, ist weitgehend unbekannt, eine Vielzahl einzelner Aspekte konnte bisher aufgeschlüsselt werden, die im Prinzip die Komplexität des NGAL-Metabolismus weiter verdeutlichen. Bekannt ist, dass es zu Beginn einer Sepsis zu einer ausgeprägten proinflammatorischen Reaktion kommt. Dementsprechend stellt sich die Frage, inwiefern die Expression von *Ngal* hiermit zusammenhängt. In mehreren Studien wurde eine Korrelation der *Ngal*-Expression mit proinflammatorischen Zytokinen gezeigt, beispielsweise wurde im PCI-Modell der Sepsis eine Korrelation mit TNF- α nach 6h sowie eine Korrelation mit TNF- α , IL-6, MCP1 und IL-10 nach 24h gezeigt (Otto et al. 2013) Auch in einer Folgestudie an Patienten mit unterschiedlicher Ausprägung einer systemischen Inflammation konnte eine Assoziation mit proinflammatorischen Zytokinen gezeigt werden und in Vollblutstimulationsversuchen eine NGAL-Erhöhung durch IL-6 und LPS nachgewiesen werden (Otto et al. 2015), was tierexperimentelle Befunde mit verschiedenen Modellen bestätigt (Meheus et al. 1993, Paragas et al. 2012, Han et al. 2012). In Bezug auf humane Epithelien wurde *ex-vivo* eine Induzierbarkeit von NGAL durch IL-1 β und durch TNF- α bei Co-Stimulation mit IL-17 gezeigt (Karlsen et al. 2010). Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Organe im Rahmen der systemischen Inflammationsreaktion maßgeblich unter dem Einfluss des „Zytokinsturmes“ stehen, kann dies die Erhöhung der *Ngal*-Expression aus pathobiochemischer Grundlage erklären. Weiterführend stellt sich die Frage, welche biologischen Funktionen die Expressionssteigerung von *Ngal* im Rahmen der Sepsis

haben könnte. In der Literatur finden sich mehrere Studien, die gezeigt haben, dass NGAL über verschiedene Mechanismen eine elementare Rolle in der unspezifischen Immunabwehr bakterieller Infektionen spielt, indem es durch Bindung bestimmter bakterieller Siderophore bakteriostatische Funktionen ausübt, dementsprechend zeigte sich bei NGAL-depletierten Mäusen eine erhöhte Mortalität bei einer Infektion einhergehend mit einer deutlich erhöhten Bakterienlast (Flo et al. 2004, Berger et al. 2006, Srinivasan et al. 2012). Hierbei kommt der Leber eine Schlüsselrolle zu, was durch die erhöhte Sterblichkeit bei deutlich erniedrigten NGAL-Plasmaspiegeln bei hepatozytenspezifisch NGAL-depletierten Mäusen belegt wurde (Xu et al. 2015, Li et al. 2018). Sicher ist jedoch auch, dass die Rolle von NGAL über die beschriebenen bakteriostatischen Funktionen hinausgeht. Durch die Fähigkeit des NGAL über eine Interaktion mit seinen Rezeptoren Eisen in die Zelle hinein bzw. aus der Zelle zu transportieren, spielt es eine nicht redundante Rolle in der Regulation des Eisenstoffwechsels bei Inflammation und Infektion (Ganz und Nemeth 2015). Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, wurde bei NGAL-depletierten Mäusen gezeigt, dass diese eine, im Vergleich zum Wildtyp deutlich verzögerte Hypoferrämie (Entzündungsanämie) nach LPS-Injektion bzw. im Modell der akuten Colitis ausbilden. Bei den NGAL-depletierten Mäusen zeigten sich im LPS-Modell zudem Marker für einen erhöhten oxidativen Stress in der Leber und im Plasma. Darüber hinaus wiesen diese erhöhte Parameter der Organschädigung (Transaminasen, Lactatdehydrogenase) sowie eine gesteigerte Caspase-3-Aktivität als Marker der Apoptose auf, durch die Gabe von Desferroxamin (als Eisenchelator) konnten die Effekte aufgehoben werden (Srinivasan et al. 2012). Diese Daten sind deutliche Hinweise, dass NGAL über eine indirekt antioxidative Wirkung eine protektive Wirkung im Rahmen einer systemischen Inflammation hat. Darüber hinaus wird eine Beteiligung an Mechanismen der Apoptose diskutiert (Kehrer 2010), was im Rahmen des Gleichgewichtes pro- und antiinflammatorischer Faktoren bei der Sepsis eine Rolle spielen könnte. Hierbei spielt insbesondere die Herabregulation der Immunantwort durch Apoptose von Immunzellen eine Rolle, zum Beispiel wenn die Stimulation durch IL-3 unterbleibt (Devireddy et al. 2001). Zwar erscheinen NGAL-depletierte Mäuse phänotypisch unauffällig (Flo et al. 2004), jedoch zeigten diese multiple apoptotische Defekte hämatologischer Zellen (Liu et al. 2011). Über Versuche mit NGAL-depletierten Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass NGAL eine maßgebliche Rolle für mehrere Funktionen der Neutrophilen besitzt, wie z.B.

Adhäsion und Extravasation, Phagozytose, Reifung und Chemotaxis von Neutrophilen (Liu et al. 2013, Nasioudis und Witkin 2015, Wang et al. 2019), ähnliche Ergebnisse zeigte eine Arbeit, in der NGAL-depletierte Mäuse im Rahmen einer hepatischen Inflammation eine geringere Rekrutierung von Neutrophilen und Leukozyten im Vergleich zum Wildtyp zeigten (Asimakopoulou et al. 2016). Es existieren jedoch auch Arbeiten, die keinen Einfluss von NGAL auf die Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen postulieren, diese gegensätzlichen Ergebnisse scheinen den unterschiedlichen Infektionsmodellen und Analysemethoden geschuldet (Lu et al. 2019a). Eine positive Korrelation von NGAL mit der Expression von IL-6 und IL-10 sowie des endothelialen Adhäsionsmoleküles VCAM-1 in einem Kollektiv von Sepsispatienten wurde als Hinweis dafür gesehen, dass NGAL eine Bedeutung für die Interaktion zwischen Leukozyten und dem Endothel hat und eine pathogenetische Rolle bei der Entwicklung eines septischen Schocks spielt (Macdonald et al. 2017). Darüber hinaus scheint NGAL eine regulierende Wirkung auf die Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Rahmen einer systemischen Inflammation zu haben: Zellen von NGAL-depletierten Mäusen weisen *ex vivo* eine Hypersensitivität auf Stimulation mit LPS im Sinne einer deutlich erhöhten Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine auf (Srinivasan et al. 2012). Aus humanen Vollblutstimulationsversuchen ergaben sich Hinweise, dass NGAL seine eigene Expression gegenregulatorisch supprimiert (Otto et al. 2015). Zusammenfassend sind die Daten aus der Literatur ein deutlicher Hinweis dafür, dass NGAL ein wichtiger Teil des unspezifischen/angeborenen Immunsystems ist und somit primär eine protektive Wirkung ausübt. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass von Hepatozyten produziertes NGAL eine wesentliche Bedeutung für die Bekämpfung einer Bakteriämie hat und von myeloiden Zellen (Neutrophile/Makrophagen) produziertes NGAL bei der Eindämmung lokaler Infektionen wichtig zu sein scheint, hierbei ist die Fähigkeit dieser Zellen ins betroffene Gewebe zu migrieren von besonderer Bedeutung, diese wiederum scheint durch NGAL beeinflusst zu werden (Xu et al. 2015, Li et al. 2018, Lu et al. 2019a). Jedoch muss festgehalten werden, dass sich die im Rahmen einer Sepsis, auch in Bezug auf den NGAL-Metabolismus abspielenden, komplexen Wechselwirkungen noch weitgehend unverstanden sind und weiterer intensiver Forschungsarbeit bedürfen.

Von besonderem Interesse ist zudem die Frage, ob eine exogene Gabe von NGAL den Verlauf einer Sepsis möglicherweise günstig beeinflussen kann, diese Frage wurde im PCI-Modell untersucht und ergab ein signifikant verbessertes Outcome bei denjenigen Tieren, die exogenes NGAL erhielten (Otto et al. 2015). Ob dies auch im klinischen Kontext zutrifft, gilt es zukünftig zu prüfen.

5.3.9 Diagnostische Wertigkeit von Plasma- oder Urin-NGAL

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde die Messung des Plasma-NGAL jeweils als Biomarker für eine Organschädigung propagiert, insbesondere soll Plasma-NGAL wesentlich früher als Kreatinin eine Nierenschädigung anzeigen (Kuwabara et al. 2009, Paragas et al. 2012, Zhang et al. 2016). Beispielsweise soll Plasma-NGAL jedoch auch bei chronischer Lebererkrankung im Rahmen einer Hepatitis B als Prognosemarker beim akut-auf-chronischen Leberversagen eine hohe Aussagekraft haben (Lu et al. 2019b). Weiterhin wurde eine Assoziation mit der Schwere einer Sepsis und der Entwicklung einer myokardialen Dysfunktion gezeigt (Wang et al. 2017). Auch im Tiermodell wird NGAL als Ausdruck einer Schädigung von Hepatozyten in der Ratte gesehen (Borkham-Kamphorst et al. 2011) oder als Marker der Lungenschädigung bei septischen Mäusen propagiert (Zeng et al. 2014).

Für eine isolierte Schädigung eines Organes im experimentellen Modell erscheinen diese Annahmen möglicherweise plausibel, in der klinischen Praxis existieren jedoch häufig Komorbiditäten und Organ-Organ-Interaktionen, die jeweils einen eigenen Einfluss auf den NGAL-Metabolismus haben können. Insbesondere im Rahmen einer systemischen Infektion wie der Sepsis sind vermutlich mehrere Organe an der Sekretion von NGAL in das Blutplasma beteiligt, es ist jedoch unklar, welches Organ in welchem Maße den NGAL-Plasmaspiegel beeinflusst, sodass es äußerst fragwürdig erscheint, ob NGAL als spezifischer Marker einer einzigen Krankheitsentität angesehen werden kann. Verschiedene experimentelle Studien verdeutlichen diesen kontroversen Aspekt, beispielsweise zeigte eine 2016 in der Fachzeitschrift „Shock“ veröffentlichte Arbeit, dass es nach bilateraler Nephrektomie im Mausmodell zu einem (gering) stärkeren Anstieg des Plasma-NGAL kommt als nach beidseitiger Ureterligatur oder nach CLP-Prozedur (Leelahavanichkul et al. 2016), sodass Plasma-NGAL einem extrarenalen Pool entstammen muss und sicher nicht nierenspezifisch ist. Dennoch kommt diese Arbeit zum Schluss, NGAL eigne sich einen akuten Funktionsverlust der Niere zu identifizieren. Letzteres wird durch eine Arbeit von Katagiri et. al in Frage gestellt, die Patienten auf einer Intensivstation

ohne AKI und ohne Sepsis (n=40), mit AKI ohne Sepsis (n=65), mit Sepsis ohne AKI (n=10) sowie mit sepsisassoziiertem AKI (n=24) untersuchten und deren NGAL-Plasmaspiegel vergleichen: es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit AKI ohne Sepsis und Patienten mit Sepsis ohne AKI (Katagiri et al. 2013), ähnliche Ergebnisse lieferten auch zwei weitere Studien (Martensson et al. 2010, Martensson et al. 2013). Vermutlich kann NGAL im Rahmen einer Sepsis nicht primär als Marker einer Nierenschädigung gesehen werden kann, sondern ist deutlich mit der Inflammation *per se* assoziiert (Otto et al. 2015) oder sollte als globaler Schädigungsparameter betrachtet werden. Eine Assoziation von NGAL mit verschiedenen Markern der Inflammation (TNF- α nach 6h und 24h, sowie IL-6 und IL-10 nach 24h) wurde im Mausmodell nachgewiesen (Otto et al. 2013). In einer weiteren Untersuchung bestätigte sich diese Assoziation auch bei verschiedener Ausprägung einer systemischen Inflammation beim Menschen, hier konnte gezeigt werden, dass nach antiinflammatorischer Behandlung von Rheuma-Patienten sich eine positive Korrelation von NGAL mit der Nierenfunktion zeigte, sodass die Hypothese aufgestellt wurde, diese Korrelation werde durch die systemische Inflammation „maskiert“ (Otto et al. 2015). Da der „Zytokin-Sturm“ als einer der Faktoren gilt, die zum akuten Nierenversagen bei Sepsis als „remote organ failure“ beiträgt, kann hierdurch die Beobachtung erklärt werden, dass es beim akuten Nierenversagen aufgrund Sepsis zu höheren plasmatischen NGAL-Werten kommt als beim nicht septischen akuten Nierenversagen (Bagshaw et al. 2010). Trotz dieser Einschränkungen ergab eine aktuelle Metaanalyse vorhandener Publikationen über die Eignung von NGAL als Marker der Nierenschädigung, dass diese Eignung auch bei Sepsis vorliegt, jedoch mit höheren Cut-Off-Werten vergesellschaftet ist (Zhang et al. 2016): die gepoolte Sensitivität lag bei 83%, die Spezifität lag jedoch lediglich bei 57%. Hingegen scheint Urin-NGAL ein verlässlicherer Marker der Nierenfunktion zu sein mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 80%. Bezüglich des Ursprunges des Urin-NGAL gibt es jedoch ebenfalls unterschiedliche Daten, einerseits wird propagiert Urin-NGAL Stamme nahezu ausschließlich aus geschädigten Nierenepithelien und korreliere mit der Expression der *Ngal*-mRNA als direktem Marker der Nierenschädigung (Han et al. 2012), andererseits wird in einer aktuelleren Arbeit eine gestörte tubuläre Reabsorption als Hauptursache für die erhöhten Urin-NGAL werte gesehen (Sancho-Martinez et al. 2020). Aber auch hier bestehen Einschränkungen wie z.B. bei akutem anurischem Nierenversagen oder bei

Erkrankungen, die zu einer Schädigung der glomerulären Filtration und tubulären Reabsorption im proximalen Tubulus führen wie zum Beispiel die diabetische Nephropathie (Kuwabara et al. 2009, Paragas et al. 2012). In Bezug auf NGAL als möglichen Marker der Sepsis zeigten zwar mehrere Studien, dass NGAL mit der Schwere der Sepsis und einer erhöhten Mortalität korreliert (Hong et al. 2016, Wang et al. 2017, Chang et al. 2018), aufgrund der beschriebenen multiplen Einflüsse auf die *NGAL*-Expression durch Komorbiditäten und der daraus resultierenden niedrigen Spezifität eignet sich NGAL sicherlich nicht als alleiniger Biomarker zur Diagnose einer Sepsis; es könnte dem Intensivmediziner jedoch zusätzliche Informationen zur Prognoseabschätzung liefern.

6 Literaturverzeichnis

- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 64 (15):5245-5250.
- Antonucci E, Fiaccadori E, Donadello K, Taccone FS, Franchi F, Scolletta S. 2014. Myocardial depression in sepsis: from pathogenesis to clinical manifestations and treatment. *J Crit Care*, 29 (4):500-511.
- Asimakopoulou A, Borkham-Kamphorst E, Tacke F, Weiskirchen R. 2016. Lipocalin-2 (NGAL/LCN2), a "help-me" signal in organ inflammation. *Hepatology*, 63 (2):669-671.
- Asimakopoulou A, Borkham-Kamphorst E, Henning M, Yagmur E, Gassler N, Liedtke C, Berger T, Mak TW, Weiskirchen R. 2014. Lipocalin-2 (LCN2) regulates PLIN5 expression and intracellular lipid droplet formation in the liver. *Biochim Biophys Acta*, 1842 (10):1513-1524.
- Ayala A, Knotts JB, Ertel W, Perrin MM, Morrison MH, Chaudry IH. 1993. Role of interleukin 6 and transforming growth factor-beta in the induction of depressed splenocyte responses following sepsis. *Arch Surg*, 128 (1):89-94; discussion 94-85.
- Bachman MA, Miller VL, Weiser JN. 2009. Mucosal lipocalin 2 has pro-inflammatory and iron-sequestering effects in response to bacterial enterobactin. *PLoS Pathog*, 5 (10):e1000622.
- Bachman MA, Lenio S, Schmidt L, Oyler JE, Weiser JN. 2012. Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of *Klebsiella pneumoniae* during pneumonia. *MBio*, 3 (6).
- Bagshaw SM, George C, Bellomo R, Committee ADM. 2008. Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation. *Crit Care*, 12 (2):R47.
- Bagshaw SM, Bennett M, Haase M, Haase-Fielitz A, Egi M, Morimatsu H, D'Amico G, Goldsmith D, Devarajan P, Bellomo R. 2010. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in septic versus non-septic acute kidney injury in critical illness. *Intensive Care Med*, 36 (3):452-461.
- Bao G, Clifton M, Hoette TM, Mori K, Deng SX, Qiu A, Viltard M, Williams D, Paragas N, Leete T, Kulkarni R, Li X, Lee B, Kalandadze A, Ratner AJ, Pizarro JC, Schmidt-Ott KM, Landry DW, Raymond KN, Strong RK, Barasch J. 2010. Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. *Nat Chem Biol*, 6 (8):602-609.
- Bao GH, Ho CT, Barasch J. 2015. The Ligands of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *RSC Adv*, 5 (126):104363-104374.
- Bauer M, Coldewey SM, Leitner M, Loffler B, Weis S, Wetzker R. 2018. Deterioration of Organ Function As a Hallmark in Sepsis: The Cellular Perspective. *Front Immunol*, 9:1460.
- Bauhofer A, Stinner B, Kohlert F, Reckzeh B, Lorenz W, Celik I. 2002. Granulocyte colony-stimulating factor but not peritoneal lavage increases survival rate after experimental abdominal contamination and infection. *Br J Surg*, 89 (11):1457-1464.
- Beker BM, Corleto MG, Fieiras C, Musso CG. 2018. Novel acute kidney injury biomarkers: their characteristics, utility and concerns. *Int Urol Nephrol*, 50 (4):705-713.
- Berger T, Togawa A, Duncan GS, Elia AJ, You-Ten A, Wakeham A, Fong HE, Cheung CC, Mak TW. 2006. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased

- sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (6):1834-1839.
- Bhargava R, Altmann CJ, Andres-Hernando A, Webb RG, Okamura K, Yang Y, Falk S, Schmidt EP, Faubel S. 2013. Acute lung injury and acute kidney injury are established by four hours in experimental sepsis and are improved with pre, but not post, sepsis administration of TNF- α antibodies. *PLoS One*, 8 (11):e79037.
- Bone RC. 1996. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*, 24 (7):1125-1128.
- Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. 1997. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*, 112 (1):235-243.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101 (6):1644-1655.
- Borkham-Kamphorst E, Drews F, Weiskirchen R. 2011. Induction of lipocalin-2 expression in acute and chronic experimental liver injury moderated by pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β through nuclear factor- κ B activation. *Liver Int*, 31 (5):656-665.
- Borkham-Kamphorst E, Van de Leur E, Haas U, Weiskirchen R. 2019. Liver parenchymal cells lacking Lipocalin 2 (LCN2) are prone to endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. *Cell Signal*, 55:90-99.
- Borkham-Kamphorst E, van de Leur E, Zimmermann HW, Karlmark KR, Tihaa L, Haas U, Tacke F, Berger T, Mak TW, Weiskirchen R. 2013. Protective effects of lipocalin-2 (LCN2) in acute liver injury suggest a novel function in liver homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, 1832 (5):660-673.
- Borregaard N, Sehested M, Nielsen BS, Sengelov H, Kjeldsen L. 1995. Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood*, 85 (3):812-817.
- Brunkhorst FM. 2006. [Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 41 (1):43-44.
- Butcher EC. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67 (6):1033-1036.
- Cabedo Martinez AI, Weinhaupl K, Lee WK, Wolff NA, Storch B, Zerko S, Konrat R, Kozminski W, Breuker K, Thevenod F, Coudeville N. 2016. Biochemical and Structural Characterization of the Interaction between the Siderocalin NGAL/LCN2 (Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin/Lipocalin 2) and the N-terminal Domain of Its Endocytic Receptor SLC22A17. *J Biol Chem*, 291 (6):2917-2930.
- Cauvi DM, Song D, Vazquez DE, Hawisher D, Bermudez JA, Williams MR, Bickler S, Coimbra R, De Maio A. 2012. Period of irreversible therapeutic intervention during sepsis correlates with phase of innate immune dysfunction. *J Biol Chem*, 287 (24):19804-19815.
- Cavaillon JM, Annane D. 2006. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res*, 12 (3):151-170.
- Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. 2012. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1826 (1):129-169.

- Chan YK, Sung HK, Sweeney G. 2015. Iron metabolism and regulation by neutrophil gelatinase-associated lipocalin in cardiomyopathy. *Clin Sci (Lond)*, 129 (10):851-862.
- Chan YR, Liu JS, Pociask DA, Zheng M, Mietzner TA, Berger T, Mak TW, Clifton MC, Strong RK, Ray P, Kolls JK. 2009. Lipocalin 2 is required for pulmonary host defense against *Klebsiella* infection. *J Immunol*, 182 (8):4947-4956.
- Chang W, Zhu S, Pan C, Xie JF, Liu SQ, Qiu HB, Yang Y. 2018. Predictive utilities of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in severe sepsis. *Clin Chim Acta*, 481:200-206.
- Chao CT, Hou CC, Wu VC, Lu HM, Wang CY, Chen L, Kao TW. 2012. The impact of dialysis-requiring acute kidney injury on long-term prognosis of patients requiring prolonged mechanical ventilation: nationwide population-based study. *PLoS One*, 7 (12):e50675.
- Chertow GM, Christiansen CL, Cleary PD, Munro C, Lazarus JM. 1995. Prognostic stratification in critically ill patients with acute renal failure requiring dialysis. *Arch Intern Med*, 155 (14):1505-1511.
- Christensen EI, Birn H. 2002. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (4):256-266.
- Chu ST, Lin HJ, Huang HL, Chen YH. 1998. The hydrophobic pocket of 24p3 protein from mouse uterine luminal fluid: fatty acid and retinol binding activity and predicted structural similarity to lipocalins. *J Pept Res*, 52 (5):390-397.
- Claus RA, Bockmeyer CL, Budde U, Kentouche K, Sossdorf M, Hilberg T, Schneppenheim R, Reinhart K, Bauer M, Brunkhorst FM, Losche W. 2009. Variations in the ratio between von Willebrand factor and its cleaving protease during systemic inflammation and association with severity and prognosis of organ failure. *Thromb Haemost*, 101 (2):239-247.
- Clermont G, Acker CG, Angus DC, Sirio CA, Pinsky MR, Johnson JP. 2002. Renal failure in the ICU: comparison of the impact of acute renal failure and end-stage renal disease on ICU outcomes. *Kidney Int*, 62 (3):986-996.
- Cowland JB, Borregaard N. 1997. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics*, 45 (1):17-23.
- Cowland JB, Sorensen OE, Sehested M, Borregaard N. 2003. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. *J Immunol*, 171 (12):6630-6639.
- Darveau M, Denault AY, Blais N, Notebaert E. 2004. Bench-to-bedside review: iron metabolism in critically ill patients. *Crit Care*, 8 (5):356-362.
- Deitch EA. 1992. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg*, 216 (2):117-134.
- Denisov V. 2008. Development and Validation of RQI: An RNA Quality Indicator for the Experion Automated Electrophoresis System. *Bio-Rad Bulletin* 5761.
- Devireddy LR, Teodoro JG, Richard FA, Green MR. 2001. Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science*, 293 (5531):829-834.
- Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. 2005. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*, 123 (7):1293-1305.
- Devireddy LR, Hart DO, Goetz DH, Green MR. 2010. A mammalian siderophore synthesized by an enzyme with a bacterial homolog involved in enterobactin production. *Cell*, 141 (6):1006-1017.

- 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.
- Ding L, Hanawa H, Ota Y, Hasegawa G, Hao K, Asami F, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Ogura M, Kodama M, Aizawa Y. 2010. Lipocalin-2/neutrophil gelatinase-B associated lipocalin is strongly induced in hearts of rats with autoimmune myocarditis and in human myocarditis. *Circ J*, 74 (3):523-530.
- Doi K. 2016. Role of kidney injury in sepsis. *J Intensive Care*, 4:17.
- Fleige S, Pfaffl MW. 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*, 27 (2-3):126-139.
- Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A. 2004. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*, 432 (7019):917-921.
- Flower DR. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 318 (Pt 1):1-14.
- Fuchs M, Sanyal AJ. 2008. Sepsis and cholestasis. *Clin Liver Dis*, 12 (1):151-172, ix.
- Ganz T, Nemeth E. 2015. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15 (8):500-510.
- Garay-Rojas E, Harper M, Hraba-Renevey S, Kress M. 1996. An apparent autocrine mechanism amplifies the dexamethasone- and retinoic acid-induced expression of mouse lipocalin-encoding gene 24p3. *Gene*, 170 (2):173-180.
- Gingrich J. 2008. Effect of RNA degradation on data quality in quantitative PCR and microarray experiments. *Bio-Rad Bulletin* 5452.
- Goetz DH, Willie ST, Armen RS, Bratt T, Borregaard N, Strong RK. 2000. Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Biochemistry*, 39 (8):1935-1941.
- Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. 2002. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell*, 10 (5):1033-1043.
- Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, Kellum JA. 2014. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. *Shock*, 41 (1):3-11.
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Losche W, Claus RA, Bauer M. 2011. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res*, 170 (1):e123-134.
- Guglani L, Gopal R, Rangel-Moreno J, Junecko BF, Lin Y, Berger T, Mak TW, Alcorn JF, Randall TD, Reinhart TA, Chan YR, Khader SA. 2012. Lipocalin 2 regulates inflammation during pulmonary mycobacterial infections. *PLoS One*, 7 (11):e50052.
- Gupta N, Krasnodembskaya A, Kapetanaki M, Mouded M, Tan X, Serikov V, Matthay MA. 2012. Mesenchymal stem cells enhance survival and bacterial clearance in murine *Escherichia coli* pneumonia. *Thorax*, 67 (6):533-539.
- Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A, Group NM-al. 2009. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*, 54 (6):1012-1024.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186:1-85.

- Han M, Li Y, Liu M, Li Y, Cong B. 2012. Renal neutrophil gelatinase associated lipocalin expression in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in the rat. *BMC Nephrol*, 13:25.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, 117 (3):285-297.
- Hong DY, Kim JW, Paik JH, Jung HM, Baek KJ, Park SO, Lee KR. 2016. Value of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in predicting the mortality of patients with sepsis at the emergency department. *Clin Chim Acta*, 452:177-181.
- Honore PM, Jacobs R, Boer W, Joannes-Boyau O. 2011. Sepsis and AKI: more complex than just a simple question of chicken and egg. *Intensive Care Med*, 37 (2):186-189.
- Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348 (2):138-150.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 13 (12):862-874.
- Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, 3rd, Bland KI, Chaudry IH. 2005. Cecal ligation and puncture. *Shock*, 24 Suppl 1:52-57.
- Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. 1995. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 151 (2 Pt 1):293-301.
- Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N. 2005. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett*, 579 (3):773-777.
- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. 2005. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res*, 33 (6):e56.
- Ince C. 2005. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*, 9 Suppl 4:S13-19.
- Kanda J, Mori K, Kawabata H, Kuwabara T, Mori KP, Imamaki H, Kasahara M, Yokoi H, Mizumoto C, Thoennissen NH, Koeffler HP, Barasch J, Takaori-Kondo A, Mukoyama M, Nakao K. 2015. An AKI biomarker lipocalin 2 in the blood derives from the kidney in renal injury but from neutrophils in normal and infected conditions. *Clin Exp Nephrol*, 19 (1):99-106.
- Kangelaris KN, Prakash A, Liu KD, Aouizerat B, Woodruff PG, Erle DJ, Rogers A, Seeley EJ, Chu J, Liu T, Osterberg-Deiss T, Zhuo H, Matthay MA, Calfee CS. 2015. Increased expression of neutrophil-related genes in patients with early sepsis-induced ARDS. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 308 (11):L1102-1113.
- Karlsen JR, Borregaard N, Cowland JB. 2010. Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin expression by co-stimulation with interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is controlled by I κ B-zeta but neither by C/EBP-beta nor C/EBP-delta. *J Biol Chem*, 285 (19):14088-14100.
- Katagiri D, Doi K, Matsubara T, Negishi K, Hamasaki Y, Nakamura K, Ishii T, Yahagi N, Noiri E. 2013. New biomarker panel of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin and endotoxin activity assay for detecting sepsis in acute kidney injury. *J Crit Care*, 28 (5):564-570.
- Kehrer JP. 2010. Lipocalin-2: pro- or anti-apoptotic? *Cell Biol Toxicol*, 26 (2):83-89.

- Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. 2000. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta*, 1482 (1-2):272-283.
- Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. 1993. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*, 268 (14):10425-10432.
- Kortgen A, Paxian M, Werth M, Recknagel P, Rauchfuss F, Lupp A, Krenn CG, Muller D, Claus RA, Reinhart K, Settmacher U, Bauer M. 2009. Prospective assessment of hepatic function and mechanisms of dysfunction in the critically ill. *Shock*, 32 (4):358-365.
- Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Kusakabe T, Ebihara K, Omata M, Satoh N, Sugawara A, Barasch J, Nakao K. 2009. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int*, 75 (3):285-294.
- Labbus K, Henning M, Borkham-Kamphorst E, Geisler C, Berger T, Mak TW, Knuchel R, Meyer HE, Weiskirchen R, Henkel C. 2013. Proteomic profiling in Lipocalin 2 deficient mice under normal and inflammatory conditions. *J Proteomics*, 78:188-196.
- Lambeck S, Weber M, Gonnert FA, Mrowka R, Bauer M. 2012. Comparison of sepsis-induced transcriptomic changes in a murine model to clinical blood samples identifies common response patterns. *Front Microbiol*, 3:284.
- Langenberg C, Wan L, Egi M, May CN, Bellomo R. 2006. Renal blood flow in experimental septic acute renal failure. *Kidney Int*, 69 (11):1996-2002.
- Langenberg C, Bellomo R, May C, Wan L, Egi M, Morgera S. 2005. Renal blood flow in sepsis. *Crit Care*, 9 (4):R363-374.
- Leelahavanichkul A, Somparn P, Issara-Amphorn J, Eiam-ong S, Avihingsanon Y, Hirankarn N, Srisawat N. 2016. Serum Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) Outperforms Serum Creatinine in Detecting Sepsis-Induced Acute Kidney Injury, Experiments on Bilateral Nephrectomy and Bilateral Ureter Obstruction Mouse Models. *Shock*, 45 (5):570-576.
- Lemm J. 2009. Molekulare Signaturen der Kardiomyopathie nach polymikrobieller Peritonitis in der Maus [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Li D, Yan Sun W, Fu B, Xu A, Wang Y. 2019. Lipocalin-2-The myth of its expression and function. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*.
- Li H, Feng D, Cai Y, Liu Y, Xu M, Xiang X, Zhou Z, Xia Q, Kaplan MJ, Kong X, Gao B. 2018. Hepatocytes and neutrophils cooperatively suppress bacterial infection by differentially regulating lipocalin-2 and neutrophil extracellular traps. *Hepatology*, 68 (4):1604-1620.
- Liu Q, Nilsen-Hamilton M. 1995. Identification of a new acute phase protein. *J Biol Chem*, 270 (38):22565-22570.
- Liu Z, Petersen R, Devireddy L. 2013. Impaired neutrophil function in 24p3 null mice contributes to enhanced susceptibility to bacterial infections. *J Immunol*, 190 (9):4692-4706.
- Liu Z, Yang A, Wang Z, Bunting KD, Davuluri G, Green MR, Devireddy LR. 2011. Multiple apoptotic defects in hematopoietic cells from mice lacking lipocalin 24p3. *J Biol Chem*, 286 (23):20606-20614.
- 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.

- Lu F, Inoue K, Kato J, Minamishima S, Morisaki H. 2019a. Functions and regulation of lipocalin-2 in gut-origin sepsis: a narrative review. *Crit Care*, 23 (1):269.
- Lu J, Lin L, Ye C, Tao Q, Cui M, Zheng S, Zhu D, Liu L, Xue Y. 2019b. Serum NGAL Is Superior to Cystatin C in Predicting the Prognosis of Acute-on-Chronic Liver Failure. *Ann Hepatol*, 18 (1):155-164.
- Macdonald SPJ, Bosio E, Neil C, Arendts G, Burrows S, Smart L, Brown SGA, Fatovich DM. 2017. Resistin and NGAL are associated with inflammatory response, endothelial activation and clinical outcomes in sepsis. *Inflamm Res*, 66 (7):611-619.
- Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Huser N, Holzmann B, Stier A, Pfeffer K, Heidecke CD. 2004. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock*, 21 (6):505-511.
- Maniatis NA, Kotanidou A, Catravas JD, Orfanos SE. 2008. Endothelial pathomechanisms in acute lung injury. *Vascul Pharmacol*, 49 (4-6):119-133.
- Martensson J, Bell M, Oldner A, Xu S, Venge P, Martling CR. 2010. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in adult septic patients with and without acute kidney injury. *Intensive Care Med*, 36 (8):1333-1340.
- Martensson J, Bell M, Xu S, Bottai M, Ravn B, Venge P, Martling CR. 2013. Association of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) with sepsis and acute kidney dysfunction. *Biomarkers*, 18 (4):349-356.
- Martin G, Brunkhorst FM, Janes JM, Reinhart K, Sundin DP, Garnett K, Beale R. 2009. The international PROGRESS registry of patients with severe sepsis: drotrecogin alfa (activated) use and patient outcomes. *Crit Care*, 13 (3):R103.
- Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP. 2012. Disease tolerance as a defense strategy. *Science*, 335 (6071):936-941.
- Meheus LA, Franssen LM, Raymackers JG, Blockx HA, Van Beeumen JJ, Van Bun SM, Van de Voorde A. 1993. Identification by microsequencing of lipopolysaccharide-induced proteins secreted by mouse macrophages. *J Immunol*, 151 (3):1535-1547.
- Miethke M, Marahiel MA. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71 (3):413-451.
- Miethke M, Skerra A. 2010. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin expresses antimicrobial activity by interfering with L-norepinephrine-mediated bacterial iron acquisition. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (4):1580-1589.
- Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. 2003. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*, 14 (10):2534-2543.
- Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Yang J, Mitsnefes M, Barasch J, Devarajan P. 2004. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*, 15 (12):3073-3082.
- Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, Schmidt-Ott KM, Chen X, Li JY, Weiss S, Mishra J, Cheema FH, Markowitz G, Suganami T, Sawai K, Mukoyama M, Kunis C, D'Agati V, Devarajan P, Barasch J. 2005. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*, 115 (3):610-621.
- Nairz M, Theurl I, Schroll A, Theurl M, Fritsche G, Lindner E, Seifert M, Crouch ML, Hantke K, Akira S, Fang FC, Weiss G. 2009. Absence of functional Hfe protects mice from invasive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection via induction of lipocalin-2. *Blood*, 114 (17):3642-3651.

- Nairz M, Schroll A, Haschka D, Dichtl S, Sonnweber T, Theurl I, Theurl M, Lindner E, Demetz E, Asshoff M, Bellmann-Weiler R, Muller R, Gerner RR, Moschen AR, Baumgartner N, Moser PL, Talasz H, Tilg H, Fang FC, Weiss G. 2015. Lipocalin-2 ensures host defense against *Salmonella Typhimurium* by controlling macrophage iron homeostasis and immune response. *Eur J Immunol*, 45 (11):3073-3086.
- Nasioudis D, Witkin SS. 2015. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and innate immune responses to bacterial infections. *Med Microbiol Immunol*, 204 (4):471-479.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. 2004. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306 (5704):2090-2093.
- Nesslerer N, Launey Y, Aninat C, Morel F, Malledant Y, Seguin P. 2012. Clinical review: The liver in sepsis. *Crit Care*, 16 (5):235.
- Newman JH. 1985. Sepsis and pulmonary edema. *Clin Chest Med*, 6 (3):371-391.
- Otto GP, Busch M, Sossdorf M, Claus RA. 2013. Impact of sepsis-associated cytokine storm on plasma NGAL during acute kidney injury in a model of polymicrobial sepsis. *Crit Care*, 17 (2):419.
- Otto GP, Hurtado-Oliveros J, Chung HY, Knoll K, Neumann T, Muller HJ, Herbsleb M, Kohl M, Busch M, Sossdorf M, Claus RA. 2015. Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is Primarily Related to Inflammation during Sepsis: A Translational Approach. *PLoS One*, 10 (4):e0124429.
- Paragas N, Qiu A, Hollmen M, Nickolas TL, Devarajan P, Barasch J. 2012. NGAL-Siderocalin in kidney disease. *Biochim Biophys Acta*, 1823 (9):1451-1458.
- Paragas N, Qiu A, Zhang Q, Samstein B, Deng SX, Schmidt-Ott KM, Viltard M, Yu W, Forster CS, Gong G, Liu Y, Kulkarni R, Mori K, Kalandadze A, Ratner AJ, Devarajan P, Landry DW, D'Agati V, Lin CS, Barasch J. 2011. The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time. *Nat Med*, 17 (2):216-222.
- Paragas N, Kulkarni R, Werth M, Schmidt-Ott KM, Forster C, Deng R, Zhang Q, Singer E, Klose AD, Shen TH, Francis KP, Ray S, Vijayakumar S, Seward S, Bovino ME, Xu K, Takabe Y, Amaral FE, Mohan S, Wax R, Corbin K, Sanna-Cherchi S, Mori K, Johnson L, Nickolas T, D'Agati V, Lin CS, Qiu A, Al-Awqati Q, Ratner AJ, Barasch J. 2014. alpha-Intercalated cells defend the urinary system from bacterial infection. *J Clin Invest*, 124 (7):2963-2976.
- Parker SJ, Watkins PE. 2001. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg*, 88 (1):22-30.
- Perez S, Royo LJ, Astudillo A, Escudero D, Alvarez F, Rodriguez A, Gomez E, Otero J. 2007. Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors. *BMC Mol Biol*, 8:114.
- Perl M, Lomas-Neira J, Venet F, Chung CS, Ayala A. 2011. Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury. *Expert Rev Respir Med*, 5 (1):115-126.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Poukkanen M, Vaara ST, Pettila V, Kaukonen KM, Korhonen AM, Hovilehto S, Inkinen O, Laru-Sompa R, Kaminski T, Reinikainen M, Lund V, Karlsson S, group Fs. 2013. Acute kidney injury in patients with severe sepsis in Finnish Intensive Care Units. *Acta Anaesthesiol Scand*, 57 (7):863-872.
- Recknagel P, Gonnert FA, Halilbasic E, Gajda M, Jbeily N, Lupp A, Rubio I, Claus RA, Kortgen A, Trauner M, Singer M, Bauer M. 2013. Mechanisms and

- functional consequences of liver failure substantially differ between endotoxaemia and faecal peritonitis in rats. *Liver Int*, 33 (2):283-293.
- Recknagel P, Gonnert FA, Westermann M, Lambeck S, Lupp A, Rudiger A, Dyson A, Carre JE, Kortgen A, Krafft C, Popp J, Sponholz C, Fuhrmann V, Hilger I, Claus RA, Riedemann NC, Wetzker R, Singer M, Trauner M, Bauer M. 2012. Liver dysfunction and phosphatidylinositol-3-kinase signalling in early sepsis: experimental studies in rodent models of peritonitis. *PLoS Med*, 9 (11):e1001338.
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Grundling M, John S, Kern W, Kreyman G, Kruger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stuber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T, German Sepsis S, German Interdisciplinary Association of Intensive C, Emergency M. 2010. Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). *Ger Med Sci*, 8:Doc14.
- Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. 2000. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*, 13 (2):110-116.
- Repepe X, Charron C, Vieillard-Baron A. 2013. Evaluation of left ventricular systolic function revisited in septic shock. *Crit Care*, 17 (4):164.
- Rosen S, Heyman SN. 2001. Difficulties in understanding human "acute tubular necrosis": limited data and flawed animal models. *Kidney Int*, 60 (4):1220-1224.
- Rudiger A, Singer M. 2007. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med*, 35 (6):1599-1608.
- Ryon J, Bendickson L, Nilsen-Hamilton M. 2002. High expression in involuting reproductive tissues of uterocalin/24p3, a lipocalin and acute phase protein. *Biochem J*, 367 (Pt 1):271-277.
- Ryu SY, Jeong KS, Kang BN, Park SJ, Yoon WK, Kim SH, Kim TH. 2000. Modulation of transferrin synthesis, transferrin receptor expression, iNOS expression and NO production in mouse macrophages by cytokines, either alone or in combination. *Anticancer Res*, 20 (5A):3331-3338.
- Saiga H, Nishimura J, Kuwata H, Okuyama M, Matsumoto S, Sato S, Matsumoto M, Akira S, Yoshikai Y, Honda K, Yamamoto M, Takeda K. 2008. Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J Immunol*, 181 (12):8521-8527.
- Sancho-Martinez SM, Blanco-Gozalo V, Quiros Y, Prieto-Garcia L, Montero-Gomez MJ, Docherty NG, Martinez-Salgado C, Morales AI, Lopez-Novoa JM, Lopez-Hernandez FJ. 2020. Impaired tubular reabsorption is the main mechanism explaining increases in urinary NGAL excretion following acute kidney injury in rats. *Toxicol Sci*.
- Sato T, Kamiyama Y, Jones RT, Cowley RA, Trump BF. 1978. Ultrastructural study on kidney cell injury following various types of shock in 26 immediate autopsy patients. *Adv Shock Res*, 1:55-69.
- Schaarschmidt B, Vlaic S, Medyukhina A, Neugebauer S, Nietzsche S, Gonnert FA, Rodel J, Singer M, Kiehntopf M, Figge MT, Jacobsen ID, Bauer M, Press AT.

2018. Molecular signatures of liver dysfunction are distinct in fungal and bacterial infections in mice. *Theranostics*, 8 (14):3766-3780.
- Schaible UE, Kaufmann SH. 2004. Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol*, 2 (12):946-953.
- Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, Barasch J. 2007. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*, 18 (2):407-413.
- Schmidt-Ott KM, Mori K, Kalandadze A, Li JY, Paragas N, Nicholas T, Devarajan P, Barasch J. 2006. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 15 (4):442-449.
- Sharp C, Millar AB, Medford AR. 2015. Advances in understanding of the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Respiration*, 89 (5):420-434.
- Siegenthaler WB, H.E. 2006. *Klinische Pathophysiologie*.940.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315 (8):801-810.
- Soares MP, Weiss G. 2015. The Iron age of host-microbe interactions. *EMBO Rep*, 16 (11):1482-1500.
- Sossdorf M, Fischer J, Meyer S, Dahlke K, Wissuwa B, Seidel C, Schrepper A, Bockmeyer CL, Lupp A, Neugebauer S, Schmerler D, Rodel J, Claus RA, Otto GP. 2013. Physical exercise induces specific adaptations resulting in reduced organ injury and mortality during severe polymicrobial sepsis. *Crit Care Med*, 41 (10):e246-255.
- Srinivasan G, Aitken JD, Zhang B, Carvalho FA, Chassaing B, Shashidharamurthy R, Borregaard N, Jones DP, Gewirtz AT, Vijay-Kumar M. 2012. Lipocalin 2 deficiency dysregulates iron homeostasis and exacerbates endotoxin-induced sepsis. *J Immunol*, 189 (4):1911-1919.
- 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.
- Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. 2011. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol*, 6:19-48.
- Sultan S, Pascucci M, Ahmad S, Malik IA, Bianchi A, Ramadori P, Ahmad G, Ramadori G. 2012. LIPOCALIN-2 is a major acute-phase protein in a rat and mouse model of sterile abscess. *Shock*, 37 (2):191-196.
- Sunil VR, Patel KJ, Nilsen-Hamilton M, Heck DE, Laskin JD, Laskin DL. 2007. Acute endotoxemia is associated with upregulation of lipocalin 24p3/Lcn2 in lung and liver. *Exp Mol Pathol*, 83 (2):177-187.
- Tacke F, Nuraldeen R, Koch A, Strathmann K, Hutschenreuter G, Trautwein C, Strnad P. 2016. Iron Parameters Determine the Prognosis of Critically Ill Patients. *Crit Care Med*, 44 (6):1049-1058.
- Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, To K, Fagley RE, Sato B, Jarman S, Efimov IR, Janks DL, Srivastava A, Bhayani SB, Drewry A, Swanson PE, Hotchkiss RS. 2013. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 187 (5):509-517.
- Torti FM, Torti SV. 2002. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, 99 (10):3505-3516.

- Tsuji Y, Moran E, Torti SV, Torti FM. 1999. Transcriptional regulation of the mouse ferritin H gene. Involvement of p300/CBP adaptor proteins in FER-1 enhancer activity. *J Biol Chem*, 274 (11):7501-7507.
- Tsushima K, King LS, Aggarwal NR, De Gorordo A, D'Alessio FR, Kubo K. 2009. Acute lung injury review. *Intern Med*, 48 (9):621-630.
- Tsutsui H, Matsui K, Kawada N, Hyodo Y, Hayashi N, Okamura H, Higashino K, Nakanishi K. 1997. IL-18 accounts for both TNF-alpha- and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. *J Immunol*, 159 (8):3961-3967.
- Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Ronco C, Beginning, Ending Supportive Therapy for the Kidney I. 2005. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*, 294 (7):813-818.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7):RESEARCH0034.
- Vary TC, Kimball SR. 1992. Regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation and sepsis. *Am J Physiol*, 262 (2 Pt 1):C445-452.
- Vazquez DE, Nino DF, De Maio A, Cauvi DM. 2015. Sustained expression of lipocalin-2 during polymicrobial sepsis. *Innate Immun*, 21 (5):477-489.
- Vieillard-Baron A. 2011. Septic cardiomyopathy. *Ann Intensive Care*, 1 (1):6.
- Vinuesa E, Sola A, Jung M, Alfaro V, Hotter G. 2008. Lipocalin-2-induced renal regeneration depends on cytokines. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295 (5):F1554-1562.
- Wald R, McArthur E, Adhikari NK, Bagshaw SM, Burns KE, Garg AX, Harel Z, Kitchlu A, Mazer CD, Nash DM, Scales DC, Silver SA, Ray JG, Friedrich JO. 2015. Changing incidence and outcomes following dialysis-requiring acute kidney injury among critically ill adults: a population-based cohort study. *Am J Kidney Dis*, 65 (6):870-877.
- Wang B, Chen G, Li J, Zeng Y, Wu Y, Yan X. 2017. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts myocardial dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *Int J Cardiol*, 227:589-594.
- Wang Q, Li S, Tang X, Liang L, Wang F, Du H. 2019. Lipocalin 2 Protects Against Escherichia coli Infection by Modulating Neutrophil and Macrophage Function. *Front Immunol*, 10:2594.
- Wang Z, Holthoff JH, Seely KA, Pathak E, Spencer HJ, 3rd, Gokden N, Mayeux PR. 2012. Development of oxidative stress in the peritubular capillary microenvironment mediates sepsis-induced renal microcirculatory failure and acute kidney injury. *Am J Pathol*, 180 (2):505-516.
- Warszawska JM, Gawish R, Sharif O, Sigel S, Doninger B, Lakovits K, Mesteri I, Nairz M, Boon L, Spiel A, Fuhrmann V, Strobl B, Muller M, Schenk P, Weiss G, Knapp S. 2013. Lipocalin 2 deactivates macrophages and worsens pneumococcal pneumonia outcomes. *J Clin Invest*, 123 (8):3363-3372.
- Weber M. 2010. Transkriptomik der Inflammation an der Maus: die Lunge als Ausgangsorgan und als Zielorgan der Sepsis.
- Weber M, Lambeck S, Ding N, Henken S, Kohl M, Deigner HP, Enot DP, Igwe EI, Frappart L, Kiehntopf M, Claus RA, Kamradt T, Weih D, Vodovotz Y, Briles DE, Ogunniyi AD, Paton JC, Maus UA, Bauer M. 2012. Hepatic induction of cholesterol biosynthesis reflects a remote adaptive response to pneumococcal pneumonia. *FASEB J*, 26 (6):2424-2436.

- Weis S, Carlos AR, Moita MR, Singh S, Blankenhaus B, Cardoso S, Larsen R, Rebelo S, Schauble S, Del Barrio L, Mithieux G, Rajas F, Lindig S, Bauer M, Soares MP. 2017. Metabolic Adaptation Establishes Disease Tolerance to Sepsis. *Cell*, 169 (7):1263-1275 e1214.
- Wu H, Santoni-Rugiu E, Ralfkiaer E, Porse BT, Moser C, Hoiby N, Borregaard N, Cowland JB. 2010. Lipocalin 2 is protective against *E. coli* pneumonia. *Respir Res*, 11:96.
- Wu L, Gokden N, Mayeux PR. 2007. Evidence for the role of reactive nitrogen species in polymicrobial sepsis-induced renal peritubular capillary dysfunction and tubular injury. *J Am Soc Nephrol*, 18 (6):1807-1815.
- Xiao X, Yeoh BS, Vijay-Kumar M. 2017. Lipocalin 2: An Emerging Player in Iron Homeostasis and Inflammation. *Annu Rev Nutr*, 37:103-130.
- Xiao X, Yeoh BS, Saha P, Olvera RA, Singh V, Vijay-Kumar M. 2016. Lipocalin 2 alleviates iron toxicity by facilitating hypoferrremia of inflammation and limiting catalytic iron generation. *Biometals*, 29 (3):451-465.
- Xu G, Ahn J, Chang S, Eguchi M, Ogier A, Han S, Park Y, Shim C, Jang Y, Yang B, Xu A, Wang Y, Sweeney G. 2012. Lipocalin-2 induces cardiomyocyte apoptosis by increasing intracellular iron accumulation. *J Biol Chem*, 287 (7):4808-4817.
- Xu MJ, Feng D, Wu H, Wang H, Chan Y, Kolls J, Borregaard N, Porse B, Berger T, Mak TW, Cowland JB, Kong X, Gao B. 2015. Liver is the major source of elevated serum lipocalin-2 levels after bacterial infection or partial hepatectomy: a critical role for IL-6/STAT3. *Hepatology*, 61 (2):692-702.
- Yang J, Moses MA. 2009. Lipocalin 2: a multifaceted modulator of human cancer. *Cell Cycle*, 8 (15):2347-2352.
- Yang J, Goetz D, Li JY, Wang W, Mori K, Setlik D, Du T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Strong R, Barasch J. 2002. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*, 10 (5):1045-1056.
- Yndestad A, Landro L, Ueland T, Dahl CP, Flo TH, Vinge LE, Espevik T, Froland SS, Husberg C, Christensen G, Dickstein K, Kjekshus J, Oie E, Gullestad L, Aukrust P. 2009. Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur Heart J*, 30 (10):1229-1236.
- Yuan JS, Wang D, Stewart CN, Jr. 2008. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. *Biotechnol J*, 3 (1):112-123.
- Zang X, Zheng F, Hong HJ, Jiang Y, Song Y, Xia Y. 2014. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin protects renal tubular epithelial cells in hypoxia-reperfusion by reducing apoptosis. *Int Urol Nephrol*, 46 (8):1673-1679.
- Zarbock A, Gomez H, Kellum JA. 2014. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Curr Opin Crit Care*, 20 (6):588-595.
- Zarjou A, Bolisetty S, Joseph R, Traylor A, Apostolov EO, Arosio P, Balla J, Verlander J, Darshan D, Kuhn LC, Agarwal A. 2013. Proximal tubule H-ferritin mediates iron trafficking in acute kidney injury. *J Clin Invest*, 123 (10):4423-4434.
- Zeng G, Jia CW, Liu J, Guo SB. 2014. Lipocalin-2 test in distinguishing acute lung injury cases from septic mice without acute lung injury. *Chin Med Sci J*, 29 (2):65-77.
- Zhang A, Cai Y, Wang PF, Qu JN, Luo ZC, Chen XD, Huang B, Liu Y, Huang WQ, Wu J, Yin YH. 2016. Diagnosis and prognosis of neutrophil gelatinase-

associated lipocalin for acute kidney injury with sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*, 20 (1):41.

7 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn apl. Prof. Dr. Ralf A. Claus für die Hilfe bei der Manuskripterstellung, die trotz zwischenzeitlicher Erschwernisse und Ortswechsel fortgeführt werden konnte.

Weiterhin danke ich Frau Dr. med. Martina Weber und Frau Dipl.-Biol. Jana Lemm für die Überlassung des Probenmaterials sowie die Unterstützung und Anleitung zu Beginn der Arbeit im Labor.

Ich danke außerdem den Mitarbeitern der AG experimentelle Anästhesie des Uniklinikums Jena für die gute Zusammenarbeit, insbesondere möchte ich Frau Birgit Specht für die Erstellung der Schnittpräparate und der immunhistochemischen Färbungen danken.

Weiterer Dank gebührt darüber hinaus Herrn PD Dr. med. Clemens Bockmeyer für die Hilfe bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.

Besonders möchte ich mich bei meiner Frau für die Geduld und Unterstützung in der gesamten Zeit der Erstellung der Arbeit danken.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich immer uneingeschränkt unterstützt haben und mir das Medizinstudium ermöglichten.

8 Ehrenwörtliche Erklärung

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

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

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

apl. Prof. Dr. Ralf A. Claus bei der Projektplanung und Dateninterpretation;

Dr. med. Martina Weber bei der Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen und Probenasservierung;

PD Dr. med. Clemens Bockmeyer bei der Durchführung immunhistochemischer Analysen und deren Interpretation;

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

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

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

Stuttgart, den 03.11.2021

Daniel Seibold