

Aus der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten
am Zentrum für Innere Medizin II der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

**Endothelzellapoptose bei Malaria und Sepsis: in-vitro-
Untersuchungen zu ähnlichen Pathomechanismen der
Endothelzellapoptose**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von
Anna Miriam Vogt
geboren in Starnberg

Rostock 2013

Dekan	Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger
1. Gutachter	PD Dr. med. habil. Christoph J. Hemmer Zentrum für Innere Medizin II Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten und Sektion Nephrologie Ernst-Heydemann-Str. 6 18057 Rostock
2. Gutachter	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Brigitte M. Pützer Universitätsmedizin Rostock Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung Biomedizinisches Forschungszentrum (BMFZ) Schillingallee 69 18055 Rostock
3. Gutachter	Prof. Dr. med. Frank T. Hufert Universitätsmedizin Göttingen Abteilung Virologie Kreuzberggring 57 37075 Göttingen

Verteidigt am 30.07.2014

Meinen Eltern gewidmet

A Inhaltsverzeichnis

A Inhaltsverzeichnis.....	IV
B Abkürzungsverzeichnis	VIII
C Abbildungsverzeichnis	X
D Tabellenverzeichnis	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Malaria.....	1
1.1.1 Epidemiologie der Malaria	1
1.1.2 Erreger der Malaria.....	2
1.1.3 Entwicklungszyklus der <i>Plasmodien</i>	2
1.1.4 Klinisches Bild und Komplikationen bei Malaria-Infektionen.....	4
1.2 Sepsis.....	6
1.2.1 Epidemiologie der Sepsis	6
1.2.2 Definition und Ätiologie von Sepsis	6
1.2.3 Klinisches Bild und Komplikationen bei Sepsis-Infektionen.....	7
1.3 Physiologie und Pathophysiologie des Gefäßendothels.....	10
1.4 Mechanismen der Apoptose.....	12
1.5 Pathophysiologie der Malaria	13
1.5.1 Veränderung der Erythrozyten.....	13
1.5.2 Immunantwort des Wirtes	14
1.5.3 Rolle des Endothels bei Malaria	15
1.5.4 Rolle der neutrophilen Granulozyten bei Malaria.....	16
1.5.5 Endothelzellapoptose als Pathomechanismus der Malaria.....	17
1.6 Pathophysiologie der Sepsis	17
1.6.1 Mechanismen der Sepsis	17
1.6.2 Rolle des Endothels und der Neutrophilen bei Sepsis.....	19

1.6.3 Endothelzellapoptose als Pathomechanismus bei Sepsis	20
1.7 Fragestellung.....	20
2 Patienten, Materialien und Methoden	22
2.1 Patienten	22
2.2 Gewinnung der Seren von Patienten und Probanden	22
2.3 Kulturüberstände	23
2.3.1 Kulturüberstände von <i>Plasmodium falciparum</i>	23
2.3.2 Kulturüberstände von <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Escherichia coli</i>	23
2.4 Endothelzellkultur (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)	23
2.5 Isolation von Neutrophilen	24
2.6 Experimente	25
2.6.1 Hemmversuche	26
2.6.2 Einfluss des direkten Kontaktes von Neutrophilen und Endothelzellen	26
2.6.3 Rolle von LFA-1 (CD11b) und ICAM-1 (CD54).....	27
2.7 Färbung der Endothelzellen zum Nachweis von Apoptose.....	28
2.8 Auswertung.....	30
3 Ergebnisse	31
3.1 Inkubation von HUVEC mit Patienten- oder Kontrollserum mit und ohne neutrophile Granulozyten	31
3.1.1 Inkubation von HUVEC mit Patienten- oder Kontrollserum.....	31
3.1.2 Rolle der neutrophilen Granulozyten	32
3.2 Inkubation von HUVEC mit Kulturüberständen von <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Escherichia coli</i> und <i>Staphylococcus aureus</i> in An- und Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten	33
3.2.1 Inkubation von HUVEC mit Kulturüberständen.....	33

3.2.2	Rolle der neutrophilen Granulozyten	34
3.3	Einfluss von Ascorbinsäure und Ulinastatin auf die Apoptoserate von HUVEC bei Inkubation mit Patientenseren und Neutrophilen.....	35
3.4	Einfluss von Ascorbinsäure und Ulinastatin auf die Apoptoserate von HUVEC bei Inkubation mit Kulturüberständen der Krankheitserreger und Neutrophilen.....	37
3.5	Einfluss von anti-LFA-1-Antikörpern auf die Endothelzellapoptose.....	38
3.6	Verwendung von Siebeinsätzen	40
3.7	Einfluss von Anti-ICAM-1-Antikörpern auf die Endothelzellapoptose.....	41
4	Diskussion	45
4.1	Diskussion der Methodik.....	45
4.1.1	Gewinnung und Kultur von Endothelzellen	45
4.1.2	Kulturüberstände von <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> ...	45
4.1.3	Isolation von neutrophilen Granulozyten.....	45
4.1.4	Nachweis der Apoptose durch die TUNEL-Färbung.....	46
4.2	Neutrophilenvermittelte Endothelschädigung bei Malaria und Sepsis	47
4.2.1	Endothelzellapoptose bei Malaria und Sepsis	47
4.2.2	Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Endothelzellapoptose	48
4.3	Wirkung der Hemmstoffe Ascorbinsäure und Ulinastatin auf die neutrophilenvermittelte Endothelzellapoptose.....	50
4.3.1	Wirkung der Hemmstoffe Ascorbinsäure und Ulinastatin auf die neutrophilenvermittelte Endothelzellapoptose bei Inkubation der HUVEC mit Seren von Malaria-tropica- und Sepsis-Patienten	50

4.3.2 Wirkung der Hemmstoffe Ascorbinsäure und Ulinastatin auf die neutrophilenvermittelte Endothelzellapoptose bei Inkubation der HUVEC mit Überständen von <i>P. falciparum</i> , <i>S. aureus</i> und <i>E. coli</i>	51
4.4 Bedeutung des direkten Kontaktes von Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten über deren Rezeptoren ICAM-1 und LFA-1	52
4.5 Fazit und Ausblick	54
5 Zusammenfassung	55
6 Anhang	XII
6.1 Literaturverzeichnis	XII
6.2 Materialien	XXX
6.3 Thesen.....	XXXVII
6.4 Eidesstattliche Versicherung	XL
6.5 Lebenslauf	XLI
6.6 Publikationen	XLII
6.7 Danksagung	XLIII

B Abkürzungsverzeichnis

WHO	World Health Organisation
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
SOFA-Score	Sepsis-related Organ Failure Score
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
FiO ₂	fraction of inspired oxygen
ZNS	Zentrales Nervensystem
IL	Interleukin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
ELAM-1	Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
LFA-1	Leukocyte Function Antigen 1 / lymphocyte function-associated antigen 1
DNA	Desoxyribonucleinsäure
PfEMP1	<i>Plasmodium-falciparum</i> -erythrocyte-membrane-protein-1
HNE	Humane Neutrophilen Elastase
TM	Thrombomodulin
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure
TLR	Toll-like-Rezeptor
ROS	reaktive Sauerstoffspezies / Sauerstoffradikale
HUVEC	Human Umbilical Endothelial Cells
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylokokkus aureus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
TUNEL	TdT – mediated deoxyuridinetriphosphat [dUTP] nick end labeling
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
FITC	Fluorescein-Isocyanat
UTP	Uridintriphosphat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)

BSA	Bovine Serum Albumin
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
ISNT	in situ nick translation

C Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Geographische Verbreitung der Malaria	1
Abbildung 2:	Entwicklungszyklus der <i>Plasmodien</i>	4
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	27
Abbildung 4:	Darstellung apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Färbung (Hemmer, Lehr et al. 2005)	30
Abbildung 5:	Apoptoserate der Endothelzellen nach Inkubation mit Seren von Patienten- oder gesunden Kontrollpersonen	31
Abbildung 6:	Apoptoserate der Endothelzellen nach Inkubation mit Patientenseren in An- und Abwesenheit von Neutrophilen	32
Abbildung 7:	Apoptoserate der Endothelzellen nach Inkubation mit Kulturüberständen	33
Abbildung 8:	Apoptoserate der Endothelzellen nach Inkubation mit Kulturüberständen in An- und Abwesenheit von Neutrophilen	34
Abbildung 9:	Dosisabhängiger Einfluss von Ascorbinsäure auf die Apoptoseinduktion durch Patientenseren und Neutrophile	35
Abbildung 10:	Dosisabhängiger Einfluss von Ulinastatin auf die Apoptoseinduktion durch Patientenseren und Neutrophile	36
Abbildung 11:	Einfluss von Ascorbinsäure bzw. Ulinastatin auf die Wirkung von Neutrophilen hinsichtlich der Apoptoserate der Endothelzellen bei Inkubation mit Kulturüberständen	37
Abbildung 12:	Einfluss von anti-LFA-1-AK auf die apoptoseverstärkende Wirkung von Neutrophilen bei Inkubation der Endothelzellen mit <i>P. falciparum</i> - Serum oder - Überständen	38
Abbildung 13:	Einfluss von anti-LFA-1-AK auf die apoptoseverstärkende Wirkung von Neutrophilen bei Inkubation der Endothelzellen mit <i>E. coli</i> – Serum oder - Überständen	39
Abbildung 14:	Einfluss von anti-LFA-1-AK auf die apoptoseverstärkende Wirkung von Neutrophilen bei Inkubation der Endothelzellen mit <i>S. aureus</i> - Serum oder – Überständen	39
Abbildung 15:	Einfluss von Siebeinsätzen auf die apoptoseverstärkende Wirkung von Neutrophilen bei der Inkubation der Endothelzellen mit Patientenseren	40
Abbildung 16:	Einfluss von Siebeinsätzen auf die apoptoseverstärkende Wirkung von Neutrophilen bei der Inkubation der Endothelzellen mit Kulturüberständen	41
Abbildung 17:	Inkubation der Endothelzellen mit Patientenseren und Neutrophilen: Aufhebung der apoptosevermindernden Wirkung der Siebeinsätze durch Anti-ICAM-1-AK	44

Abbildung 18: Inkubation der Endothelzellen mit Kulturüberständen und Neutrophilen: Aufhebung der apoptosevermindernden Wirkung von Siebeinsätzen durch Anti-ICAM-1-AK	44
--	----

D Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definitionstabelle des SOFA-Scores nach www.marsdialyse.de/lebererkrankungen/scores/sofa.htm und (Hantke, Holzer et al. 2000)	9
Tabelle 2: Apoptoserate der Endothelzellen nach Inkubation mit Kulturüberständen	33
Tabelle 3: Apoptoserate der Endothelzellen nach Inkubation mit Kulturüberständen in An- und Abwesenheit von Neutrophilen	34
Tabelle 4: Dosisabhängiger Einfluss von Ascorbinsäure auf die Apoptoseinduktion durch Patientenserum und Neutrophile	35
Tabelle 5: Dosisabhängiger Einfluss von Ulinastatin auf die Apoptoseinduktion durch Patientenserum und Neutrophile	36
Tabelle 6: Einfluss von Ascorbinsäure bzw. Ulinastatin auf die Wirkung von Neutrophilen hinsichtlich der Apoptoserate der Endothelzellen bei Inkubation mit Kulturüberständen	37
Tabelle 7: Apoptoseraten der Endothelzellen in Ab- und Anwesenheit von Anti-ICAM-1-AK in Gegenwart von Neutrophilen	42
Tabelle 8: Inkubation mit Patientenserum: Apoptoseraten der Endothelzellen in An- und Abwesenheit von Anti-ICAM-1-Antikörpern ohne Neutrophile	43
Tabelle 9: Inkubation mit Kulturüberständen: Apoptoseraten der Endothelzellen in An- und Abwesenheit von Anti-ICAM-1-Antikörpern ohne Neutrophile	43

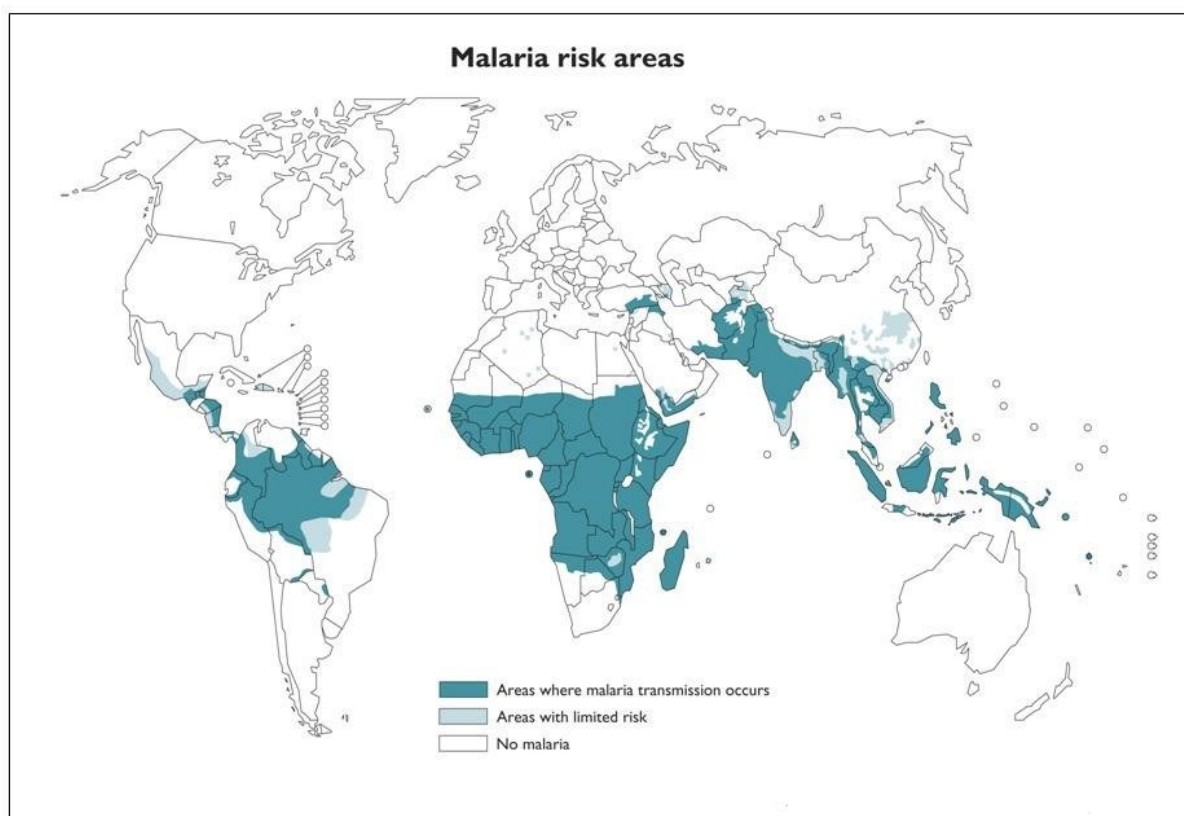
1 Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Epidemiologie der Malaria

Malaria ist die weltweit häufigste parasitäre Infektionskrankheit. Trotz anfänglicher Erfolge von Eradikationsprogrammen nach dem zweiten Weltkrieg ist die Malaria derzeit in den tropischen und subtropischen Gebieten ähnlich verbreitet wie zuvor (siehe Abbildung 1). Im subsaharischen Afrika überwiegt *Plasmodium falciparum* deutlich gegenüber allen anderen Plasmodienarten.

Abbildung 1: Geographische Verbreitung der Malaria



Quelle: <http://www.who.int/mediacentre/events.html>

Die World Health Organisation (WHO) berichtet von einer Inzidenz von etwa 150 bis 280 Millionen Erkrankungen und circa 655 000 Todesfälle pro Jahr. Betroffen sind hiervon vor allem Kinder unter fünf Jahren in Entwicklungsländern. (Siehe World Malaria Report 2011, http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011)

1.1.2 Erreger der Malaria

Malaria wird verursacht durch Protozoen der Gattung *Plasmodium*, die zu der Klasse der Sporozoen gezählt wird. Vier der Plasmodienarten sind humanpathogen und rufen jeweils verschiedene Krankheitsbilder hervor. *Plasmodium malariae* löst die Malaria quartana aus, *Plasmodium vivax* und *ovale* sind Erreger der Malaria tertiana. Der wichtigste und gefährlichste Malariaparasit ist *Plasmodium falciparum*, Verursacher der Malaria tropica, der nahezu allein für die schweren Verlaufsformen der Malaria und ihre Mortalität verantwortlich ist.

1.1.3 Entwicklungszyklus der *Plasmodien*

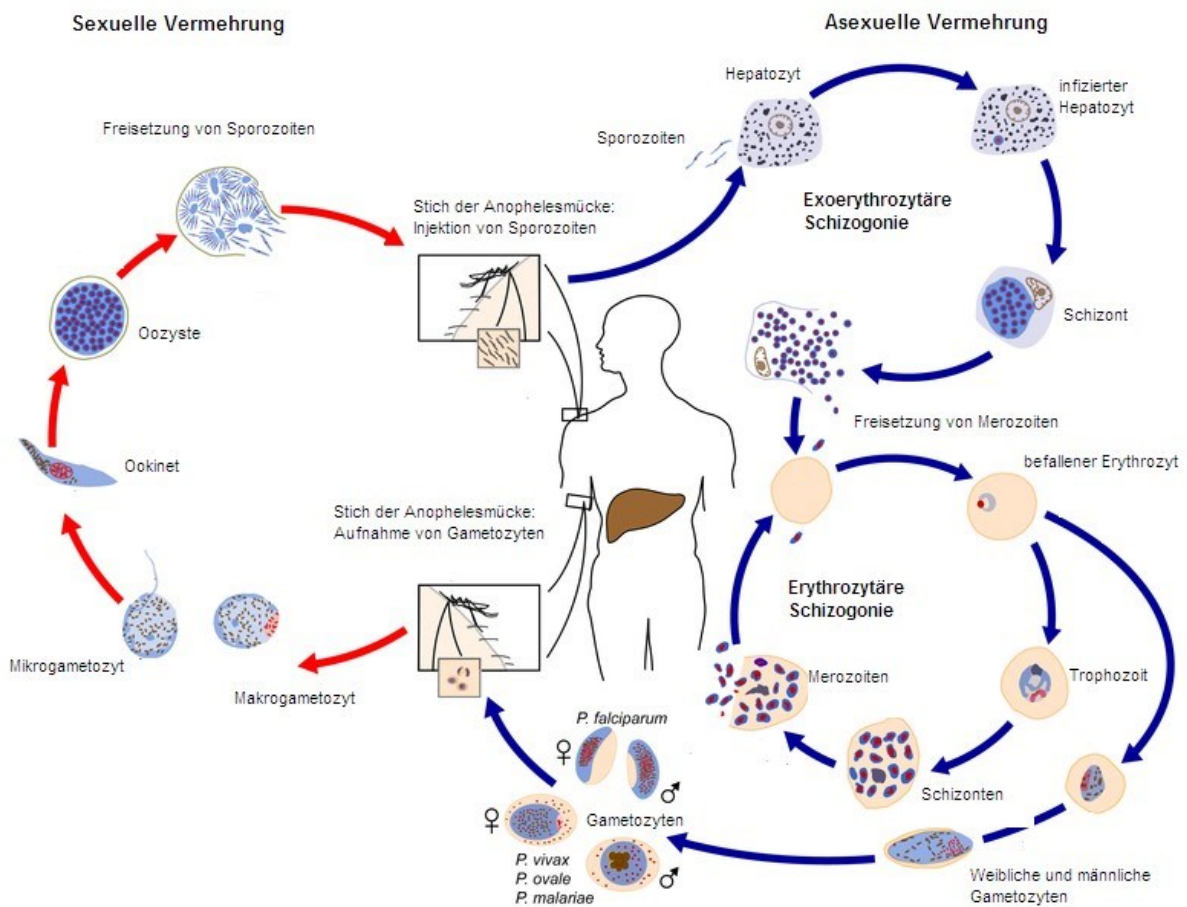
Die Übertragung der Plasmodien von Mensch zu Mensch erfolgt über weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles*. Eine Infektion auf direktem parenteralem Wege durch parasitenhaltiges Blut, z.B. durch Bluttransfusionen, ist möglich, aber selten. Für die Entwicklung der Plasmodien stellt der Mensch den Zwischenwirt dar, in dem ausschließlich die asexuelle Vermehrung erfolgt. Hauptwirt ist die *Anopheles*mücke, in der die sexuelle Vermehrung des Erregers stattfindet.

Mit der Blutmahlzeit nimmt die Mücke von malariainfizierten Menschen weibliche und männliche Gametozyten auf, die sich zu Gameten entwickeln. Die männlichen Gameten entwickeln Geißeln, befruchten die weiblichen Gameten und es entsteht eine Zygote. Diese nistet sich als Ookinet in der Magenwand der Mücke ein, wird hiernach Oozyste genannt und teilt sich in unzählige Sporozoiten. Diese Sporozoiten gelangen beim nächsten Stich mit dem Speichel der Mücke in den Blutkreislauf des Menschen. In der *Anopheles*mücke entwickeln sich die Malariaparasiten nur, wenn eine Außentemperatur von über 16°C für mindestens drei Wochen nicht unterschritten wird. Die Sporozoiten gelangen über den Blutkreislauf in die Leber,

dringen in Hepatozyten ein und wachsen zu Leberschizonten heran. Diese teilen sich in mehrere Tausend Merozoiten, welche vom untergehenden parasitierten Hepatozyten in den Blutkreislauf freigesetzt werden (exoerythrozytäre Schizogonie). Die Merozoiten befallen Erythrozyten, in denen sie sich weiter zu Trophozoiten und schließlich zu Blutschizonten entwickeln (erythrozytäre Schizogonie). Aus jedem Schizonten bilden sich erneut Merozoiten, welche vom untergehenden Erythrozyten freigesetzt werden und den erythrozytären Vermehrungszyklus fortsetzen. Während der Freisetzung von Merozoiten aus Erythrozyten entstehen Fieberschübe. Nach zwei bis drei solcher Schizogoniezyklen reift ein Teil der Merozoiten zu weiblichen Makrogametozyten und zu männlichen Mikrogametozyten heran, die sich jedoch nur bei Aufnahme durch die weibliche *Anopheles*-mücke weiterentwickeln können. Der erythrozytäre Zyklus wird bei *Plasmodium malariae* in einem 72-Stunden- und bei *P. ovale* und *P. vivax* in einem 48-Stunden-Rhythmus synchronisiert. Der Entwicklungszyklus bei *Plasmodium falciparum* ist nicht synchronisiert und kann jede Fiebrerrhythmik imitieren.

Bei *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* verbleibt ein Teil der Schizonten als sogenannte Hypnozoiten in der Leber, wo sie über Jahre persistieren und schließlich zu charakteristischen Spätrezidiven der Malaria tertiana führen können.

Abbildung 2: Entwicklungszyklus der Plasmodien



Nach: http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm

1.1.4 Klinisches Bild und Komplikationen bei Malaria-Infektionen

Die Inkubationszeit der Malaria ist variabel, abhängig von der Art des Erregers und anderen Faktoren. Oft treten die ersten grippeartigen Prodromalsymptome 7-14 Tage nach dem Mückenstich auf, bei *P. malariae*-Infektionen nach 4-5 Wochen (Hof 2002).

Zu den Beschwerden gehören Fieber, Schüttelfrost, Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, Myalgien und gastrointestinale Symptome. Auch bei milden Verläufen kann es zu einer Anämie, (Hepato-) Splenomegalie und zu einem Ikterus kommen (Weatherall, Miller et al. 2002). Ferner treten häufig eine Thrombozytopenie auf, eine diskrete Gerinnungsaktivierung wird fast immer gesehen. Das Fieber steigt nicht selten über 40°C, begleitet von Tachykardie und Delirium.

Es tritt typischerweise bei Infektionen mit *P. vivax*, *P. ovale* oder *P. malariae* oft schubweise auf (Malaria tertiana: alle 48h, Malaria quartana: alle 72h), entsprechend den unterschiedlich synchronisierten Entwicklungszyklen. Bei Malaria durch *P. falciparum* ist meist keine Fiebrerrhythmik zu erkennen, gelegentlich wird ein TertianaRhythmus beobachtet.

Der klinische Verlauf der Malaria wird durch genetische und erworbene Eigenschaften des Parasiten (Neigung zur Zytoadhärenz am Kapillarendothel sowie Medikamentenresistenz) und des Wirtes beeinflusst. Ferner spielen Semiimmunität, Alter, Schwangerschaft sowie kulturelle und ökonomische Faktoren eine Rolle (Miller, Baruch et al. 2002; Kratzius 2010).

Die schwersten Verläufe werden bei der Malaria tropica beobachtet. Eine Malaria tropica gilt als kompliziert, wenn mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt ist:

- Hämatologische Störungen: schwere Anämie / disseminierte intravasale Gerinnung
- Tiefes Koma / zerebrale Malaria
- Nierenversagen
- Laktatazidose, Kussmaul-Atmung
- Hypoglykämie
- Nicht kardiogenes Lungenödem / ARDS
- Einschränkung der Leberfunktion / Ikterus

(Horstmann, Ehrich et al. 1985; 2000; White and Breman 2005)

In diesen Fällen besteht eine erhöhte Lebensgefahr. Der Tod tritt meist in Folge von Multiorganversagen ein.

1.2 Sepsis

1.2.1 Epidemiologie der Sepsis

Die Sepsis gehört zu den schwerwiegendsten intensivmedizinischen Krankheitsbildern. Sie kann als Komplikation einer Grunderkrankung, aber auch als Folge einer nosokomialen Infektion und somit als Komplikation der Intensivbehandlung selbst auftreten. In Deutschland erkranken jährlich etwa 154 000 Menschen an Sepsis (Brunkhorst 2006; Engel, Brunkhorst et al. 2007). Die weltweite Inzidenz ist steigend (Angus, Linde-Zwirble et al. 2001; Martin, Mannino et al. 2003). Die Letalität liegt seit Jahren zwischen 20 und 60% (Brun-Buisson 2000). Septische Erkrankungen sind in Deutschland die dritthäufigste Todesursache nach dem akuten Myokardinfarkt und malignen Erkrankungen (Brunkhorst 2006).

1.2.2 Definition und Ätiologie von Sepsis

Die Sepsis ist definiert als systemische Entzündungsreaktion mit Nachweis eines Erregers. Eine systemische Entzündungsreaktion (Systemic Inflammatory Response Syndrome, bzw. SIRS) liegt vor, wenn mindestens zwei der folgenden vier Symptome oder Befunde vorliegen:

- Körpertemperatur $> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$
- Tachykardie: Herzfrequenz $> 90/\text{min}$
- Tachypnoe: Atemfrequenz $> 20/\text{min}$ oder Hyperventilation: $\text{paCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$
- Leukozyten $> 12\,000/\text{mm}^3$ oder $< 4000 \text{ mm}^3$ oder $> 10\%$ unreife
- Granulozyten im Differentialblutbild

Ein SIRS oder eine Sepsis werden als schwer bezeichnet, wenn ein oder mehrere Organe versagen, ohne dass das Organversagen durch eine Grundkrankheit außerhalb der Sepsis erklärt ist. Von einem septischen Schock spricht man, wenn eine Hypotonie (systolischer Blutdruck $< 90\text{mmHg}$ oder Absinken des Blutdruckes um $> 40 \text{ mmHg}$ vom Ausgangswert) trotz adäquater Volumengabe vorliegt, die nicht durch andere Ursachen erklärt werden kann. Diese Definitionen beruhen auf den

Konsensuskonferenzen des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine (1992).

Etwa 70% der Sepsiserkrankungen werden durch gramnegative oder grampositive Bakterien hervorgerufen, der Rest sind Pilz- oder Mischinfektionen (Sands, Bates et al. 1997).

1.2.3 Klinisches Bild und Komplikationen bei Sepsis-Infektionen

Die Pathogenese und der Verlauf einer Sepsis werden von der Art des Erregers, dem Ort der Primärinfektion sowie von Immundefekten und dem Allgemeinzustand des Patienten vor Eintritt der Infektion beeinflusst.

Die Sepsiserreger produzieren verschiedene Mediatoren, welche klinisch Veränderungen der Respiration mit Tachypnoe und Hyperventilation sowie Veränderungen der Zirkulation, der Gerinnung und des Stoffwechsels bewirken.

Häufig kommt es zu einer akuten Verschlechterung des Allgemeinzustandes, meistens einhergehend mit Fieber und Leukozytose, seltener mit Hypothermie, bzw. Leukopenie. Bei ca. 20% der Patienten bleiben Körpertemperatur oder Leukozytenzahl normal (Schuster 2005). Auch Desorientierung und andere Zeichen einer Enzephalopathie können frühe Zeichen einer Sepsis sein. Bei manchen Erregern treten Hautveränderungen auf, die Rückschlüsse auf bestimmte Erreger erlauben.

Zu den häufigsten Komplikationen einer Sepsis gehören das ARDS (50%) sowie therapieresistentes Kreislaufversagen mit konsekutivem Multiorganversagen durch einen erniedrigten peripheren Gefäßwiderstand. Dieses führt häufig zum Tode. Oft entstehen auch renale Komplikationen wie Oligurie, Azotämie und Proteinurie. Des Weiteren tritt in 10 bis 30 % der Fälle eine Thrombozytopenie auf, die oft Ausdruck einer Verbrauchskoagulopathie beziehungsweise einer disseminierten intravasalen Gerinnung ist. Bei einer Krankheitsdauer von mehreren Wochen bis Monaten kann eine „Critical-illness-Polyneuropathie“ zu Paresen der distalen Muskulatur führen (Munford 2005).

Um den Ausprägungsgrad des Organversagens zu quantifizieren wurde 1994 von der „Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine“ ein Score-System für Patienten mit septischen Krankheitsbildern entwickelt (Vincent, Moreno et al. 1996) und als SOFA-Score bezeichnet (Sepsis-related Organ Failure Assessment Score). Zunächst wurde dieser Score zur Beschreibung von Komplikationen bei schwerkranken Patienten entwickelt, es zeigte sich jedoch, dass der SOFA-Score auch mit der Prognose und Letalität korrelierte (Hantke, Holzer et al. 2000; Vincent 2006). Die Letalität erhöhte sich hier von 3,6% bei einem Durchschnittsscore von 1 auf 22,5% bei einem Durchschnittsscore von 2. Bei einem Durchschnittsscore von 3 betrug die Letalität bereits 86,7% (Hantke, Holzer et al. 2000).

Tabelle 1: Definitionstabelle des SOFA-Scores nach www.mars-dialyse.de/lebererkrankungen/scores/sofa.htm und (Hantke, Holzer et al. 2000)

Organ	Parameter	Punktezahl			
		1	2	3	4
Lunge	PaO ₂ /FiO ₂ [mmHg]	< 400	< 300	< 200 mit Beatmung	< 100 mit Beatmung
Gerinnungssystem	Thrombozyten [1000/mm ³]	< 150	< 100	< 50	< 20
Leber	Bilirubin [mg/dl]	1,2– 1,9	2,0–5,9	6,0–11,9	> 12,0
Herz / Kreislauf	Blutdruck [mmHg] Dosierungen in µg/kg · min	MAP < 70	Dopamin ≤ 5 oder Dobutamingabe	Dopamin > 5 oder Katecholamine ≥ 0,1	Dopamin > 15 oder Katecholamine > 0,1
ZNS	Glasgow- Coma-Scale	13 - 14	10-12	6-9	< 6
Niere	Kreatinin [mg/dl] oder Ausfuhrmenge [ml/d]	1,2– 1,9	2,0–3,4	3,5-4,9 200-500	> 5,0 < 200

1.3 Physiologie und Pathophysiologie des Gefäßendothels

Das Gefäßendothel kontrolliert den Stoffaustausch zwischen intra- und extravasalem Raum, trägt zur Hämostase bei und beeinflusst immunlogische Prozesse und Entzündungsreaktionen. Ferner reguliert es den lokalen Gefäßtonus und somit die Durchblutung der verschiedenen Organe (Busse 2000).

Unter physiologischen Ruhebedingungen verhindert das Endothel die Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten, unterdrückt die Gerinnung und fördert gleichzeitig die Fibrinolyse. Es wirkt zudem antiinflammatorisch, wobei zum Beispiel durch Produktion von NO und Interleukin-10 die Adhäsion von Leukozyten verhindert und freigesetzte Sauerstoffradikale neutralisiert werden (Becker, Heindl et al. 2000).

Durch Infektionen, entzündliche Reaktionen und Störungen der Perfusion kommt es zu einer Aktivierung des Endothels. Dann wird das Endothel prothrombotisch und proinflammatorisch, und es kann zu einer Vasokonstriktion kommen. Es werden Entzündungsmediatoren produziert sowie Adhäsionsmoleküle für Thrombozyten und Leukozyten vermehrt exprimiert (Cotran and Pober 1990; Becker, Heindl et al. 2000).

Die wichtigsten Zytokine, welche diese Aktivierung des Endothels vermitteln, sind Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interferon- γ . Dabei induzieren vor allem IL-1 und TNF- α die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle (ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1) am Endothel, die entsprechenden Liganden auf Leukozyten als Rezeptoren dienen und so deren Adhäsion am Endothel ermöglichen.

Zu Beginn einer vaskulären Entzündungsreaktion sind neutrophile Granulozyten die vorherrschende Zellpopulation in den entzündlichen Infiltraten. Nach etwa vier Stunden bestimmen eher Monozyten das Bild. Dies geht mit einer Änderung des Expressionsmusters der Adhäsionsmoleküle einher. Die Expression von ELAM-1 (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1) ist nur im Frühstadium vermehrt, die Expression von ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) bleibt vermehrt, solange die lokalen Konzentrationen von TNF- α und IL-1 erhöht sind. ELAM-1 und ICAM-1 sind für die Adhäsion von Neutrophilen verantwortlich. VCAM-1 (Vascular Cell

Adhesion Molecule-1), welches mit Lymphozyten und Monozyten interagiert, wird zu einem späteren Zeitpunkt hochregelt. (Cotran and Pober 1990)

Erregerbestandteile wie das Endotoxin gramnegativer Bakterien und die Lipoteichonsäuren der grampositiven Bakterien bewirken eine vermehrte Expression von LFA-1 (CD11a/CD18) (Lymphocyte Function Associated Antigen) auf Granulozyten (Detmers, Lo et al. 1990; Pober and Cotran 1990). LFA-1 bindet an das von den Endothelzellen exprimierte ICAM-1 (Staunton, Marlin et al. 1988), wodurch die Adhäsion und transendotheliale Migration der Neutrophilen ermöglicht wird (Smith, Rothlein et al. 1988). Aktivierte Neutrophile setzen Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies frei (Barnett, Moore et al. 1998) und bewirken so eine Schädigung des Endothels und eine erhöhte Permeabilität (Harlan, Killen et al. 1981; Varani, Ginsburg et al. 1989; Talbott, Sharar et al. 1994).

Mit Interleukin-8 (IL-8) verfügen mit IL-1, TNF- α oder Endotoxin aktivierte Endothelzellen ferner über einen negativen Feedback-Mechanismus, der Entzündungsvorgänge begrenzen kann. IL-8 ist ein löslicher Inhibitor der Leukozytenadhäsion. (Wheeler, Luscinskas et al. 1988; Gimbrone, Obin et al. 1989; Cotran and Pober 1990)

In Kulturüberständen aktivierter Endothelzellen und im Serum einiger Patienten mit unterschiedlichen Krankheiten sind lösliche Formen der Adhäsionsmoleküle nachgewiesen worden. Bei Patienten mit Malaria steigen die Konzentrationen von Adhäsionsmolekülen auf das zwei bis vierfache der Normwerte an, im Serum von Patienten, die an einem septischen Schock leiden, sogar bis auf das 20 bis 23fache (Hviid, Theander et al. 1993; Boehme, Werle et al. 1994; Cowley, Heney et al. 1994)

Ferner steigern IL-1 und TNF- α auch die Produktion weiterer inflammatorischer Zytokine mit nachfolgender Verstärkung der Entzündungsreaktion. Auch begünstigen sie die Apoptose der Endothelzellen, und apoptotische Endothelzellen sind verstärkt prokoagulant (Cotran and Pober 1990; Bombeli, Karsan et al. 1997).

Zu den Folgen des Endothelschadens zählen Minderdurchblutung und Gefäßverschluss und dadurch die Schädigung und das Versagen von Endorganen (Luscher and Barton 1997).

1.4 Mechanismen der Apoptose

Apoptose wird definiert als programmierter Zelltod, physiologischerweise auftretend bei Involutionsprozessen, pathologisch bei Autoimmunerkrankungen, degenerativen und infektiösen Erkrankungen oder bösartigem Tumorgeschehen. Sie betrifft immer nur Einzelzellen oder kleine Zellgruppen.

Apoptose kann einerseits über einen extrinsischen Signalweg durch Bindung von Liganden an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche ausgelöst werden. Die bekanntesten Rezeptoren sind die Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren. Andererseits ist auch eine Auslösung von Apoptose über einen intrinsischen Signalweg als Antwort auf verschiedene stimulierende Noxen möglich. Durch komplexe regulatorische Prozesse kommt es hierbei zur Aktivierung von verschiedenen spezifischen Proteasen, die als Vorstufen in der Zelle vorhanden sind. Diese sogenannten Caspasen spalten die Strukturproteine der Zelle sowie die DNA an charakteristischen Stellen und rufen die für die Apoptose charakteristischen morphologischen Veränderungen hervor. Dieser Vorgang ist irreversibel (Thornberry and Lazebnik 1998). Es kommt zur DNA-Fragmentation und Verdichtung von Zellkern und Zellorganellen, welche noch relativ lange intakt bleiben. Nachfolgend bilden sich membrangebundene Vesikel, sogenannte „apoptotic bodies“, die von benachbarten Zellen phagozytiert werden (Hasnain, Begum et al. 2003; Fenton and Longo 2005; Haynes and Fauci 2005).

Die Auslösung von Apoptose stellt einen Abwehrmechanismus gegen Zellen, die von Viren, Bakterien oder Parasiten befallen sind, dar. Die Apoptose von infizierten Zellen erleichtert das Überleben des Wirtes durch Verringerung der Produktion von Schadstoffen. Unterschiedliche Erreger haben verschiedene Mechanismen entwickelt, die Apoptose von Wirtszellen zu verhindern oder auch zu induzieren (Williams 1994). Parasiten und ihre Produkte können zum einen den Zelluntergang

von Wirtszellen verhindern und das intrazelluläre Überleben von Parasiten fördern, zum anderen auch die Apoptose von Zellen der Wirtsabwehr fördern (Luder, Gross et al. 2001).

1.5 Pathophysiologie der Malaria

1.5.1 Veränderung der Erythrozyten

Der Befall von Erythrozyten mit *Plasmodium falciparum* führt zur Expression des Adhäsionsproteins PfEMP1 (*Plasmodium-falciparum*-erythrocyte-membrane-protein1) auf der Außenseite der Erythrozyten, welches die Anhaftung der parasitierten Erythrozyten an Rezeptoren des venösen und kapillären Endothels vermittelt (Chen, Schlichtherle et al. 2000). Es konnten mehrere Rezeptormoleküle identifiziert werden, wobei im Gehirn ICAM-1 (Porta, Carota et al. 1993; Newbold, Warn et al. 1997; Newbold, Craig et al. 1997) und in anderen Organen CD36 die wichtigste Rolle zu spielen scheint (Ho, Singh et al. 1991).

Durch die Adhäsion an die Kapillarwand entgehen parasitierte Erythrozyten der Filtrierung und Eliminierung durch die Milz (Langreth and Peterson 1985). Da diese Endotheladhäsion fast nur reifere Parasitenstadien betrifft, werden bei Malaria tropica im zirkulierenden Blut meist nur unreife Ringformen gefunden. Für den Wirt stellt die Adhäsion wahrscheinlich einen entscheidenden Virulenzfaktor dar. Ho et al (Ho, Singh et al. 1991) zeigten in einer Studie den Zusammenhang zwischen der Schwere der Infektion mit *P. falciparum* und der Adhäsion parasitierter Erythrozyten an CD36. Dieser als Sequestration bezeichnete Vorgang stellt somit einen zentralen Pathomechanismus der schweren Malaria tropica dar und führt zur Obstruktion der Kapillaren mit nachfolgender Hypoxie im Gewebe (MacPherson, Warrell et al. 1985; Miller, Baruch et al. 2002). Bei den anderen drei benigneren Malariaformen wird diese Erythrozytensequestration nicht beobachtet.

Ferner ist bei Malaria tropica das sogenannte Rosetten-Phänomen von infizierten Erythrozyten mit nicht-befallenen Erythrozyten beschrieben (David, Handunnetti et al. 1988). Hierbei kommt es zu einer Gruppierung mehrerer nicht parasitierter

Erythrozyten um einen parasitierten Erythrozyt. Das Anhaften von mehreren parasitierten Erythrozyten aneinander wird als Agglutination bezeichnet (White and Breman 2005).

1.5.2 Immunantwort des Wirtes

Zu Beginn der Malariaerkrankung reagiert der Wirtsorganismus mit unspezifischen Abwehrmechanismen. Parasitenprodukte aktivieren Makrophagen und Granulozyten, was zur Freisetzung von Zytokinen führt (White and Breman 2005).

In Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung werden bei der Malaria tropica vermehrt Zytokine gebildet (Chen, Schlichtherle et al. 2000; Lyke, Burges et al. 2004; Tripathi, Sha et al. 2009).

Tumornekrosefaktor- α ist als proinflammatorisches und pyrogenes Zytokin einer der Hauptmediatoren bei der Malaria tropica, der nach Stimulation mit Plasmodienantigenen unter anderem von Makrophagen und Monozyten produziert wird (Bate, Taverne et al. 1988; Bate, Taverne et al. 1989; Perlmann and Troye-Blomberg 2002). Seine Konzentration im Plasma ist bei Malaria erhöht und korreliert mit der Schwere der Erkrankung (Grau, Piguet et al. 1989; Kern, Hemmer et al. 1989; Kwiatkowski, Hill et al. 1990). TNF- α induziert Leukozytenadhäsion, -aggregation und -aktivierung sowie die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und proteolytischen Enzymen (Cotran and Pober 1990). So werden einerseits die Parasiten bekämpft (Taverne, Tavernier et al. 1987), andererseits aber auch Endothelzellen geschädigt

(Cotran and Pober 1990), was zu Komplikationen beim Wirtsorganismus führen kann (Grau, Piguet et al. 1989; Perlmann and Troye-Blomberg 2002). Im Tiermodell können cerebrale Komplikationen durch Neutralisation von TNF- α verhindert werden (Grau, Fajardo et al. 1987). Beim Menschen konnte durch die Gabe von Anti-TNF- α -Antikörpern bei Kindern mit cerebraler Malaria das Fieber gesenkt werden, allerdings hatte anti-TNF- α keinen Einfluss auf die Mortalität (Kwiatkowski, Molyneux et al. 1993).

Ferner sind bei Malaria die Serumspiegel von Interferon- γ , Interleukin-6 sowie Interleukin-1 erhöht (Day, Hien et al. 1999; Perlmann and Troye-Blomberg 2002). Bei Patienten mit Malaria tropica korreliert der IL-1-Plasmaspiegel mit dem Plasmaspiegel von TNF- α und mit dem Schweregrad der Erkrankung (Kwiatkowski, Hill et al. 1990).

In klinischen Studien konnte außerdem eine erhöhte Konzentration von Interleukin-10 (IL-10) bei Patienten mit *P. falciparum*-Malaria nachgewiesen werden (Peyron, Burdin et al. 1994; Ho, Sexton et al. 1995). Als antiinflammatorisches Zytokin hemmt IL-10 die Produktion proinflammatorischer Zytokine (Fiorentino, Zlotnik et al. 1991; Ho, Sexton et al. 1995). So wirkt es eventuellen Komplikationen entgegen. Bei der komplizierten Malaria tropica werden niedrigere IL-10-Spiegel und ein niedriger IL-10/TNF- α -Quotient beobachtet als bei unkomplizierter Malaria (Othoro, Lal et al. 1999; May, Lell et al. 2000). Dies lässt vermuten, dass IL-10 zum Schutz vor komplizierten Verläufen der Malaria beitragen könnte.

Bei der spezifischen Abwehr spielen die zelluläre und die humorale Immunität eine Rolle:

Der vermehrte Nachweis von Immunglobulinen lässt auf eine B-Zellaktivierung schließen. Es wird sowohl die Produktion unspezifischer polyklonaler als auch spezifischer Immunglobuline angeregt, wobei der Anteil von erregerspezifischen Antikörpern mit 5% gering ist. Entsprechend der hohen Antigendiversität bei *P. falciparum* sind die gebildeten Antikörper gegen verschiedene Antigene gerichtet. Malaria-Antigene führen zudem zu einer Aktivierung von T-Lymphozyten mit nachfolgender T-Zellproliferation und Produktion proinflammatorischer Zytokine (Perlmann and Troye-Blomberg 2002).

1.5.3 Rolle des Endothels bei Malaria

Sowohl bei milden als auch bei schweren oder tödlichen Verlaufsformen der Malaria tropica wird das Gefäßendothel aktiviert (Turner, Morrison et al. 1994; Turner, Ly et al. 1998). Dies wird u.a. durch proinflammatorische Zytokine vermittelt (s. o.).

Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, E-Selektin und VCAM-1 werden an der Endotheloberfläche vermehrt exprimiert, ferner sind die Serumkonzentrationen der löslichen Formen im Serum erhöht (Hviid, Theander et al. 1993; Patnaik, Das et al. 1994; Turner, Ly et al. 1998). ICAM-1 ist wahrscheinlich der wichtigste Rezeptor für die Zytoadhäsion, bzw. Sequestration von parasitierten Erythrozyten in den Kapillaren des Gehirns (Silamut, Phu et al. 1999; Tripathi, Sullivan et al. 2006).

Die erhöhten Serumspiegel des löslichen ICAM-1 korrelieren mit der Höhe des Thrombomodulinspiegels, was für einen Endothelschaden spricht (Boehme, Werle et al. 1994). Somit kommt es im Rahmen einer schweren *Plasmodium-falciparum*-Infektion nicht nur zu einer Endothelaktivierung, sondern auch zu einer Endothelschädigung, wie *post-mortem*-Studien gezeigt haben (MacPherson, Warrell et al. 1985; Patnaik, Das et al. 1994).

1.5.4 Rolle der neutrophilen Granulozyten bei Malaria

Neutrophile Granulozyten können durch parasitierte Erythrozyten, durch Merozoiten von *Plasmodium falciparum* (Malhotra, Salmon et al. 1988) und durch lösliche Parasitenprodukte aktiviert werden (Kharazmi, Jepsen et al. 1987).

Aktivierte Neutrophile setzen u.a. reaktive Sauerstoffspezies und Proteasen frei, die die Malariaparasiten schädigen und das Parasitenwachstum hemmen. Ferner phagozytieren sie infizierte Erythrozyten (Celada, Cruchaud et al. 1983; Celada, Cruchaud et al. 1983; Kharazmi and Jepsen 1984; Golenser, Kamil et al. 1992).

Das dabei aufgenommene Malariapigment, welches in Neutrophilen schwer erkrankter Malariapatienten nachgewiesen werden kann (Nguyen, Day et al. 1995), verstärkt die Expression von Leukocyte Function Antigen 1 (LFA-1) (Pichyangkul, Saengkrai et al. 1997). Dieser Ligand kann dann an das ICAM-1 auf der Endotheloberfläche binden.

Bei Patienten mit Malaria tropica ist der Plasmaspiegel der Humanen Neutrophilen Elastase (HNE) als Folge der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten erhöht (Hemmer, Bierhaus et al. 1994; Holst, Hemmer et al. 1999). Hohe Konzentrationen von HNE korrelieren mit erhöhten Plasmaspiegeln von Thrombomodulin (TM) (Hemmer, Bierhaus et al. 1994). TM ist ein membranständiger Rezeptor der Endothelzellen, welcher von geschädigten Endothelzellen abgegeben wird (Ishii, Uchiyama et al. 1991; Hemmer, Bierhaus et al. 1994).

Aktivierete neutrophile Granulozyten schädigen mit IL-1 vorbehandelte Endothelzellen *in-vitro* (Westlin and Gimbrone 1993). Bei Malaria tropica kann dieser Endothelschaden zur Organschädigung bei der komplizierten Malaria beitragen, da sowohl HNE- als auch TM-Plasmaspiegel mit der Parasitämie und der Schwere der Erkrankung korrelieren. (Hemmer, Bierhaus et al. 1994)

1.5.5 Endothelzellapoptose als Pathomechanismus der Malaria

Die Adhäsion von *Plasmodium-falciparum*-infizierten Erythrozyten am Endothel ruft Endothelzellapoptose hervor. Die genauen Mechanismen der Endothelzellapoptose sind noch nicht vollständig erforscht und scheinen multifaktoriell zu sein (Toure, Ouwe-Missi-Oukem-Boyer et al. 2008; Wilson, Huang et al. 2008). Sie wird unter anderem vermittelt durch Zelladhäsionsmoleküle (siehe Kapitel 1.5.3) (Pino, Vouldoukis et al. 2003). Endothelzellapoptose könnte somit ein wesentlicher Pathomechanismus der Endothelschädigung und des Organversagens bei komplizierter Malaria sein (Turner, Morrison et al. 1994; Turner, Ly et al. 1998; Brown, Hien et al. 1999).

1.6 Pathophysiologie der Sepsis

1.6.1 Mechanismen der Sepsis

Beim Eindringen von bakteriellen Krankheitserregern in den Wirtsorganismus werden bestimmte Moleküle der Erreger vom Wirt als Signal erkannt. Bei der gramnegativen Sepsis ist dies das Lipid A, das biologisch aktive Zentrum der Lipopolysaccharide (LPS). Lipopolysaccharide, auch Endotoxine genannt, sind Bestandteile der äußeren

Membran aller bekannten gramnegativen Bakterien. Bei der grampositiven Sepsis wirken die sogenannten Exotoxine, zu welchen die Lipoteichonsäure (LTA) zählt, als Auslöser einer unspezifischen Immunreaktion (Lotz, Aga et al. 2004; Munford 2005). LPS und LTA interagieren mit dem Oberflächenmolekül CD14, welches von Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen exprimiert wird. Über eine Interaktion mit Toll-like-Rezeptoren (TLR) werden Makrophagen aktiviert, welche nachfolgend Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 produzieren und freisetzen (Munford 2005; Tsiotou, Sakorafas et al. 2005).

TNF- α stimuliert Leukozyten und Endothelzellen zur Freisetzung weiterer Zytokine, Prostaglandine und Leukotriene. Ferner induziert TNF- α die Expression von Adhäsionsmolekülen, die zur Interaktion zwischen Neutrophilen und Endothel benötigt werden (Cotran and Pober 1990). Interleukin-1 β , Interferon γ und Interleukin-2 wirken mit TNF- α teilweise synergistisch (Hotchkiss and Karl 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* Bakterien wie *Staphylococcus aureus* die Expression von Adhäsionsmolekülen induzieren können (Strindhall, Lindgren et al. 2002).

Parallel zu dieser Entzündungsreaktion werden auch antiinflammatorische Zytokine produziert. Hierzu gehören Interleukin-4 und Interleukin-10 (Hotchkiss and Karl 2003). Dadurch wird die Wirksamkeit des proinflammatorischen Signalweges über LPS deutlich vermindert und zusätzlich die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten, an Endothelzellen zu binden, reduziert.

Dementsprechend sind im Serum schwerkranker Sepsispatienten sowohl pro- als auch antiinflammatorische Substanzen nachweisbar, wobei im Verlauf der Anteil der antiinflammatorischen Zytokine überwiegen kann. Dies führt unter Umständen zu einer Exazerbation der Infektion (Weber, Schewe et al. 2004).

Bei der Sepsis lassen sich zwei Stadien der Immunreaktionen unterscheiden. Auf ein hyperinflammatorisches Stadium folgt ein Stadium der Hypoinflammation und

Anergie, das von einer Leukopenie und unter Umständen weiteren klinischen Komplikationen begleitet sein kann (Hotchkiss and Nicholson 2006).

Normalerweise dienen proinflammatorische Mechanismen der Bekämpfung von Krankheitserregern. Die proinflammatorische Immunantwort wird durch antiinflammatorische Substanzen im Gleichgewicht gehalten. Dieses Gleichgewicht ist bei der Sepsis gestört. Hier gelingt die lokale Elimination des Erregers nicht, und die überschießende systemische Abwehrreaktion schlägt im Verlauf in eine kompensatorische antiinflammatorische Antwort um. Daher werden im Einzelfall sowohl massive Entzündungsreaktionen als auch eine Immunsuppression beobachtet (Muller Kobold, Tulleken et al. 2000). Dabei scheint die Prognose um so schlechter zu sein, je schwerer das hypoinflammatorische Stadium ausgeprägt ist, und je früher es eintritt (Hotchkiss and Karl 2003; Soriano, Jy et al. 2005).

Bei Sepsis ist Apoptose ferner die Ursache des Untergangs von Lymphozyten und der Lymphozytopenie (Hotchkiss, Swanson et al. 1999; Oberholzer, Oberholzer et al. 2001; Le Tulzo, Pangault et al. 2002). Hierdurch entsteht eine Immunparalyse, die kennzeichnend für die zweite, anergische Phase der Sepsis ist (Hotchkiss and Nicholson 2006). Diese wird durch die Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine bei der Phagozytose apoptotischer Zellen zusätzlich aufrechterhalten (Hotchkiss, Tinsley et al. 2002; Hotchkiss, Tinsley et al. 2003).

1.6.2 Rolle des Endothels und der Neutrophilen bei Sepsis

Ein generalisierter Endothelschaden wird als wesentliche Ursache des Multiorganversagens bei Sepsis angesehen (Munford 2005). Zur Endothelschädigung kommt es über verschiedene Signalwege des Immunsystems (Russell, Boyd et al. 2011).

Ein möglicher Mechanismus ist die Apoptoseauslösung durch LPS und bakterielle Lipoproteine (Hotchkiss, Tinsley et al. 2002; Bannerman and Goldblum 2003; Shioiri, Muroi et al. 2009; Suzuki, Murakami et al. 2011) Diese wird durch TLR2 und TLR4

vermittelt (Aliprantis, Yang et al. 2000; Aliprantis, Weiss et al. 2001; Bannerman and Goldblum 2003).

Ferner tragen aktivierte Neutrophile zum Endothelschaden bei (Smedly, Tonnesen et al. 1986; Aldridge 2002; Tsiotou, Sakorafas et al. 2005). Diese exprimieren den Liganden LFA-1, welches mit dem Adhäsionsrezeptormolekül ICAM-1 der Endothelzellen interagiert. Darauf folgen die transendotheliale Migration der Neutrophilen sowie das Freisetzen von Sauerstoffradikalen und proteolytischen Enzymen aus den Neutrophilen (Aldridge 2002). Die vermehrte Expression von ICAM-1 bei Sepsis ist sowohl *post mortem* als auch *in vivo* belegt (Cowley, Heney et al. 1994; Tsokos and Fehlauer 2001).

1.6.3 Endothelzellapoptose als Pathomechanismus bei Sepsis

Zahlreiche *in-vitro*-Studien zeigen, dass Krankheitserreger und deren Produkte die Apoptose von Endothelzellen auslösen können (Stefanec 2000; Hotchkiss, Tinsley et al. 2002; Bannerman and Goldblum 2003; Shioiri, Muroi et al. 2009)

1.7 Fragestellung

Die Malaria tropica stellt die schwerste Form der Malaria dar und weltweit die wichtigste parasitenbedingte Todesursache. Betroffen sind vor allem Kinder unter 5 Jahren in Entwicklungsländern.

Sepsis stellt die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar. Sie tritt oft als nosokomiale Infektion infolge einer Intensivtherapie auf. In dieser Arbeit werden *Escherichia coli* als Erreger der gramnegativen und *Staphylococcus aureus* als Erreger der grampositiven Sepsis untersucht.

Sowohl bei schwerer Sepsis als auch bei schwerer Malaria droht ein oft tödliches Multiorganversagen. Als wichtigster Pathomechanismus wird eine Schädigung des Endothels angesehen.

In vorausgegangenen Arbeiten wurde *in-vitro* die Endothelzellschädigung nach Inkubation mit Seren von Malariapatienten und der Einfluss der neutrophilen Granulozyten untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es, im gleichen Modell die Endothelzellschädigung bei Sepsis mit der bei Malaria zu vergleichen und zu prüfen, ob beiden Krankheitsbildern ähnliche Pathomechanismen zu Grunde liegen.

Die Versuche wurden sowohl mit Seren von Patienten, die an Malaria, bzw. *E.coli*- oder *S.aureus*-Sepsis erkrankt sind, als auch mit den Überständen von Kulturen der entsprechenden Erreger durchgeführt. So wurde nicht nur die Wirkung von Serum geprüft, sondern auch diejenige der von den Erregern produzierten Substanzen.

Aktivierte Neutrophile sezernieren Sauerstoffradikale [ROS] und die Neutrophilenelastase. Diese Substanzen können durch das Antioxidans Ascorbinsäure und den Proteaseinhibitor Ulinastatin neutralisiert werden. Daher soll der Einfluss von Ascorbinsäure und Ulinastatin in Konzentrationen, die bei der Anwendung am Menschen erreichbar sind, geprüft werden. Dies ermöglicht es, die Rolle der von aktivierten Neutrophilen sezernierten Produkte zu untersuchen.

Die Bedeutung der neutrophilen Granulozyten soll zudem näher untersucht werden. In der Literatur wird beschrieben, dass aktivierte Neutrophile bei Malaria und Sepsis zum einen über von ihnen sezernierte Produkte, zum anderen über die Adhäsion Endothelzellen schädigen können.

Durch Verwendung von Siebeinsätzen sowie von Antikörpern gegen die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-1 soll die Bedeutung des interzellulären Kontaktes zwischen Endothelzellen und Neutrophilen für die Endothelschädigung bei Malaria und Sepsis untersucht werden.

Das Vorhandensein ähnlicher Pathomechanismen bei komplizierter Malaria und komplizierter Sepsis kann bedeuten, dass bei beiden Krankheitsbildern ähnliche Therapiestrategien wirksam sind.

2 Patienten, Materialien und Methoden

Als Modell zur Untersuchung der Endothelzellapoptose bei Malaria und Sepsis wurden kultivierte menschliche Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (Human Umbilical Endothelial Cells / HUVEC) verwendet. Diese wurden mit sowohl mit Seren von Patienten mit schwerer Malaria tropica, *Escherichia coli* (*E. coli*) - Sepsis oder *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) – Sepsis als auch mit den Kulturüberständen dieser Krankheitserreger inkubiert. Für Kontrollexperimente wurden Seren gesunder Freiwilliger bzw. frische Kulturmedien verwendet. Die Inkubation der Endothelzellen mit Serum oder Kulturüberständen bzw. Kulturmedium geschah in Anwesenheit oder Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten.

2.1 Patienten

Es wurden Seren von sieben Patienten mit schwerer Malaria tropica, fünf mit *E. coli* - Sepsis, sowie von drei Patienten mit *S. aureus* - Sepsis untersucht. Für die Kontrollversuche wurden Seren von sechs gesunden Probanden verwendet. Sowohl die Patienten als auch die gesunden Kontrollpersonen erklärten ihr Einverständnis zur Abnahme von Blutproben für wissenschaftliche Zwecke.

Die Studie war von den Ethikkommissionen der Ärztekammer Hamburg und Mecklenburg-Vorpommern genehmigt worden.

2.2 Gewinnung der Seren von Patienten und Probanden

Von Patienten mit Malaria tropica und bakterieller Sepsis und von gesunden Kontrollprobanden wurden 10ml Vollblut abgenommen. Dieses wurde für 10 Minuten bei 1500g zentrifugiert, das separierte Serum vorsichtig abpipettiert, in 2-ml-NuncRöhrchen portioniert und bei -70°C tiefgefroren. Die Abnahme des Serums der Patienten erfolgte vor Beginn der antiparasitären beziehungsweise der antibiotischen Therapie.

2.3 Kulturüberstände

2.3.1 Kulturüberstände von *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum wurde in RPMI 1640 Medium mit menschlichen Erythrozyten der Blutgruppe 0+ unter Sauerstoff-reduzierter Atmosphäre (5% CO₂ und 15% O₂) bei einem Hämatokrit von 5% kultiviert. Das Medium enthielt 5% Serum der Blutgruppe 0+ und 0,05% Albumax II. Nach 48 Stunden Inkubationszeit, bei einer maximalen Parasitämie von 10%, wurde das verbrauchte Medium abpipettiert und für die Experimente genutzt. Kontrollüberstände wurden mit der gleichen Methode gewonnen, allerdings wurden hierfür nicht-infizierte Erythrozyten verwendet.

Die Überstände wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Walter und Kollegen (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Hamburg) zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Kulturüberstände von *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*

Für die Bakterienüberstände wurden Bakterienstämme der American Type Culture Collection verwendet (siehe Anhang). Diese wurden 48 Stunden in Müller-Hinton-Medium kultiviert, bis eine Dichte von 5 McFarland-Einheiten vorlag. Dann wurde das Medium 20 Minuten bei 1,000g und 25°C zentrifugiert und das Sediment mit 0,2µm Filtern sterilfiltriert. Als Kontrollmedium für die Negativkontrolle wurde steriles unverbrauchtes Müller-Hinton-Medium benutzt.

2.4 Endothelzellkultur (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)

Endothelzellen wurden unter sterilen Bedingungen aus Venen menschlicher Nabelschnüre isoliert, welche die Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Südstadtklinikums und der Frauenklinik der Universität Rostock freundlicherweise zur Verfügung stellte. Die Nabelschnüre wurden spätestens sechs Stunden nach der Entbindung verarbeitet.

Die Nabelschnur wurde zunächst auf Perforationsschäden untersucht. Danach wurde die Vene an beiden Enden kanüliert und mit 50ml CB⁻ - Puffer (siehe Anhang)

gespült, um Blutreste zu entfernen. Dann wurde Kollagenase - Lösung in die Vene gespritzt und die Nabelschnur bei 37° C 13 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Nabelschnur massiert, um die Endothelzellen von der Venenwand zu lösen. Mit 50ml CB⁻ - Puffer wurden die Endothelzellen in ein Zentrifugenröhrchen gespült, in welchem 5ml Vollmedium (siehe Anhang) vorgelegt waren. Durch das fötale Kälberserum im Vollmedium wurde die Kollagenase neutralisiert. Die Spüllösung mit den Endothelzellen wurde 10 Minuten bei 160 g zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Das Sediment mit den Endothelzellen wurde in 5ml Vollmedium resuspendiert und in eine gelatinierte Kulturflasche überführt. (Jaffe, Nachman et al. 1973; Thornton, Mueller et al. 1983)

Die Endothelzellen (HUVEC) wurden bei 37°C in wasserdampfgesättigter Luft mit 5% CO₂ kultiviert. Alle zwei Tage wurde mit CB⁺ - Puffer gespült und das Medium gewechselt. Bei vollständiger und gleichmäßiger Bewachsung des Bodens mit Zellen (Konfluenz) wurden diese mit CB⁻ - Puffer gespült, mit Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) von der Kulturflasche gelöst, in frischem Vollmedium aufgenommen und in drei gelatinierte Kulturflaschen überführt (Teilung 1:3). Für Versuche wurden Endothelzellen der zweiten und dritten Generation verwendet. Eine Woche vor einem geplanten Versuch wurden die Endothelzellen auf 96er – Well Mikrotiterplatten übertragen, so dass am Versuchstag die Platten vollständig und gleichmäßig mit Endothelzellen bewachsen waren. Der Versuch wurde nur dann durchgeführt, wenn die Zellen in den einzelnen Vertiefungen konfluent gewachsen waren.

2.5 Isolation von Neutrophilen

Vor jedem Experiment wurde einem gesunden freiwilligen Spender 40ml EDTA-Blut abgenommen und 10 Minuten bei 4°C und 500 g mit maximaler Beschleunigung und Abbremsung zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge stratos, siehe Anhang). Anschließend wurden aus dem Buffy-Coat die Neutrophilen mittels Percoll®

Dichtegradientenzentrifugation (Dooley, Simpson et al. 1982) über einen dreistufigen Gradienten isoliert. Dieser wurde mit den Dichtewerten 1,081, 1,090 und 1,098 aus

Percoll® und PBS-Puffer erstellt (siehe Anhang). Auf diesen dreistufigen Percollgradienten wurde vorsichtig der Buffy-Coat (Leukozytenschicht zwischen Plasma und Erythrozyten) des zentrifugierten Blutes gegeben. Sodann wurde für 30 Minuten mit der langsamstmöglichen Beschleunigung und Abbremsung bei 4°C und 500 g erneut zentrifugiert. Dabei reichert sich die Neutrophilen an der Grenzschicht zwischen 1,098 g/ml und 1,090 g/ml an, wo sie vorsichtig abpipettiert und in 10ml kaltes PBS gegeben wurden. Dieses wurde 10 Minuten bei 4°C und 150 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 500µg PBS aufgeschlämmt und die Aufschlammung auf Eis verwahrt.

Zur Messung der Neutrophilenzahl und -reinheit wurde die Aufschlammung 1:10 verdünnt und mit Hilfe des Abbott Cell Counter gemessen. Verwendet wurden nur Isolate mit mehr als 90% Neutrophilen, wobei mit PBS eine Konzentration von 1000 Neutrophilen/ µl eingestellt wurde.

Die Isolierung und Aufbewahrung der Neutrophilen bis zum Experiment erfolgte bei 4°C oder auf Wassereis.

2.6 Experimente

Jeder Versuch wurde im Doppelansatz ausgeführt und mindestens zweimal wiederholt. Dazu wurden die Endothelzellen in den inneren 60 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (8 Reihen zu 12 Vertiefungen) ausgesät. Nachdem diese konfluent gewachsen waren, wurde das Experiment wie folgt durchgeführt:

Die Seren von Patienten mit Malaria tropica, *S. aureus* - oder *E. coli* – Sepsis sowie die Kontrollseren der gesunden Probanden wurden 1:10 mit Sparmedium (siehe Anhang) verdünnt, und die Endothelzellen mit diesen inkubiert.

In separaten Ansätzen wurden Endothelzellen mit den Kulturüberständen der Krankheitserreger inkubiert. Diese wurden im Falle der *S. aureus* - und *E. coli* –

Sepsis im Verhältnis 1:10 mit Sparmedium verdünnt, ebenso das Müller-Hinton-Medium. Das Sparmedium enthielt für diesen Versuch 2% fötales Kälberserum, um zu verhindern, dass Apoptose von Endothelzellen durch den Entzug von Serum ausgelöst wurde. Die Überstände von parasitierten Erythrozyten und von nichtparasitierten Kontrollerythrozyten wurden unverdünnt eingesetzt.

Neutrophile wurden vor jedem Versuch isoliert wie beschrieben und, wo angegeben, in einer Endkonzentration von 1000 Neutrophilen pro μl zu den Überständen bzw. Seren hinzugefügt.

2.6.1 Hemmversuche

Um die Endothelzellen vor der Apoptose, die durch Patientenserum, Überstände oder Neutrophile ausgelöst wurde, zu schützen, wurde in einigen Versuchen das Antioxidans Vitamin C in verschiedenen Endkonzentrationen zwischen 10^{-6} und 10^{-4} M oder der Proteaseinhibitor Ulinastatin in verschiedenen Endkonzentrationen zwischen 10^{-8} und 10^{-6} M hinzu gegeben. Die Endkonzentrationen wurden so gewählt, dass sie den Serumkonzentrationen entsprechen, die bei klinischer Gabe dieser Substanzen beim Menschen erreicht werden können (Hemmer, Lehr et al. 2005). Dies geschah wiederum sowohl Anwesenheit als auch in Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten.

In diesen Hemmversuchen dienten Seren von Malaria- oder Sepsis-Patienten, bzw. Kulturüberstände von *P. falciparum* oder *S. aureus* und *E. coli* ohne Ascorbinsäure oder Ulinastatin als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurden Seren von gesunden, freiwilligen Probanden, Kulturüberstände von nicht-parasitierten Erythrozyten und Müller-Hinton-Medium genommen.

2.6.2 Einfluss des direkten Kontaktes von Neutrophilen und Endothelzellen

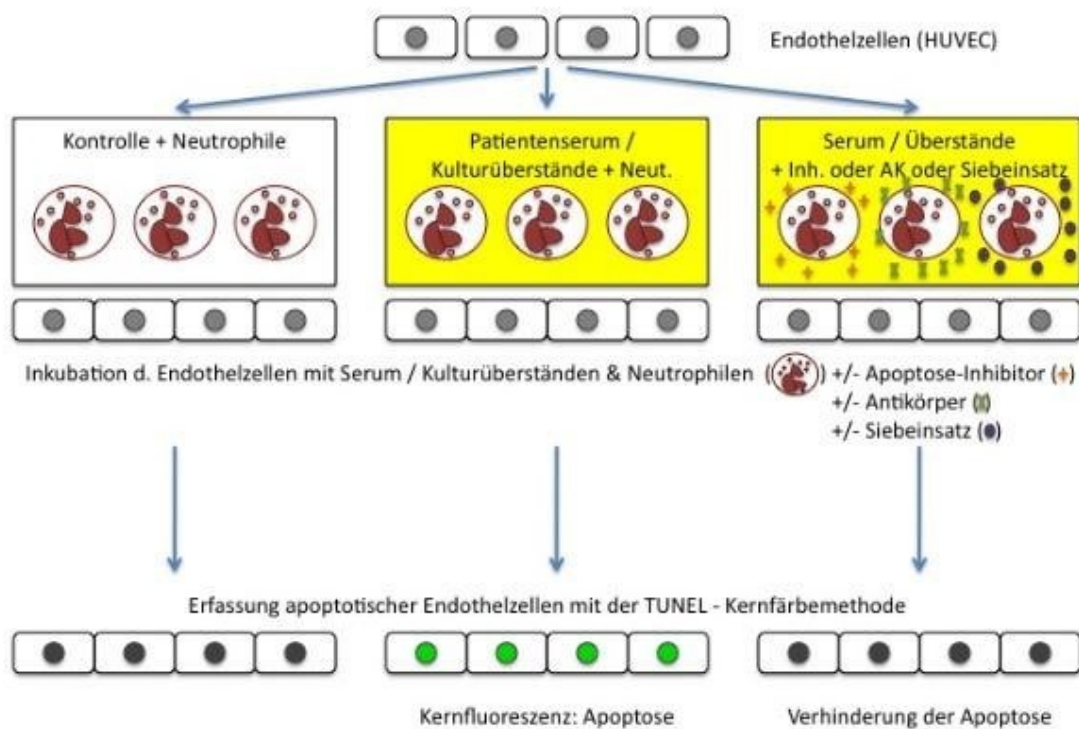
Um zu testen, ob der direkte Kontakt von Neutrophilen und Endothelzellen für die Apoptose nötig ist, wurden Neutrophile und Endothelzellen während der Inkubation

durch eine poröse Membran (Anopore® transwell inserts, Siebeinsatz) am direkten Kontakt gehindert.

2.6.3 Rolle von LFA-1 (CD11b) und ICAM-1 (CD54)

Außerdem wurde die Rolle der Rezeptor-Liganden-Interaktion zwischen dem Ligand LFA-1 auf Neutrophilen und dem Rezeptor ICAM-1 auf Endothelzellen bei der Apoptose von Endothelzellen untersucht. Hierzu wurden Antikörper gegen CD11b und CD54 in einer Endkonzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Im Falle des anti-ICAM1-AK wurden die Versuche auch mit Siebeinsätzen durchgeführt.

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus



Die Endothelzellen in den Mikrotiterplatten wurden mit Seren oder Kulturüberständen unter den jeweils angegebenen Versuchsbedingungen 70 Minuten lang bei 37°C inkubiert, dann zweimal mit CB⁺-Puffer gespült und hiernach mit Vollmedium nochmals 4,5 h inkubiert. Nach den 4,5 h wurden die Zellen wieder mit CB⁺-Puffer

gespült und es wurde mikroskopisch kontrolliert, dass sich keine Neutrophilen mehr in den Kulturen befanden. Schließlich wurden die Zellen mit einem eiskalten Gemisch aus Methanol und Aceton (1:1) für 10 bis 15 Minuten fixiert und anschließend luftgetrocknet.

Nach der Fixierung erfolgte die Darstellung der apoptotischen Endothelzellen mit der TUNEL – Färbung.

2.7 Färbung der Endothelzellen zum Nachweis von Apoptose

Um apoptotische Endothelzellen nachzuweisen, wurden diese mit dem „In Situ Cell Death Detection Kit“ (Roche Diagnostics, siehe Anhang) gefärbt (terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT] – mediated deoxyuridinetriphosphat [dUTP] nick end labeling, TUNEL). Bei Zellen, die durch Apoptose zu Grunde gehen, wird das Chromatin durch Endonukleasen fragmentiert, wobei an den für die Apoptose typischen Bruchenden der Doppelstrang-DNA spezifische 3'-OH-Gruppen frei werden. Das Enzym TdT katalysiert normalerweise die Polymerisierung von Nukleotiden an freie Hydroxylgruppen. Die TUNEL- Reaktion nutzt dieses Prinzip zur Darstellung von DNA - Doppelstrangbrüchen, indem Fluorescein-markiertes dUTP (Fluorescein-Isocyanat-konjugiertes Uridintriphosphat, FITC-konjugiertes UTP) von der TdT an die DNA-Bruchstellen gebunden wird. Diese können dann im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Für die Färbung wurden die fixierten Endothelzellen dreimal mit 100µl kaltem PBS-Puffer gespült und anschließend für fünf Minuten mit eiskalter Permeabilisierungslösung (siehe Anhang) versetzt, um die Membranen der Zellen und der Zellkerne für die Färbesubstanz durchlässig zu machen. Hiernach wurde wiederum dreimal mit PBS-Puffer gespült, zunächst für eine Minute, dann für drei Minuten und schließlich für zehn Minuten, wobei der PBS-Puffer im letzten Schritt 1% BSA (Rinderalbumin) -Lösung enthielt. Dann wurde 50µl Färbereagenz in jede Vertiefung pipettiert, die Mikrotiterplatte mit Folie lichtgeschützt abgedichtet und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Dabei wurde die Platte alle fünf bis zehn Minuten

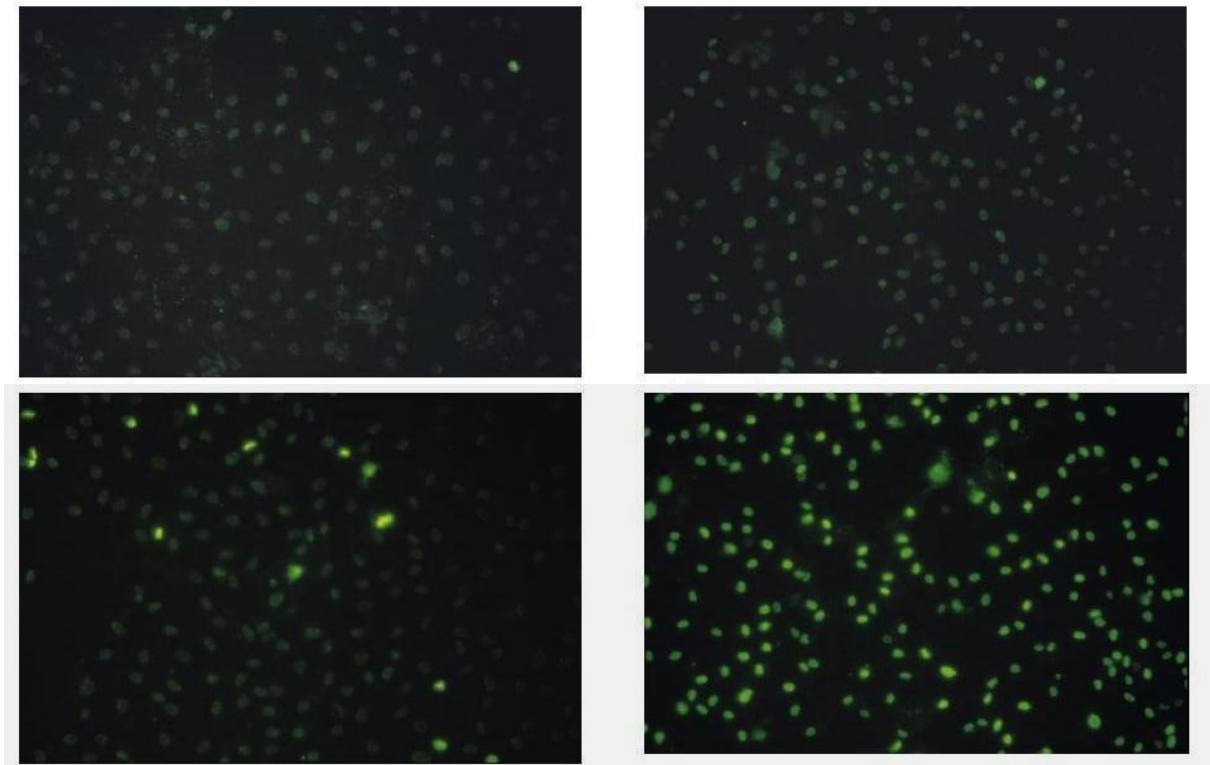
geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Färbesubstanz zu gewährleisten. Nachfolgend wurden die Vertiefungen erneut dreimal mit PBS-Puffer gespült (1, 3, 10 Minuten, beim letzten Schritt mit 1%iger BSA-Lösung).

Zur Stabilisierung der Fluoreszenzmarkierung der apoptotischen Endothelzellen wurde abschließend in jede Vertiefung 100µl 0,6%ige DABCO-Lösung (1,4Diazabicyclo(2.2.2)octan in Glycerin, siehe Anhang) gegeben.

Die Analyse apoptotischer Endothelzellen erfolgte am Inversionsfluoreszenzmikroskop. Da Fluorescein mit UV-Licht der Wellenlänge 490 nm angeregt wird und grünes Licht der Wellenlänge 518 nm abgibt, leuchteten die Kerne apoptotischer Zellen stark grün.

Um sicherzustellen, dass die TUNEL-Färbung in diesem Modell tatsächlich Apoptose erfasst, wurde in parallelen Versuchen zusätzlich die Färbung mit Annexin V und Propidium-Jodid angewandt.

Abbildung 4: Darstellung apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Färbung
(Hemmer, Lehr et al. 2005)



Oben: Kontrollserum
Unten: Patientenserum (Malaria tropica)

links: ohne Neutrophile
rechts: mit Neutrophilen

2.8 Auswertung

Pro Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 100 Zellkerne in mehreren Gesichtsfeldern auf Fluoreszenz beurteilt und dann der prozentuale Anteil apoptotischer Endothelzellen ermittelt. Da alle Versuche im Doppelansatz ausgeführt worden sind, wird das Ergebnis eines Experiments als Mittelwert beider Versuchsansätze angegeben. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Median dieser Mittelwerte.

In der Statistik gelangten nichtparametrische Tests zur Anwendung, da die Fallzahlen zur Prüfung auf Normalverteilung nicht ausreichten. Für unverbundene Stichproben wurde der U-Test nach Mann und Whitney und für verbundene Stichproben der Willcoxon-Test verwendet.

3 Ergebnisse

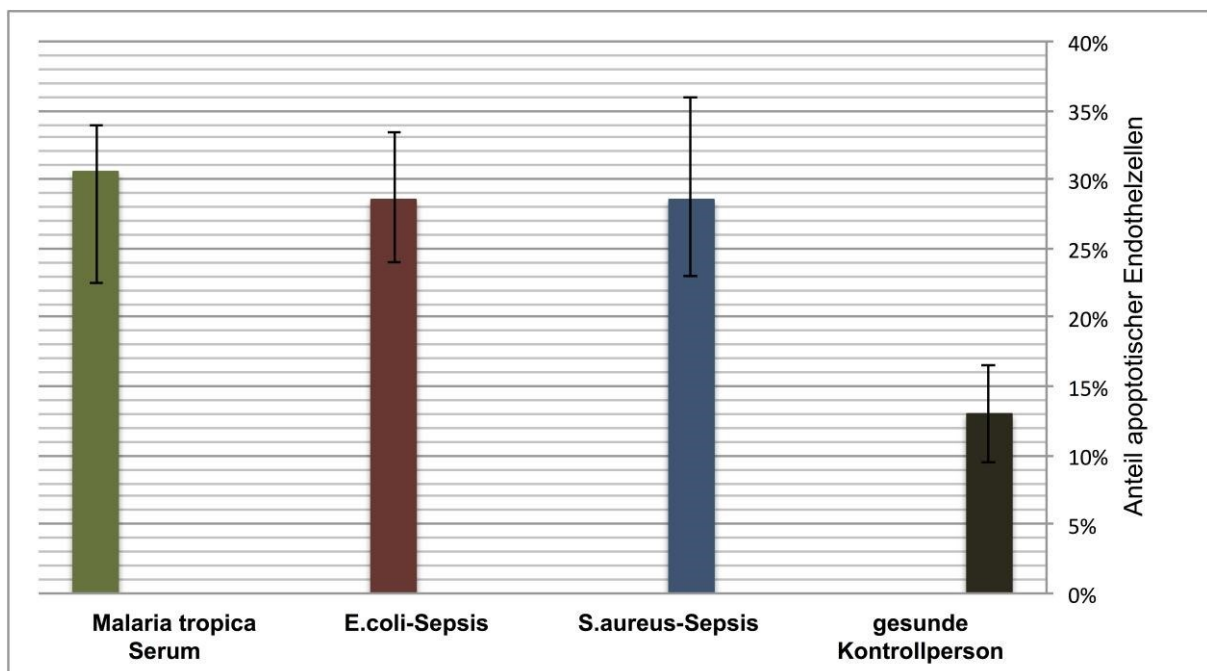
3.1 Inkubation von HUVEC mit Patienten- oder Kontrollserum mit und ohne neutrophile Granulozyten

3.1.1 Inkubation von HUVEC mit Patienten- oder Kontrollserum

Die Inkubation von Endothelzellen mit Patientenseren führte zu einer höheren Apoptoserate als die Inkubation mit Seren gesunder Kontrollpersonen (Malariapatienten: Median 30,5%, range von 22,5% bis 34%, *E. coli* – Sepsis: Median 28,5%, range von 24% bis 33,5%, *S. aureus* – Sepsis: Median 28,5%, range von 23% bis 36%, gesunde Kontrollpersonen: Median 14%, range von 9,5% bis 16,5%).

In allen Gruppen unterschieden sich die Werte für die Patientenseren signifikant von denen der Kontrollgruppe (Malaria $p < 0,001$, *E.coli*-Sepsis $p < 0,001$, *S.aureus*-Sepsis $p = 0,005$).

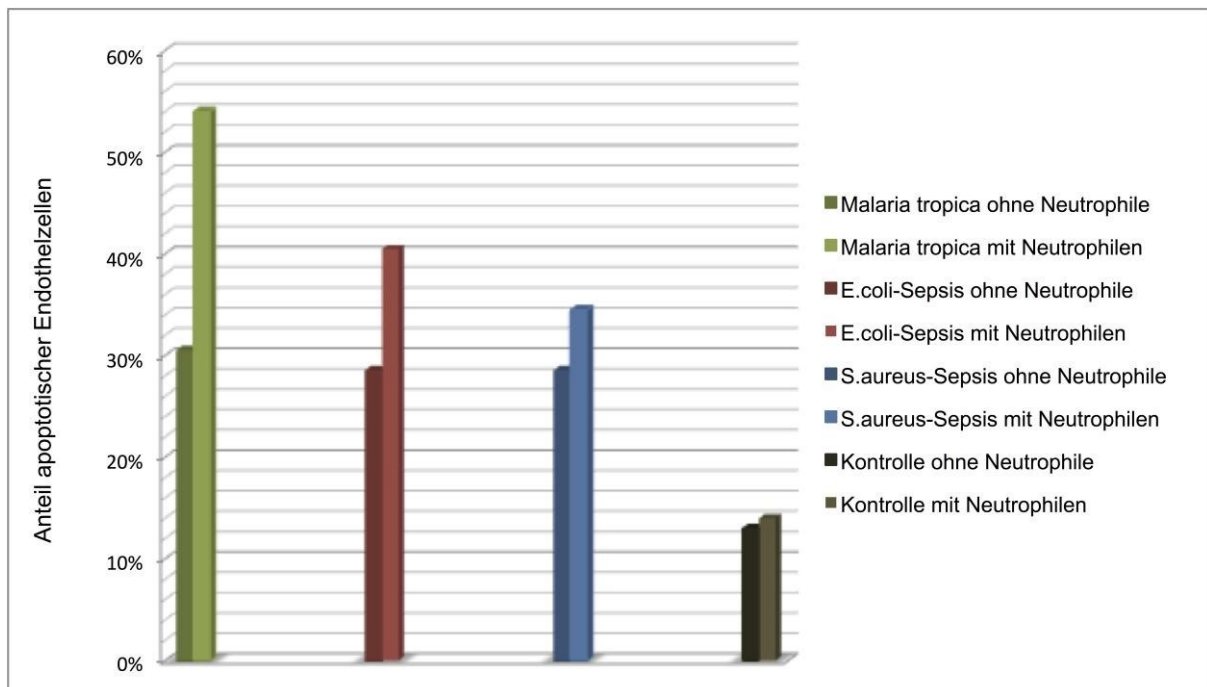
Abbildung 5: Apoptoserate der Endothelzellen nach Inkubation mit Seren von Patienten- oder gesunden Kontrollpersonen



3.1.2 Rolle der neutrophilen Granulozyten

Nach Inkubation der Endothelzellen mit Patientenserum in Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten lagen die Apoptoseraten bei jedem Wertepaar deutlich höher als nach Inkubation in Abwesenheit von Granulozyten (Malaria tropica 54% mit Neutrophilen, 30,5% ohne Neutrophile, *E. coli* – Sepsis 40,5% mit Neutrophilen, 28,5% ohne Neutrophile, *S. aureus* – Sepsis 34,5% mit Neutrophilen, 28,5% ohne Neutrophile). Im Falle der Seren von Malariapatienten (n=7) erreichte der Vergleich Signifikanz (p=0,016), nicht jedoch im Falle der Seren von Patienten mit *E. coli* – Sepsis (n=5; p=0,0625) oder *S. aureus* – Sepsis (n=3; p=0,25).

Abbildung 6: Apoptoserate der Endothelzellen nach Inkubation mit Patientenserum in An- und Abwesenheit von Neutrophilen



3.2 Inkubation von HUVEC mit Kulturüberständen von *Plasmodium falciparum*, *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* in An- und Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten

3.2.1 Inkubation von HUVEC mit Kulturüberständen

Die Inkubation der Endothelzellen mit den Kulturüberständen von *P. falciparum*, *E. coli* oder *S. aureus* führte ebenfalls zu einer höheren Apoptoserate als die Inkubation mit Überständen nicht-infizierter Erythrozyten beziehungsweise mit frischem Müller-Hinton-Medium.

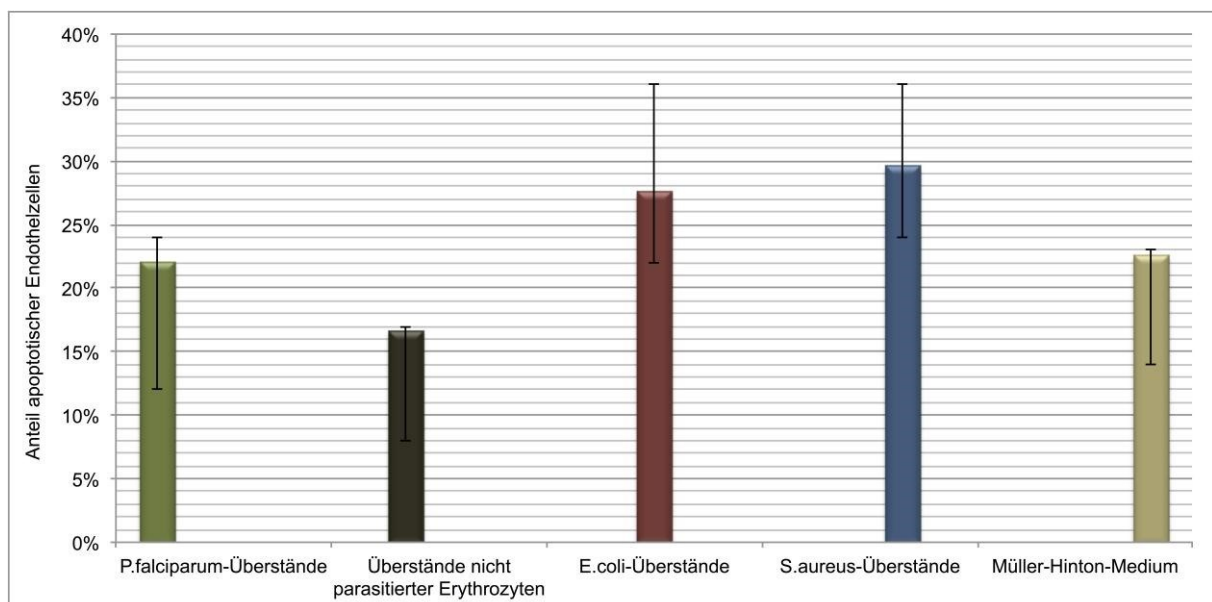
Tabelle 2: Apoptoserate der Endothelzellen nach Inkubation mit Kulturüberständen

<i>P. falciparum</i> - Überstände	22 (12-24) %	p=0,095 *
Überstände nicht-infizierter Erythrozyten	16,5 (8-17) %	
<i>E. coli</i> -Überstände	27,5 (22-36) %	p=0,008 **
<i>S. aureus</i> -Überstände	29,5 (24-36) %	p=0,008 **
Müller-Hinton-Medium	22,5 (14-23) %	

* Vergleich mit Überständen nicht-parasitierter Erythrozyten

** Vergleich mit Müller-Hinton-Medium

Abbildung 7: Apoptoserate der Endothelzellen nach Inkubation mit Kulturüberständen



3.2.2 Rolle der neutrophilen Granulozyten

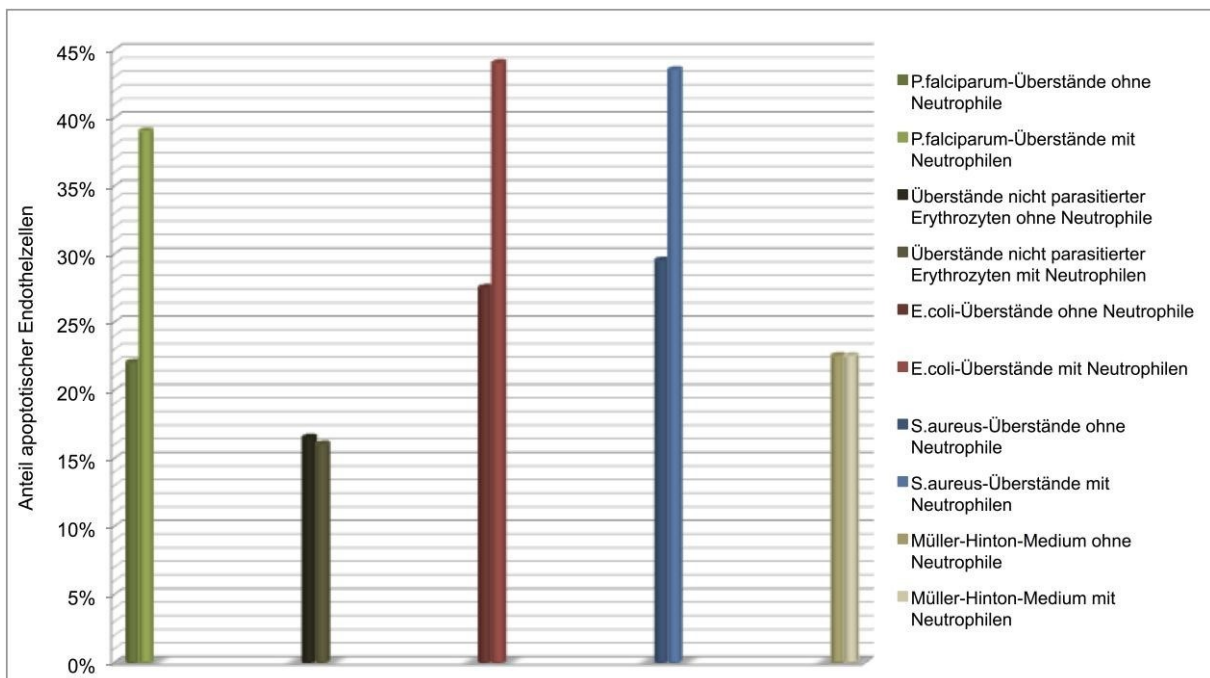
Auch bei Inkubation mit Kulturüberständen von Krankheitserregern wurden in Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten höhere Endothelzellapoptoseraten beobachtet als in Abwesenheit von Neutrophilen.

Tabelle 3: Apoptoserate der Endothelzellen nach Inkubation mit Kulturüberständen in An- und Abwesenheit von Neutrophilen

	Ohne Neutrophile	Mit Neutrophilen
<i>P. falciparum</i> - Überstände	22 (12-24) %	39 (32-44) % *
Überstände nicht-infizierter Erythrozyten	16,5 (8-17) %	16 (4-25) %
<i>E. coli</i> -Überstände	27,5 (22-36) %	44 (32-46) % *
<i>S. aureus</i> -Überstände	29,5 (24-36) %	43,5 (41-48) % *
Müller-Hinton-Medium	22,5 (14-23) %	22,5 (17-30) %

* Signifikanzen $p=0,008$

Abbildung 8: Apoptoserate der Endothelzellen nach Inkubation mit Kulturüberständen in An- und Abwesenheit von Neutrophilen



3.3 Einfluss von Ascorbinsäure und Ulinastatin auf die Apoptoserate von HUVEC bei Inkubation mit Patientenseren und Neutrophilen

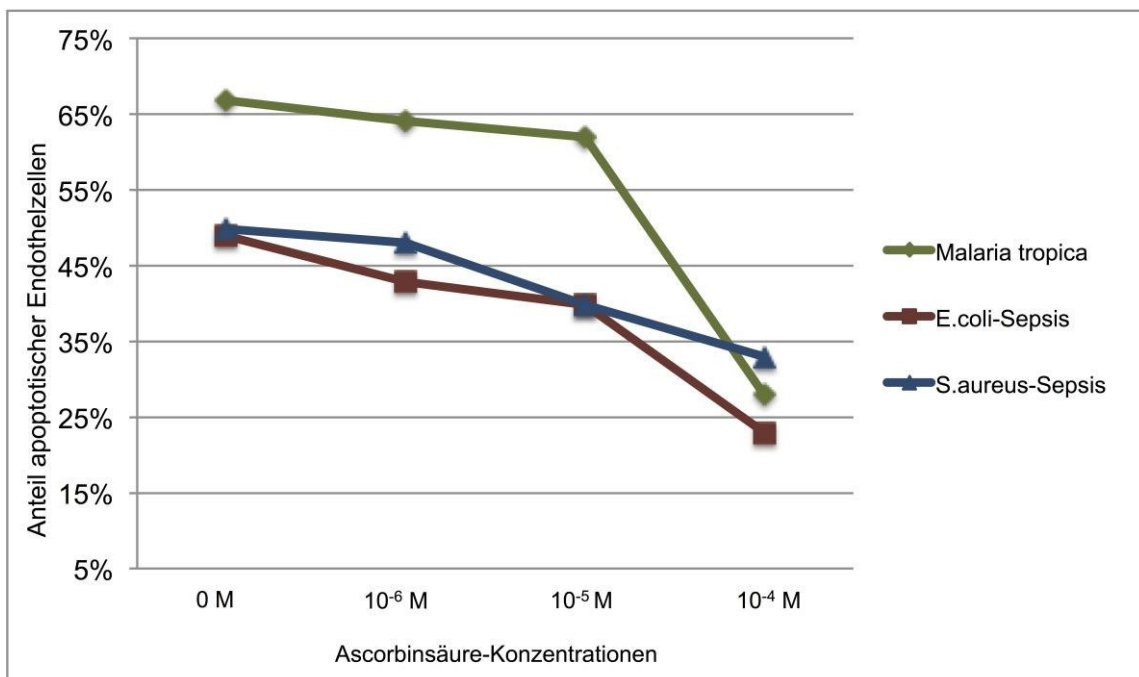
Durch die Zugabe von Ascorbinsäure oder Ulinastatin wurde die proapoptotische Wirkung von Patientenseren und Neutrophilen vermindert.

Bei Ascorbinsäure war der antiapoptotische Effekt bei einer Konzentration von 10^{-4} mol/l am deutlichsten.

Tabelle 4: Dosisabhängiger Einfluss von Ascorbinsäure auf die Apoptoseinduktion durch Patientenseren und Neutrophile

	Ohne Ascorbinsäure	Mit Ascorbinsäure in Konzentrationen		
		Von 10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M
Malaria tropica	67%	64%	62%	28%
<i>E. coli</i> – Sepsis	49%	43%	40%	23%
<i>S. aureus</i> –Sepsis	50%	48%	40%	33%

Abbildung 9: Dosisabhängiger Einfluss von Ascorbinsäure auf die Apoptoseinduktion durch Patientenseren und Neutrophile

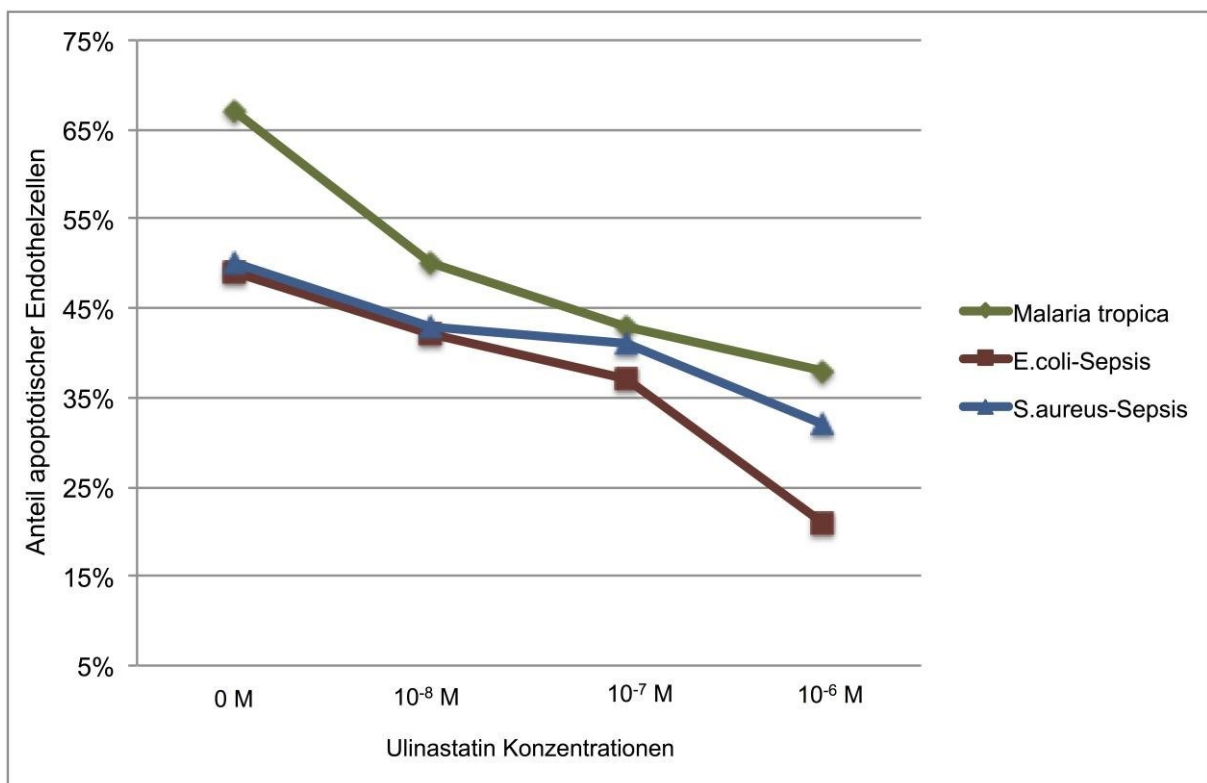


Bei Ulinastatin war der antiapoptotische Effekt bei einer Konzentration von 10^{-6} mol/l am deutlichsten.

Tabelle 5: Dosisabhängiger Einfluss von Ulinastatin auf die Apoptoseinduktion durch Patientenserum und Neutrophile

	Ohne Ulinastatin	Mit Ulinastatin in Konzentrationen von		
		10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M
Malaria tropica	67%	50%	43%	38%
<i>E. coli</i> – Sepsis	49%	42%	37%	21%
<i>S. aureus</i> –Sepsis	50%	43%	41%	32%

Abbildung 10: Dosisabhängiger Einfluss von Ulinastatin auf die Apoptoseinduktion durch Patientenserum und Neutrophile



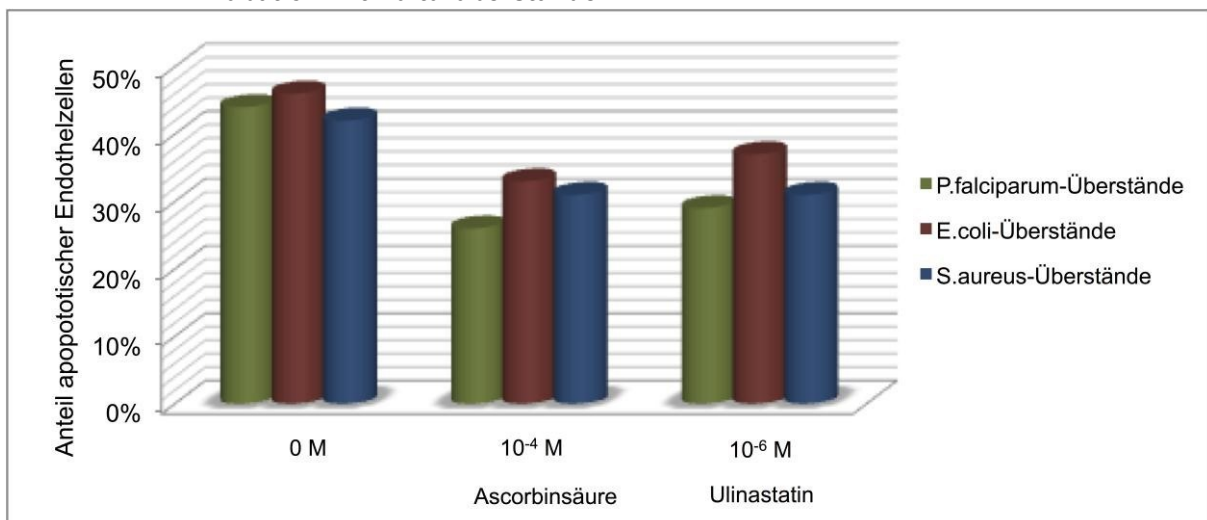
3.4 Einfluss von Ascorbinsäure und Ulinastatin auf die Apoptoserate von HUVEC bei Inkubation mit Kulturüberständen der Krankheitserreger und Neutrophilen

Die Wirkung von Ascorbinsäure und Ulinastatin auf die Apoptoseinduktion durch Kulturüberstände von *P. falciparum*, *E. coli* und *S. aureus* wurde in den Konzentrationen getestet, die sich bei den vorangegangenen Versuchen mit Patientenseren als die wirksamsten herausgestellt hatten.

Tabelle 6: Einfluss von Ascorbinsäure bzw. Ulinastatin auf die Wirkung von Neutrophilen hinsichtlich der Apoptoserate der Endothelzellen bei Inkubation mit Kulturüberständen

	Ohne Hemmstoff	Ascorbinsäure 10 ⁻⁴ M	Ulinastatin 10 ⁻⁶ M
<i>P. falciparum</i> -Überstände	44%	26%	29%
<i>E. coli</i> -Überstände	46%	33%	37%
<i>S. aureus</i> -Überstände	42%	31%	31%

Abbildung 11: Einfluss von Ascorbinsäure bzw. Ulinastatin auf die Wirkung von Neutrophilen hinsichtlich der Apoptoserate der Endothelzellen bei Inkubation mit Kulturüberständen



3.5 Einfluss von anti-LFA-1-Antikörpern auf die Endothelzellapoptose

Durch die Zugabe von anti-LFA-1- (anti-CD11b) Antikörpern wurde die apoptoseverstärkende Wirkung der Neutrophilen bei der Inkubation mit Patientenseren oder Kulturüberständen aufgehoben. In Anwesenheit von Neutrophilen und Anti-LFA-1-Antikörpern lag die Apoptoserate der Endothelzellen etwa so hoch wie in Abwesenheit von Neutrophilen (siehe Abbildung 12, 13 und 14).

Abbildung 12: Einfluss von anti-LFA-1-AK auf die apoptoseverstärkende Wirkung von Neutrophilen bei Inkubation der Endothelzellen mit *P. falciparum* - Serum oder - Überständen

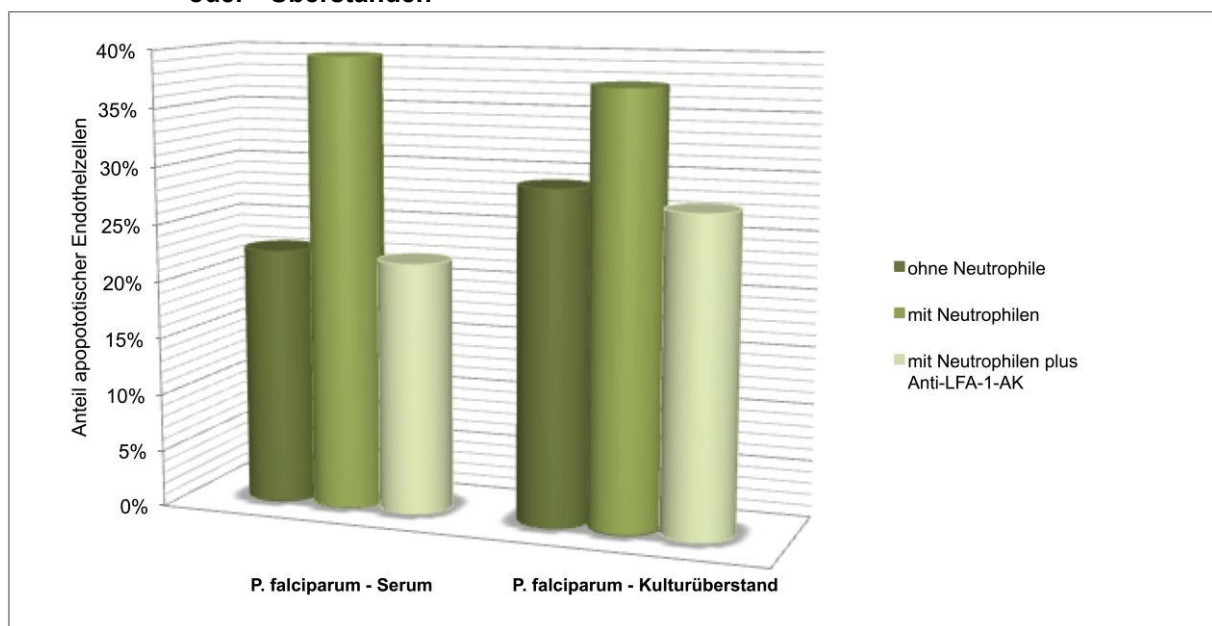


Abbildung 13: Einfluss von anti-LFA-1-AK auf die apoptoseverstärkende Wirkung von Neutrophilen bei Inkubation der Endothelzellen mit *E. coli* – Serum oder – Überständen

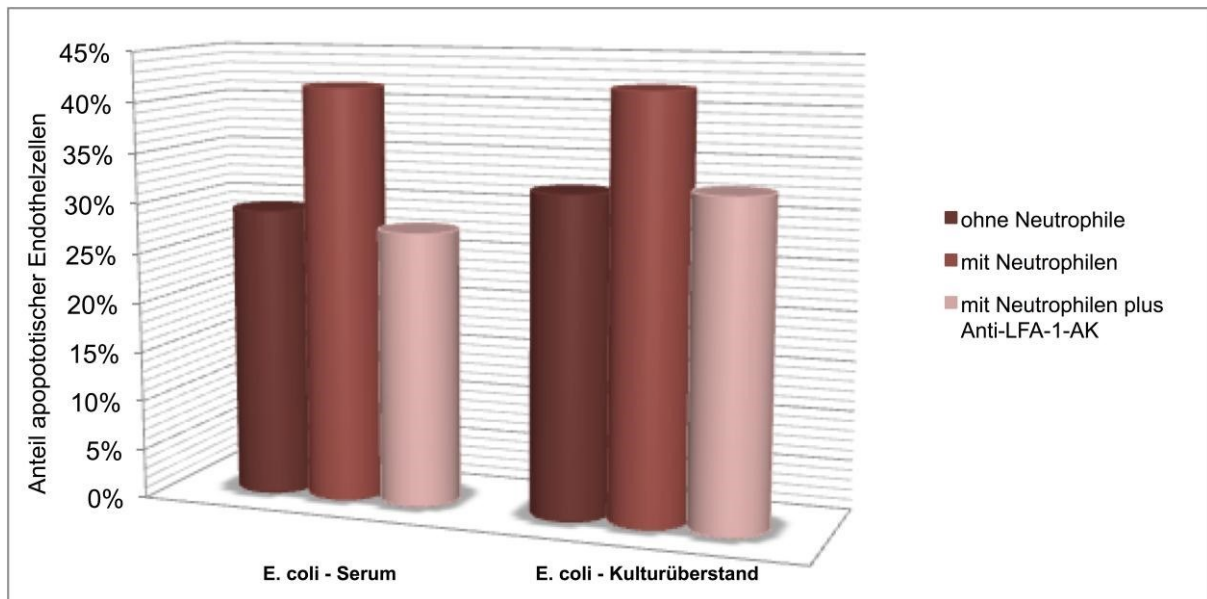
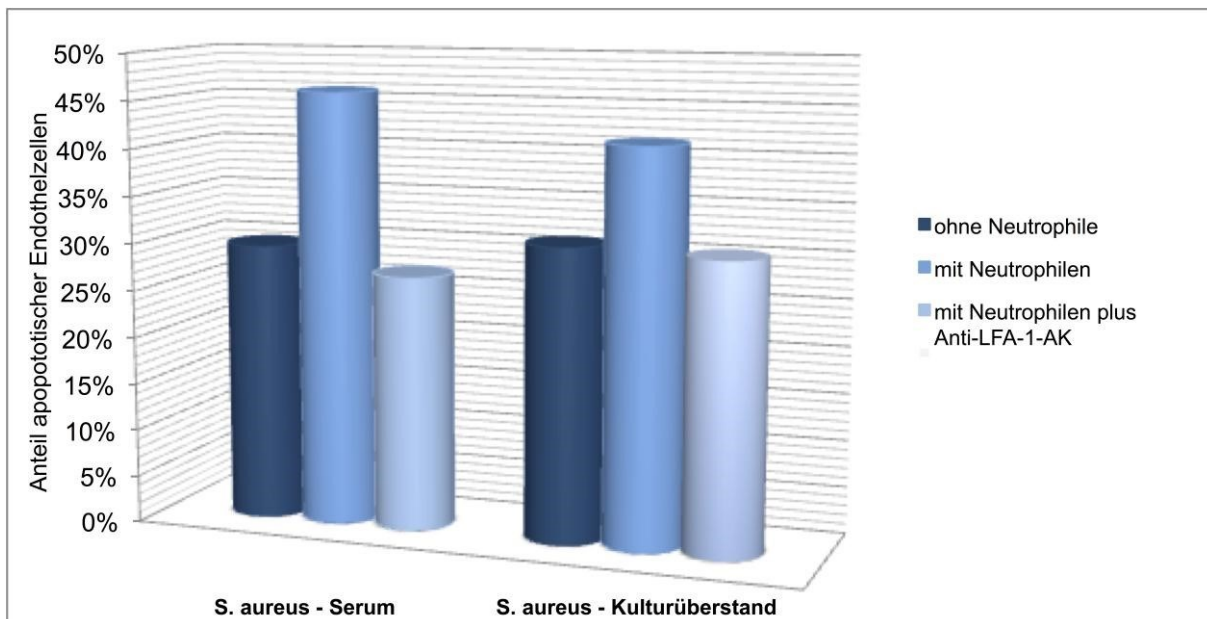


Abbildung 14: Einfluss von anti-LFA-1-AK auf die apoptoseverstärkende Wirkung von Neutrophilen bei Inkubation der Endothelzellen mit *S. aureus* – Serum oder – Überständen



3.6 Verwendung von Siebeinsätzen

Die Verhinderung des Kontaktes zwischen Endothelzellen und Neutrophilen mittels Siebeinsätzen bewirkte ebenfalls eine Senkung der Apoptoserate auf das Niveau, das auch in Abwesenheit von Neutrophilen beobachtet wurde (siehe Abbildung 15 und 16).

Abbildung 15: Einfluss von Siebeinsätzen auf die apoptoseverstärkende Wirkung von Neutrophilen bei der Inkubation der Endothelzellen mit Patientenserum

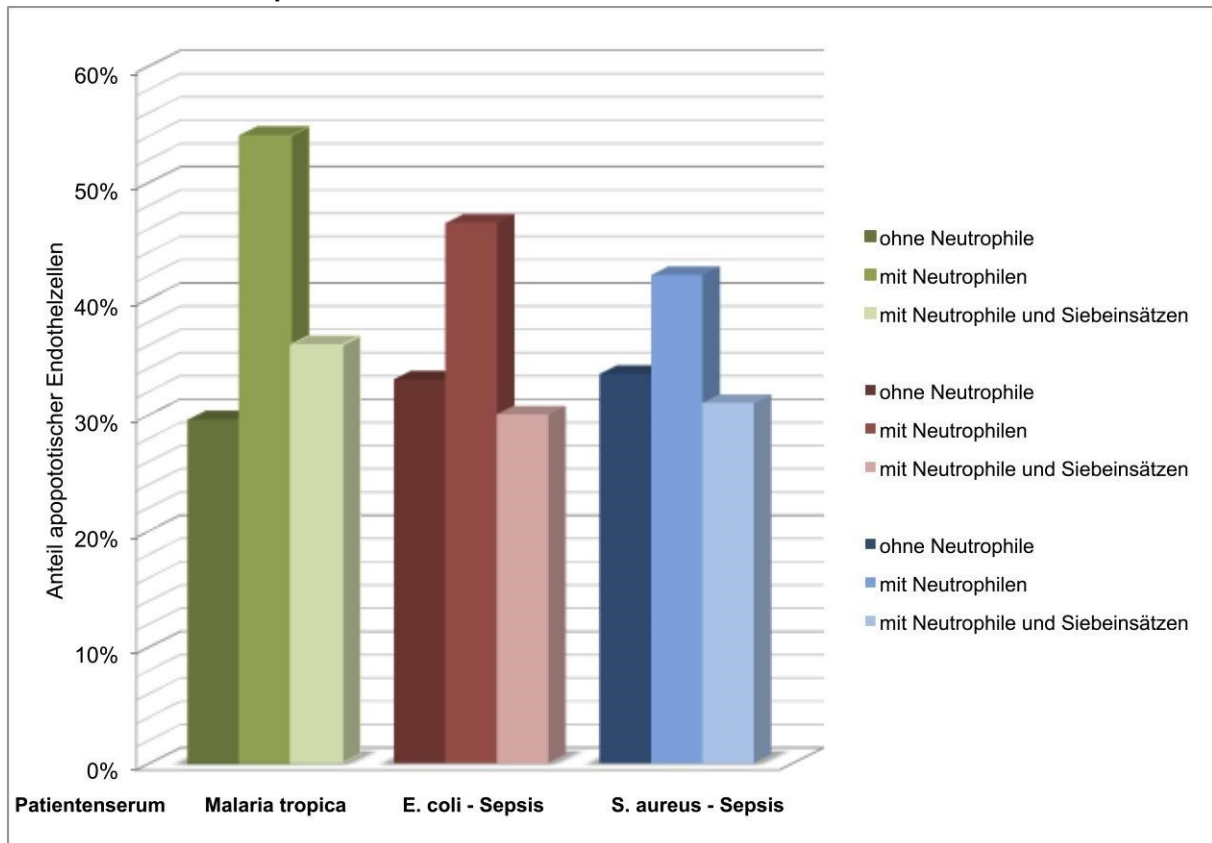
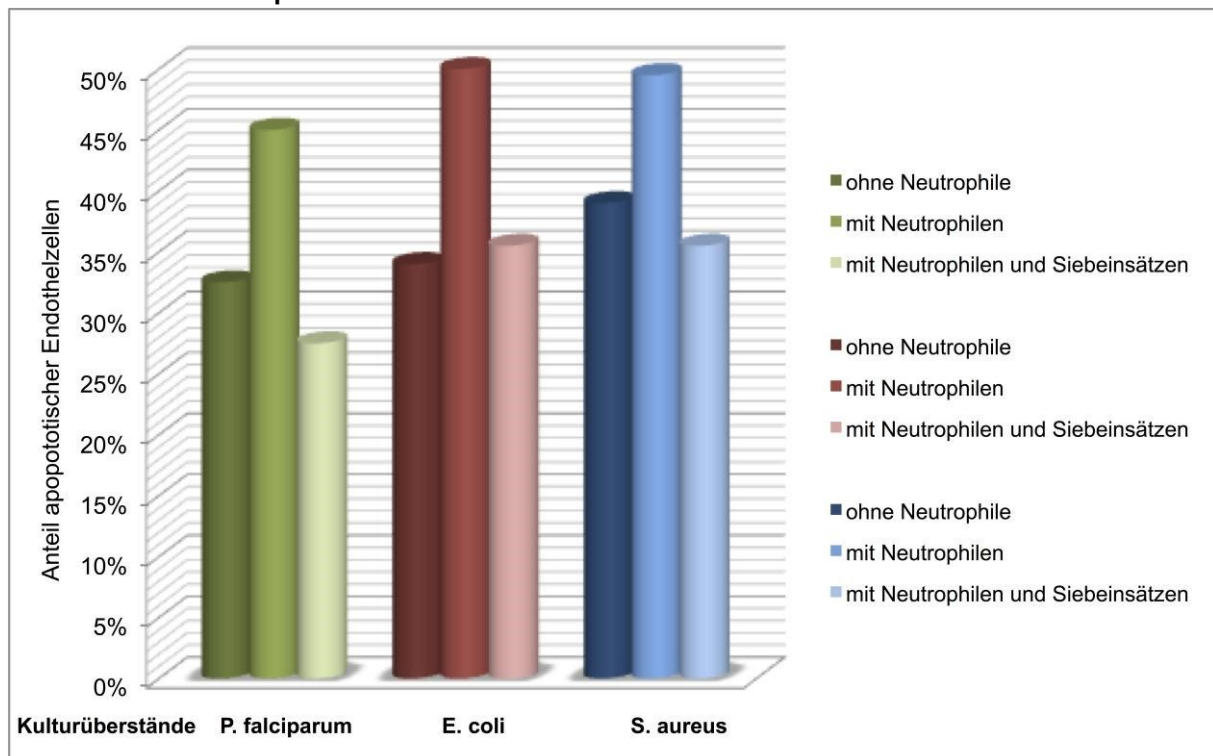


Abbildung 16: Einfluss von Siebeinsätzen auf die apoptoseverstärkende Wirkung von Neutrophilen bei der Inkubation der Endothelzellen mit Kulturüberständen



3.7 Einfluss von Anti-ICAM-1-Antikörpern auf die Endothelzellapoptose

Durch die Zugabe von Anti-ICAM-1- (anti-CD54) Antikörpern zur Versuchsanordnung wurde die apoptoseverstärkende Wirkung der Neutrophilen allenfalls geringfügig beeinflusst (siehe Tabelle 7):

Tabelle 7: Apoptoseraten der Endothelzellen in Ab- und Anwesenheit von Anti-ICAM-1-AK in Gegenwart von Neutrophilen

Inkubation der Endothelzellen mit:	Malaria-serum	<i>E.coli</i> -Serum	<i>S.aureus</i> -Serum	Überstand <i>Pl.falciparum</i>	Überstand <i>E. coli</i>	Überstand <i>S. aureus</i>
Serum oder Kulturüberstände	29,5%	33%	33,5%	32,5%	34%	39%
zusätzlich Neutrophile	54%	46,5%	42%	45%	50%	49,5%
zusätzlich Neutrophile +Anti-ICAM-1-AK	48,5%	50,5%	42%	42,5%	44,5%	42,5%

Auch in Abwesenheit von Neutrophilen hatten Anti-ICAM-1-Antikörper keinen Einfluss auf die Apoptoserate der Endothelzellen, die mit Serum von Patienten mit Malaria tropica (*P. falciparum*) oder mit Sepsis (*E. coli* oder *S. aureus*), bzw. Überständen der Krankheitserreger inkubiert wurden (siehe Tabelle 8 und 9).

Tabelle 8: Inkubation mit Patientenseren: Apoptoseraten der Endothelzellen in An- und Abwesenheit von Anti-ICAM-1-Antikörpern ohne Neutrophile

Inkubation der Endothelzellen mit:	Kontrollserum	Malariaserum	<i>E.coli</i> -Serum	<i>S.aureus</i> -Serum
Serum	19,8%	29,5%	33%	33,5%
+Anti-ICAM-1-AK	20,5%	31,5%	31%	31,5%

Tabelle 9: Inkubation mit Kulturüberständen: Apoptoseraten der Endothelzellen in An- und Abwesenheit von Anti-ICAM-1-Antikörpern ohne Neutrophile

	Kontrollüberstand von nicht-infizierten Erythrozyten	Überstand von <i>P.falciparum</i> -infizierten Erythrozyten	Überstand von <i>E.coli</i> -Kulturen	Überstand von <i>S.aureus</i> -Kulturen	Kontrollüberstand (Müller-Hinton-Medium)
HUVEC	17,5%	32,5%	34%	39%	24%
+Anti-ICAM-1-AK	12,5%	33,5%	34,5%	42,5%	30%

Wenn die Apoptoserate der Endothelzellen durch Verwendung von Siebeinsätzen (zwecks Trennung von Neutrophilen und Endothelzellen) reduziert wurde, bewirkte die Zugabe von Anti-ICAM-1-Antikörpern einen Wiederanstieg der Apoptoserate auf das Niveau, das ohne Siebeinsätze beobachtet wurde (siehe Abbildung 17 und 18).

Abbildung 17: Inkubation der Endothelzellen mit Patientenserum und Neutrophilen: Aufhebung der apoptosevermindernden Wirkung der Siebeinsätze durch Anti-ICAM-1-AK

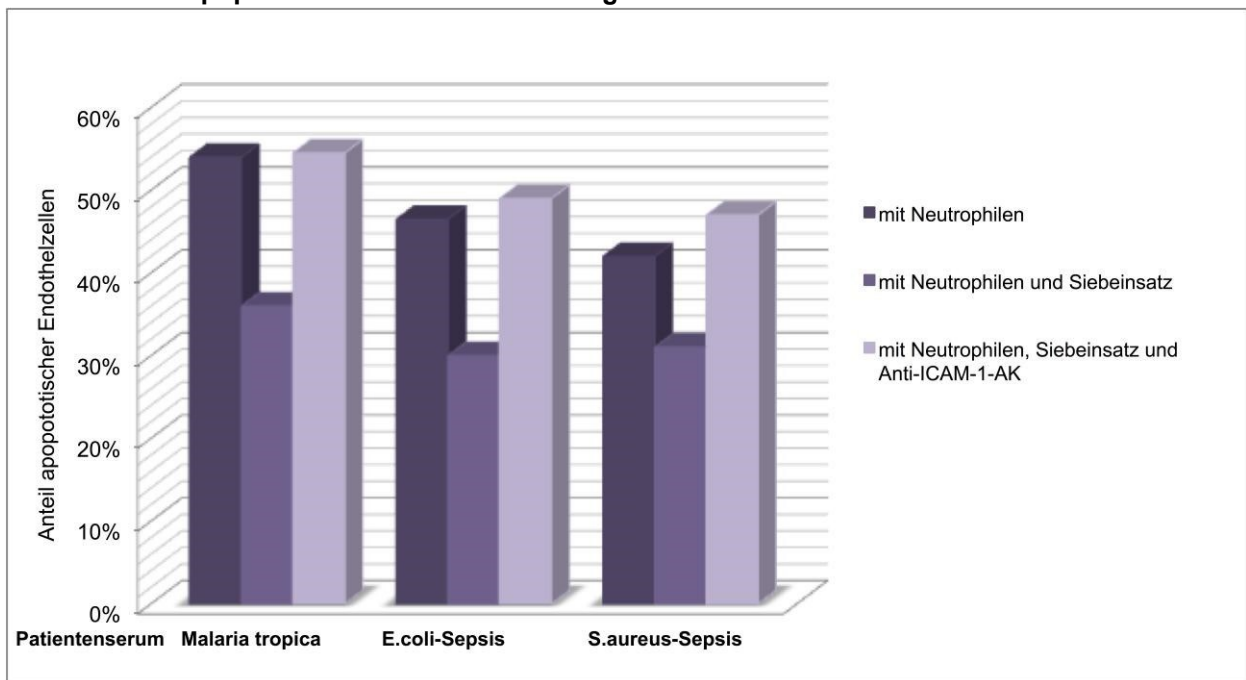
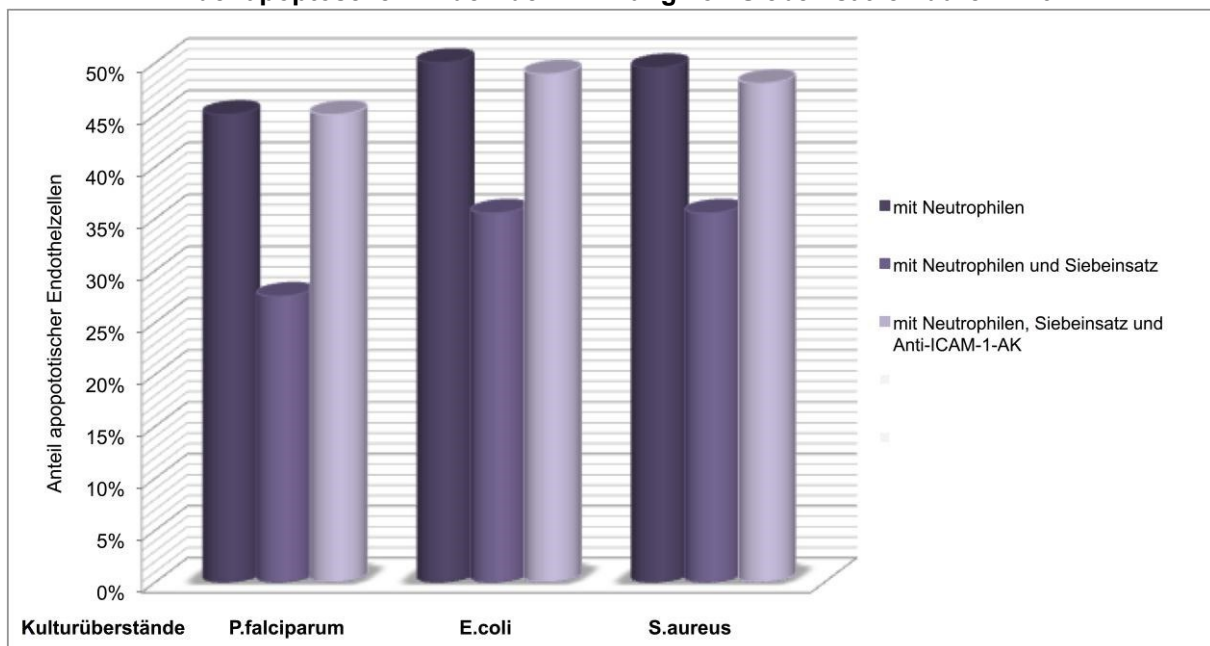


Abbildung 18: Inkubation der Endothelzellen mit Kulturüberständen und Neutrophilen: Aufhebung der apoptosevermindernden Wirkung von Siebeinsätzen durch Anti-ICAM-1-AK



4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Gewinnung und Kultur von Endothelzellen

Zur Untersuchung der Rolle des Endothels bei Malaria und Sepsis wurden Nabelschnurendothelzellen als *in-vitro*-Modell untersucht. Bei der verwendeten Kulturmethode behalten die Endothelzellen der ersten Passagen ihre wesentlichen *in-vivo*-Eigenschaften bei, so dass die an diesem *in-vitro*-Modell gewonnenen Ergebnisse Hinweise auf die *in-vivo*-Verhältnisse am Menschen geben können (Jaffe, Nachman et al. 1973; Thornton, Mueller et al. 1983; Nachman and Jaffe 2004; Hemmer, Lehr et al. 2005).

4.1.2 Kulturüberstände von *Plasmodium falciparum*, *E. coli* und *S. aureus*

Die Blutstadien von *Plasmodium falciparum* können in Erythrozyten kultiviert werden. Dabei behalten die Parasiten ihren normalen asexuellen Zyklus von ungefähr 36 - 48 Stunden bei und bleiben infektiös (Trager and Jensen 1976). Die für diese Arbeit verwendeten Kulturüberstände wurden nach der von Trager und Jensen beschriebenen Standardmethode gewonnen. Da andere menschliche Zellen, insbesondere zytokinproduzierende Zellen wie Endothelzellen, Lymphozyten oder Makrophagen, in den Parasitenkulturen nicht anwesend waren, beschränken sich die apoptoseinduzierenden Bestandteile in den so gewonnenen Überständen im Wesentlichen auf Substanzen, die vom Krankheitserreger stammen. Ähnliches gilt für die Kulturen von *E. coli* und *S. aureus*, die in Müller-Hinton-Medium gezüchtet wurden.

Patientensera enthalten im Gegensatz dazu sowohl Substanzen des Erregers als auch Substanzen des Wirtes.

4.1.3 Isolation von neutrophilen Granulozyten

Die Percoll®-Dichtegradientenzentrifugation dient der Gewinnung neutrophiler Granulozyten (Dooley, Simpson et al. 1982). Mit dieser Methode lassen sich

Neutrophile mit einer Reinheit von bis zu über 95% gewinnen. Verunreinigende Zellen waren in erster Linie andere Leukozyten wie Monozyten, eosinophile und basophile Granulozyten und Lymphozyten. Durch den Einsatz von Percoll® wird eine Aktivierung der Neutrophilen, anders als bei anderen Separationsverfahren, vermieden (Dooley, Simpson et al. 1982). Die Isolation erfolgte stets bei 4°C bzw. auf Eis, was zusätzlich hilft, die vorzeitige Aktivierung der Neutrophilen zu vermeiden (Jackson, Millar et al. 1989).

4.1.4 Nachweis der Apoptose durch die TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Methode, bei der die an DNA-Doppelstrangbrüchen freigewordenen Hydroxylgruppen mit markierten Nukleotiden versehen werden, wurde 1992 erstmals beschrieben (Gavrieli, Sherman et al. 1992). Diese Methode konnte anfangs zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen sowie mitotischen Zellen nicht eindeutig differenzieren (Grasl-Kraupp, Ruttkay-Nedecky et al. 1995; Hotchkiss, Swanson et al. 1999). Deshalb wurde diese Methode weiterentwickelt und verbessert. Die beschriebene standardisierte Vorbehandlung der zu untersuchenden Zellen erhöht die Sensitivität und Spezifität der TUNEL-Färbung (Labat-Moleur, Guillermet et al. 1998; Negoescu, Guillermet et al. 1998). Ferner werden bei der mikroskopischen Auswertung auch morphologische Kriterien des programmierten Zelltodes zur Identifikation der apoptotischen Zellen berücksichtigt (Grasl-Kraupp, Ruttkay-Nedecky et al. 1995). Auf diese Weise gilt das verwendete TUNEL-Verfahren nun als hochspezifischer Nachweis für Apoptose.

Im Vergleich zur Markierung von DNA-Strang-Brüchen mit Nukleotiden unter Verwendung der DNA-Polymerase (Nick-Translation, ISNT), mit der man ebenfalls spezifisch Apoptose nachweisen kann, zeigt das TUNEL-Verfahren eine deutlich höhere Sensitivität und Spezifität (Negoescu, Guillermet et al. 1998).

Die TUNEL-Färbung wurde im vorliegenden Modell zusätzlich durch Färbung mit Annexin V und Propidium-Jodid validiert, da diese Methode es ermöglicht, apoptotische und nekrotische Zellen zu unterscheiden (Hemmer, Lehr et al. 2005).

Auf diese Weise erscheint ausreichend sicher, dass die TUNEL-Methode in dieser Arbeit im Wesentlichen apoptotische Endothelzellen erfasst.

4.2 Neutrophilenvermittelte Endothelschädigung bei Malaria und Sepsis

4.2.1 Endothelzellapoptose bei Malaria und Sepsis

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass Seren von Patienten mit Malaria tropica bzw. grampositiver oder gramnegativer Sepsis bei kultivierten Endothelzellen *in vitro* Apoptose induzieren können. Dies konnte für die Malaria tropica und deren Erreger *Plasmodium falciparum* bereits in vorangegangenen Studien gezeigt werden (Pino, Vouldoukis et al. 2003; Hemmer, Lehr et al. 2005).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Endothelzellapoptose wahrscheinlich nicht nur bei komplizierter Malaria, sondern wahrscheinlich auch bei grampositiver und gramnegativer Sepsis eine Rolle spielt. Dies wurde bereits von anderen Autoren vermutet (Hotchkiss, Tinsley et al. 2002; Bannerman and Goldblum 2003).

In vivo konnte die Apoptose von Gefäßendothelzellen bisher nicht eindeutig bewiesen werden. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass sich apoptotische Endothelzellen rasch von ihrer Basalmembran lösen, in die Zirkulation übergehen, dort eliminiert werden und dann im Gewebe nicht mehr nachzuweisen sind (Hotchkiss, Tinsley et al. 2002). Andererseits stützt die Beobachtung, dass bei Sepsispatienten Endothelzellen vermehrt in der Zirkulation gefunden werden (Mutunga, Fulton et al. 2001) die Annahme, dass die Endothelzellapoptose einer der Pathomechanismen der Sepsis ist.

Ferner wird der Nachweis von Mikropartikeln, die von Endothelzellen abgegeben werden, als Indiz für deren Aktivierung und Apoptose betrachtet (Horstman, Jy et al. 2004; Mzayek, Ylostalo et al. 2008). Mikropartikel bestehen aus kleinen vesikulären Fragmenten von Zellmembranen, die bei Stimulation oder Zelluntergang freigesetzt werden (Jimenez, Jy et al. 2003). Sowohl bei komplizierter Malaria als auch bei bakterieller Sepsis ist ihre Konzentration im Blut erhöht (Combes, Taylor et al. 2004;

Soriano, Jy et al. 2005; Combes, Coltel et al. 2006) und könnte somit ein Indikator für den Ausprägungsgrad und den Verlauf der Erkrankung sein (Pankoui Mfonkeu, Gouado et al. 2010). Neuere Studien zeigen, dass Mikropartikel auch zur Pathogenese von Sepsis und entzündlichen Erkrankungen beitragen (Meziani, Delabranche et al. 2010).

Ein weiterer Beleg für die Bedeutung der Apoptose bei Sepsis wurde im Tierversuch erbracht. Durch Gabe von Hemmstoffen von Caspasen, welche wesentliche Enzyme der Apoptose sind, konnte sowohl die Apoptoserate von Endothelzellen gesenkt als auch das Überleben nach LPS- induziertem ARDS verbessert werden (Kawasaki, Kuwano et al. 2000).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass nicht nur die Inkubation von HUVEC mit Seren von Malaria- bzw. Sepsispatienten, sondern auch die Inkubation mit den Kulturüberständen der entsprechenden Krankheitserreger die Apoptoserate der HUVEC erhöht. Dies zeigt, dass von den Erregern produzierte Substanzen auch unabhängig von der Wirtsreaktion zur Endothelzellapoptose wesentlich beitragen können.

4.2.2 Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Endothelzellapoptose

Sowohl Zytokine des Wirtes, als auch mit *Plasmodium falciparum* parasitierte Erythrozyten sowie von *P. falciparum* stammende Substanzen können zur Aktivierung von Neutrophilen beitragen (Kharazmi, Jepsen et al. 1987; Pino, Vouldoukis et al. 2003; Huy, Trang et al. 2006).

Ähnliches gilt für die grampositive und gramnegative Sepsis, wo Neutrophile sowohl durch Zytokine, als auch durch Lipopolysaccharide oder Lipoteichonsäure, die Bestandteile der Zellwände von gramnegativen, bzw. grampositiven Bakterien sind, aktiviert werden können (Aliprantis, Yang et al. 1999; Bannerman and Goldblum 2003; Lotz, Aga et al. 2004; Hattar, Grandel et al. 2006).

Aktivierete Neutrophile tragen bei Sepsis und bei Malaria zur Endothelschädigung bei (Hemmer, Lehr et al. 2005; Tsiotou, Sakorafas et al. 2005).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Neutrophile sowohl bei Malaria als auch bei Sepsis die Apoptoserate der Endothelzellen erhöhen können. *In vitro* verstärken Neutrophile die proapoptotische Wirkung der Patientenserum und der Kulturüberstände der Krankheitserreger.

Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen zur Rolle der Neutrophilen bei Malaria und Sepsis (Westlin and Gimbrone 1993; Hemmer, Bierhaus et al. 1994).

Von Neutrophilen sezernierte Produkte tragen wahrscheinlich zur Endothelschädigung und zum Organversagen bei (Hotchkiss, Tinsley et al. 2002; Hemmer, Lehr et al. 2005).

Bei Malaria korreliert die Schwere der Erkrankung mit den Plasmaspiegeln der Neutrophilenelastase (Pukrittayakamee, Clemens et al. 1992; Holst, Hemmer et al. 1999).

Auch bei bakterieller Sepsis sind die Marker der Leukozytenaktivierung im Plasma erhöht (Russwurm, Vickers et al. 2002; Martins, Brunialti et al. 2008). Dem zweiphasigen Krankheitsverlauf der Sepsis entsprechend verändert sich allerdings die Leukozytenaktivierung während des Krankheitsverlaufes (Muller Kobold, Tulleken et al. 2000).

Somit kann bei beiden Krankheitsbildern die Leukozytenaktivierung zur Einschätzung der Schwere der Erkrankung und der Prognose dienen. Bei Malaria korreliert die Aktivierung der Neutrophilen mit dem Schweregrad der Erkrankung. Dagegen wurde bei der Sepsis eine umgekehrte Korrelation zwischen dem Ausmaß der Leukozytenaktivierung und dem Schweregrad der Sepsis beobachtet (Muller Kobold, Tulleken et al. 2000; Soriano, Jy et al. 2005).

4.3 Wirkung der Hemmstoffe Ascorbinsäure und Ulinastatin auf die neutrophilenvermittelte Endothelzellapoptose

Da neutrophile Granulozyten im verwendeten *in-vitro*-Modell zur Endothelzellapoptose beitragen, wurde versucht, die Endothelzellapoptose durch Substanzen zu beeinflussen, welche die Funktion der Neutrophilen hemmen oder Sekretionsprodukte der Neutrophilen neutralisieren.

Eine vorausgegangene Studie prüfte das Antioxidans Ascorbinsäure und den Proteaseinhibitor Ulinastatin, also Substanzen, die zur klinischen Anwendung beim Menschen in einem oder mehreren Länder der Welt zugelassen sind. Diese wurden in Konzentrationen eingesetzt, wie sie bei der klinischen Anwendung erreicht werden können (Hemmer, Lehr et al. 2005).

Aktivierte Neutrophile können das Endothel zum einen durch Freisetzen von reaktiven Sauerstoffspezies schädigen (Harlan, Killen et al. 1981; Varani, Ginsburg et al. 1989). Diese können durch Ascorbinsäure neutralisiert werden (Frei, Stocker et al. 1990). Ascorbinsäure vermindert ferner die Adhäsion zwischen Neutrophilen und Endothel (Jonas, Dwenger et al. 1993).

Zum anderen schädigen die von Neutrophilen sezernierten Proteasen die Endothelzellen. Ulinastatin inaktiviert die Neutrophilen-Elastase, einer der Serinproteasen, die eine Hauptrolle in der neutrophilenvermittelten Endothelzellapoptose spielt, und hemmt zudem ihre Produktion und Sekretion. (Smedly, Tonnesen et al. 1986; Nakatani, Takeshita et al. 2001).

4.3.1 Wirkung der Hemmstoffe Ascorbinsäure und Ulinastatin auf die neutrophilenvermittelte Endothelzellapoptose bei Inkubation der HUVEC mit Seren von Malaria-tropica- und Sepsis-Patienten

Bei Inkubation von Endothelzellen mit Patientenserum und Neutrophilen in Anwesenheit von Ascorbinsäure oder Ulinastatin werden niedrigere Apoptoseraten gesehen als in Abwesenheit dieser Hemmstoffe.

Die Hemmung der durch Neutrophile verstärkten Endothelzellapoptose mittels Ascorbinsäure oder Ulinastatin ist dosisabhängig. In den hier beschriebenen Versuchen hatte Ascorbinsäure eine deutliche antiapoptotische Wirkung in einer Konzentration von 10^{-4} M und Ulinastatin in einer Konzentration von 10^{-6} M. Dies gilt sowohl für die Seren von Malariapatienten als auch für die von Sepsispatienten.

4.3.2 Wirkung der Hemmstoffe Ascorbinsäure und Ulinastatin auf die neutrophilenvermittelte Endothelzellapoptose bei Inkubation der HUVEC mit Überständen von *P. falciparum*, *S. aureus* und *E. coli*

Da in den Versuchen mit Patientensera Ascorbinsäure sich in einer Konzentration von 10^{-4} M und Ulinastatin in einer Konzentration von 10^{-6} M am wirksamsten erwiesen hatte, wurden diese Konzentrationen auch für die Versuche mit Kulturüberständen gewählt. Auch hier führte der Einsatz dieser Hemmstoffe zu einer signifikanten Verminderung der neutrophilenvermittelten Endothelzellapoptose.

Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass im Tierversuch Ulinastatin das Überleben von Hunden mit *E.coli*-Sepsis verbessert (Tani, Aoki et al. 1993) und Mäuse vor bakterieller Infektion schützt (Inoue, Takano et al. 2005). Antioxidantien verhinderten auch cerebrale Malaria bei mit *Plasmodien* infizierten Mäusen (Thumwood, Hunt et al. 1989).

Die hier vorgestellten *in-vitro*-Ergebnisse lassen auch einen günstigen Effekt dieser Substanzen *in-vivo* beim Menschen vermuten, allerdings gibt es hierzu bisher keine klinischen Studien.

Seitdem konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass aktiviertes Protein C im vorliegenden Modell ebenfalls eine antiapoptotische Wirkung zeigt (Hemmer, Lobermann et al. 2011).

4.4 Bedeutung des direkten Kontaktes von Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten über deren Rezeptoren ICAM-1 und LFA-1

Durch die Verhinderung des direkten Kontaktes zwischen den neutrophilen Granulozyten und den Endothelzellen konnte ebenfalls eine Verminderung der Apoptoserate der Endothelzellen erreicht werden. Dies galt für Malaria und Sepsis sowohl für die Versuche mit Patientenseren als auch für diejenigen mit Kulturüberständen. Für die apoptoseverstärkende Wirkung der Neutrophilen ist demnach der direkte Kontakt zwischen Neutrophilen und Endothelzellen erforderlich.

Die Neutrophilen binden über spezifische Liganden-Rezeptor-Interaktionen an Endothelzellen. Da der Ligand LFA-1 der Neutrophilen und der Rezeptor ICAM-1 der Endothelzellen hier wahrscheinlich die Hauptrolle spielen (Cotran and Pober 1990; Turner, Ly et al. 1998; Aldridge 2002), wurde die Wirkung von Antikörpern gegen diese Rezeptoren getestet. Untersucht wurde, ob die Rate apoptotischer Endothelzellen durch Antikörper gegen diese Oberflächenantigene beeinflusst werden konnte.

Durch die Zugabe eines Antikörpers gegen das LFA-1 der Neutrophilen gelang es, die Apoptoserate der Endothelzellen auf das Niveau zu senken, das auch in Abwesenheit von Neutrophilen zu beobachten war.

Dagegen wurde die Apoptoserate durch Zugabe eines Antikörpers gegen ICAM-1 der Endothelzellen nicht vermindert. Vielmehr konnte Anti-ICAM-1 die Apoptoserate, die durch Trennung von Neutrophilen und Endothelzellen vermindert worden war, wieder auf das Niveau anheben, das ohne trennende Siebeinsätze beobachtet wurde. Dies deutet darauf hin, dass im vorliegenden Modell das Binden eines Liganden an ICAM-1 der Endothelzellen zur Endothelzellapoptose beiträgt.

In Kontrollversuchen zeigte sich, dass ICAM-1-Antikörper weder bei Inkubation mit Seren von gesunden Personen noch in Abwesenheit von Neutrophilen die Apoptoserate erhöhen. Somit ist die Wirkung der Anti-ICAM-1-Antikörper wahrscheinlich nicht allein durch eine unspezifische intrinsische Aktivität des

Antikörpers bedingt. Vielmehr sind die Ergebnisse mit der Vermutung kompatibel, dass Neutrophile ihre proapoptotische Wirkung auch durch Binden an ICAM-1 auf aktivierten Endothelzellen ausüben.

Zusammenfassend erhöht die Bindung von Neutrophilen oder von Antikörpern gegen ICAM-1 an Endothelzellen deren Apoptose sowohl bei der Inkubation mit Seren von Malaria-, bzw. Sepsispatienten als auch bei der Inkubation mit Überständen von *P. falciparum*, *E. coli* und *S. aureus*. Dies deutet darauf hin, dass der Rezeptor ICAM-1 im vorliegenden Modell eine proapoptotische Wirkung vermitteln kann.

Anti-LFA-1-Antikörper dagegen können die Bindung von Neutrophilen ans Endothel verhindern und dies scheint die Endothelzellen im vorliegenden Modell vor Apoptose zu schützen.

Die mögliche Bedeutung von ICAM-1 *in vivo* ergibt sich daraus, dass sowohl bei Malaria als auch bei Sepsis *in vivo* und *post mortem* eine erhöhte Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen gesehen wurde (Turner, Morrison et al. 1994; Turner, Ly et al. 1998; Silamut, Phu et al. 1999; Tsokos and Fehlauer 2001).

Von *Plasmodien* und Bakterien produzierte Substanzen können die ICAM-1-Expression am Endothel erhöhen und somit die Möglichkeit der Adhäsion von Neutrophilen an die Endothelzellen verbessern. (Lee, Reid et al. 1995; Schofield, Novakovic et al. 1996; Blease, Chen et al. 1999; Strindhall, Lindgren et al. 2002).

Im Tierversuch konnte der Tod von Mäusen mit cerebraler Malaria durch die Gabe von anti-LFA-1-Antikörpern abgewendet werden (Grau, Pointaire et al. 1991). Anti-ICAM-1 verschlimmerte dagegen die Erkrankung in diesem Modell und beschleunigte das Eintreten des Todes. Der gleiche Effekt konnte durch Anti-ICAM-1-Gabe bei Affen mit *E. coli*-Sepsis gesehen werden (Welty-Wolf, Carraway et al. 2001). Mäuse, denen das ICAM-1-Gen fehlt, sind vor bestimmten Komplikationen, die durch Toxine von *E. coli* oder *S. aureus* ausgelöst werden, geschützt (Xu, Gonzalo et al. 1994).

Somit scheint das Binden von Liganden an ICAM-1 bei Malaria und bei Sepsis den Krankheitsverlauf zu verschlimmern, während das Verhindern des Bindens von Liganden an ICAM-1 den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen kann.

4.5 Fazit und Ausblick

Der Beitrag der neutrophilen Granulozyten zur Endothelzellapoptose bei Malaria und Sepsis im verwendeten *in-vitro*-Modell resultiert wahrscheinlich somit aus mindestens zwei Pathomechanismen: zum einen aus der Aktivierung der Neutrophilen mit konsekutiver Sezernierung reaktiver Sauerstoffspezies und neutrophilenspezifischer Proteasen, zum anderen aus der Interaktion der Adhäsionsmoleküle LFA-1 der Neutrophilen mit dem ICAM-1 der Endothelzellen.

Der hierdurch ausgelöste apoptotische Endothelzellschaden spielt wahrscheinlich in der Pathogenese sowohl der Malaria und als auch der Sepsis eine wichtige Rolle. Daher könnten Therapieansätze, die in diese Mechanismen eingreifen, sowohl bei Malaria, als auch bei Sepsis Erfolg versprechend sein.

Ein Ansatz beruht auf Verabreichen von Ascorbinsäure oder Ulinastatin, die beide in Konzentrationen wirken, die nach Gabe beim Menschen erreicht werden. Ein weiterer Ansatz beruht auf der Gabe von Antikörpern gegen LFA-1, allerdings ist anti-LFA-1 nicht zum Verabreichen beim Menschen verfügbar.

Die Frage, ob sich die getesteten Substanzen zur supportiven Therapie der Malaria und der Sepsis eignen, ist letztendlich nur durch klinische Studien zu beantworten.

5 Zusammenfassung

Malaria ist die weltweit häufigste parasitäre Infektionskrankheit mit 1,5 – 2,7 Millionen Todesfällen pro Jahr. Für die Todesfälle ist fast ausschließlich die Malaria tropica verantwortlich, welche durch *P. falciparum* hervorgerufen wird.

Die bakterielle Sepsis gehört mit zu den gravierendsten intensivmedizinischen Krankheitsbildern und tritt meist als Komplikation einer Grunderkrankung oder Intensivbehandlung auf. Bei jährlich etwa 154 000 Neuerkrankungen und steigender Inzidenz stellt Sepsis in Deutschland die dritthäufigste Todesursache dar. Die häufigsten Erreger sind *E. coli* als Erreger der gramnegativen und *S. aureus* als Erreger der grampositiven Sepsis.

Haupttodesursache bei komplizierter Malaria und Sepsis ist das Multiorganversagen. Als wesentlicher Pathomechanismus des Multiorganversagens wird eine Endothelschädigung angesehen. Diese Arbeit zeigt mögliche Mechanismen der Endothelschädigung durch Apoptose. Produkte der Erreger von Malaria und Sepsis können neutrophile Granulozyten aktivieren, die dann ihrerseits die Apoptose der Endothelzellen induzieren. Dies geschieht einerseits durch Sekretionsprodukte der Neutrophilen wie Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme, andererseits durch den direkten Kontakt zwischen Endothelzellen und Neutrophilen. Aktivierte Endothelzellen exprimieren hierzu das Adhäsionsmolekül ICAM-1, an welches der Ligand LFA-1 der Neutrophilen bindet.

Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob ähnliche Mechanismen bei Malaria und bei Sepsis zur Endothelzellapoptose beitragen.

Endothelzellen aus Nabelschnurvenen wurden mit Serumproben von Malariapatienten, Sepsispatienten oder gesunden Kontrollpersonen, oder mit den Überständen der jeweiligen Krankheitserreger in An- und Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten inkubiert. Anschließend wurden mittels der TUNEL-

Färbung die apoptotischen Endothelzellen detektiert und der prozentuale Anteil der apoptotischen Endothelzellen ermittelt.

Um die Rolle von Sekretionsprodukten der Neutrophilen zu prüfen, wurden die Sekretionsprodukte mit Ascorbinsäure oder Ulinastatin neutralisiert. Durch Verwendung von Siebeinsätzen sowie von Antikörpern gegen die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-1 wurde der Stellenwert des interzellulären Kontaktes zwischen Endothelzellen und Neutrophilen untersucht.

Nach Inkubation der kultivierten Endothelzellen mit Serum von Patienten mit Malaria tropica oder Sepsis durch *E. coli*, bzw. *S. aureus* trat im Vergleich zu der Inkubation mit Serum von gesunden Kontrollpersonen eine höhere Apoptoserate auf. Durch die Zugabe von neutrophilen Granulozyten wurde dieser proapoptotische Effekt deutlich verstärkt.

Die Inkubation der Endothelzellen mit den Kulturüberständen von *P. falciparum*, *E. coli* oder *S. aureus* führte ebenfalls zu einer höheren Apoptoserate als die Inkubation mit Überständen von nicht-malariainfizierten Erythrozyten, oder mit unbenutztem Müller-Hinton-Medium. Auch hier wurde der Anteil der apoptotischen Endothelzellen durch Neutrophile weiter gesteigert.

Im Gegensatz dazu wurde der proapoptotische Effekt von Patientenseren bzw. Erregerkulturüberständen in Kombination mit Neutrophilen durch Ascorbinsäure und Ulinastatin reduziert.

Ferner bewirkte die Zugabe von anti-LFA-1-Antikörpern eine deutliche Verminderung des apoptoseverstärkenden Effektes der Neutrophilen. Eine Verminderung des apoptoseverstärkenden Effektes wurde auch durch die Trennung von Endothelzellen und Neutrophilen mittels membranösen Siebeinsätzen bewirkt.

Die Zugabe von Anti-ICAM-1-Antikörpern konnte die Anzahl apoptotischer Endothelzellen hingegen nicht reduzieren. Stattdessen hoben Anti-ICAM-1-Antikörper die apoptosevermindernde Wirkung der Siebeinsätze auf.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass der Endothelschaden im verwendeten *in-vitro*-Modell nicht nur bei Malaria, sondern auch bei grampositiver oder gramnegativer Sepsis auf Apoptose beruht. Für diesen Endothelschaden sind Substanzen verantwortlich, die von den Erregern stammen, und die Neutrophilen des Wirtes verstärken diesen Schaden. Die apoptoseverstärkende Wirkung der Neutrophilen geschieht einerseits durch Sekretion reaktiver Sauerstoffspezies und der Neutrophilenelastase, andererseits durch den direkten Kontakt zwischen Neutrophilen und Endothelzellen.

Da die gleichen Mechanismen bei Malaria und Sepsis zum Endothelschaden beitragen, könnten die gleichen supportiven Therapiestrategien bei Malaria und Sepsis Nutzen bringen. Daher scheinen klinische Studien mit Ascorbinsäure und Ulinastatin bei Malaria und Sepsis sinnvoll.

Ferner ist die Gabe von Anti-LFA-1-Antikörpern denkbar, allerdings steht derzeit kein Anti-LFA-1-Präparat für die Anwendung beim Menschen zur Verfügung.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

(1992). "American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis." *Crit Care Med* 20(6): 864-74.

(2000). "Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94 Suppl 1: S1-90.

Aldridge, A. J. (2002). "Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome." *Eur J Surg* 168(4): 204-14.

Aliprantis, A. O., D. S. Weiss, et al. (2001). "Release of Toll-like receptor-2-activating bacterial lipoproteins in *Shigella flexneri* culture supernatants." *Infect Immun* 69(10): 6248-55.

Aliprantis, A. O., R. B. Yang, et al. (1999). "Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2." *Science* 285(5428): 736-9.

Aliprantis, A. O., R. B. Yang, et al. (2000). "The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2." *Embo J* 19(13): 3325-36.

Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, et al. (2001). "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care." *Crit Care Med* 29(7): 1303-10.

Bannerman, D. D. and S. E. Goldblum (2003). "Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(6): L899-914.

Barnett, C. C., Jr., E. E. Moore, et al. (1998). "ICAM-1-CD18 interaction mediates neutrophil cytotoxicity through protease release." *Am J Physiol* 274(6 Pt 1): C1634-44.

Bate, C. A., J. Taverne, et al. (1988). "Malarial parasites induce TNF production by macrophages." *Immunology* 64(2): 227-31.

Bate, C. A., J. Taverne, et al. (1989). "Soluble malarial antigens are toxic and induce the production of tumour necrosis factor in vivo." *Immunology* 66(4): 600-5.

Becker, B. F., B. Heindl, et al. (2000). "Endothelial function and hemostasis." *Z Kardiol* 89(3): 160-7.

Blease, K., Y. Chen, et al. (1999). "Lipoteichoic acid inhibits lipopolysaccharide-induced adhesion molecule expression and IL-8 release in human lung microvascular endothelial cells." *J Immunol* 163(11): 6139-47.

Boehme, M. W., E. Werle, et al. (1994). "Serum levels of adhesion molecules and thrombomodulin as indicators of vascular injury in severe *Plasmodium falciparum* malaria." *Clin Investig* 72(8): 598-603.

Bombeli, T., A. Karsan, et al. (1997). "Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant." *Blood* 89(7): 2429-42.

Brown, H., T. T. Hien, et al. (1999). "Evidence of blood-brain barrier dysfunction in human cerebral malaria." *Neuropathol Appl Neurobiol* 25(4): 331-40.

Brun-Buisson, C. (2000). "The epidemiology of the systemic inflammatory response." *Intensive Care Med* 26 Suppl 1: S64-74.

Brunkhorst, F. M. (2006). "[Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]." *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 41(1): 43-4.

Busse, R. (2000). *Gefäßsystem und Kreislaufregulation. Physiologie des Menschen.* R. F. Schmidt, G. Thews and F. Lang. Berlin, Springer-Verlag: 498-561.

Celada, A., A. Cruchoaud, et al. (1983). "Assessment of immune phagocytosis of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells by human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. A method for visualizing infected red blood cells ingested by phagocytes." *J Immunol Methods* 63(2): 263-71.

Celada, A., A. Cruchoaud, et al. (1983). "Phagocytosis of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes by human polymorphonuclear leukocytes." *J Parasitol* 69(1): 49-53.

Chen, Q., M. Schlichtherle, et al. (2000). "Molecular aspects of severe malaria." *Clin Microbiol Rev* 13(3): 439-50.

Combes, V., N. Coltel, et al. (2006). "Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier." *Int J Parasitol* 36(5): 541-6.

Combes, V., T. E. Taylor, et al. (2004). "Circulating endothelial microparticles in malawian children with severe *falciparum* malaria complicated with coma." *Jama* 291(21): 2542-4.

Cotran, R. S. and J. S. Pober (1990). "Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury." *J Am Soc Nephrol* 1(3): 225-35.

Cowley, H. C., D. Heney, et al. (1994). "Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with the systemic inflammatory response syndrome: a prospective cohort study." *Crit Care Med* 22(4): 651-7.

David, P. H., S. M. Handunnetti, et al. (1988). "Rosetting: a new cytoadherence property of malaria-infected erythrocytes." *Am J Trop Med Hyg* 38(2): 289-97.

Day, N. P., T. T. Hien, et al. (1999). "The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria." *J Infect Dis* 180(4): 1288-97.

Detmers, P. A., S. K. Lo, et al. (1990). "Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils." *J Exp Med* 171(4): 1155-62.

Dooley, D. C., J. F. Simpson, et al. (1982). "Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils: a preparative technique using percoll density gradient centrifugation." *Exp Hematol* 10(7): 591-9.

Engel, C., F. M. Brunkhorst, et al. (2007). "Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study." *Intensive Care Med* 33(4): 606-18.

Fenton, R. G. and D. L. Longo (2005). *Krebszellbiologie und Angiogenese*. *Harrisons Innere Medizin*. M. Dietel, Suttrop, N., Zeitz, M., Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L. . Berlin, ABW Wissenschaftsverlag GmbH 481-492.

Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, et al. (1991). "IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages." *J Immunol* 147(11): 3815-22.

Frei, B., R. Stocker, et al. (1990). "Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma." *Adv Exp Med Biol* 264: 155-63.

Gavrieli, Y., Y. Sherman, et al. (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." *J Cell Biol* 119(3): 493-501.

Gimbrone, M. A., Jr., M. S. Obin, et al. (1989). "Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions." *Science* 246(4937): 1601-3.

Golenser, J., M. Kamyli, et al. (1992). "Correlation between destruction of malarial parasites by polymorphonuclear leucocytes and oxidative stress." *Free Radic Res Commun* 17(4): 249-62.

Grasl-Kraupp, B., B. Ruttkay-Nedecky, et al. (1995). "In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note." *Hepatology* 21(5): 1465-8.

Grau, G. E., L. F. Fajardo, et al. (1987). "Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria." *Science* 237(4819): 1210-2.

Grau, G. E., P. F. Piguet, et al. (1989). "Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data." *Immunol Rev* 112: 49-70.

Grau, G. E., P. Pointaire, et al. (1991). "Late administration of monoclonal antibody to leukocyte function-antigen 1 abrogates incipient murine cerebral malaria." *Eur J Immunol* 21(9): 2265-7.

Hantke, M., K. Holzer, et al. (2000). "[The SOFA score in evaluating septic illnesses. Correlations with the MOD and APACHE II score]." *Chirurg* 71(10): 1270-6.

Harlan, J. M., P. D. Killen, et al. (1981). "Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro mechanisms of cell detachment." *J Clin Invest* 68(6): 1394-403.

Hasnain, S. E., R. Begum, et al. (2003). "Host-pathogen interactions during apoptosis." *J Biosci* 28(3): 349-58.

Hattar, K., U. Grandel, et al. (2006). "Lipoteichoic acid (LTA) from *Staphylococcus aureus* stimulates human neutrophil cytokine release by a CD14-dependent, Toll-like receptor-independent mechanism: Autocrine role of tumor necrosis factor-[alpha] in mediating LTA-induced interleukin-8 generation." *Crit Care Med* 34(3): 835-41.

Haynes, B. F. and A. S. Fauci (2005). Einführung in das Immunsystem. *Harrisons Innere Medizin*. M. Dietel, Suttrop, N., Zeitz, M., Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L. . Berlin, ABW Wissenschaftsverlag GmbH 2052-2074.

Hemmer, C. J., A. Bierhaus, et al. (1994). "Elevated thrombomodulin plasma levels as a result of endothelial involvement in *Plasmodium falciparum* malaria." *Thromb Haemost* 72(3): 457-64.

Hemmer, C. J., H. A. Lehr, et al. (2005). "*Plasmodium falciparum* Malaria: reduction of endothelial cell apoptosis in vitro." *Infect Immun* 73(3): 1764-70.

Hemmer, C. J., M. Lobermann, et al. (2011). "Activated protein C protects vascular endothelial cells from apoptosis in malaria and in sepsis." *Trop Med Int Health* 16(8): 906-13.

Ho, M., M. M. Sexton, et al. (1995). "Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor production but not antigen-specific lymphoproliferation in acute *Plasmodium falciparum* malaria." *J Infect Dis* 172(3): 838-44.

Ho, M., B. Singh, et al. (1991). "Clinical correlates of in vitro Plasmodium falciparum cytoadherence." *Infect Immun* 59(3): 873-8.

Hof, H. (2002). *Medizinisch relevante Protozoen, Sporozoen, Plasmodien. Duale Reihe: Medizinische Mikrobiologie* H. Hof, Dörries, R. Stuttgart, Georg Thieme Verlag 491-499.

Holst, F. G., C. J. Hemmer, et al. (1999). "Low levels of fibrin-stabilizing factor (factor XIII) in human Plasmodium falciparum malaria: correlation with clinical severity." *Am J Trop Med Hyg* 60(1): 99-104.

Horstman, L. L., W. Jy, et al. (2004). "Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction." *Front Biosci* 9: 1118-35.

Horstmann, R. D., J. H. Ehrich, et al. (1985). "[Fatal complications of tropical malaria in non-immune patients. A retrospective clinico-pathologic analysis of 25 cases]." *Dtsch Med Wochenschr* 110(43): 1651-6.

Hotchkiss, R. S. and I. E. Karl (2003). "The pathophysiology and treatment of sepsis." *N Engl J Med* 348(2): 138-50.

Hotchkiss, R. S. and D. W. Nicholson (2006). "Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis." *Nat Rev Immunol* 6(11): 813-22.

Hotchkiss, R. S., P. E. Swanson, et al. (1999). "Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction." *Crit Care Med* 27(7): 1230-51.

Hotchkiss, R. S., K. W. Tinsley, et al. (2003). "Role of apoptotic cell death in sepsis." *Scand J Infect Dis* 35(9): 585-92.

Hotchkiss, R. S., K. W. Tinsley, et al. (2002). "Endothelial cell apoptosis in sepsis." *Crit Care Med* 30(5 Suppl): S225-8.

Huy, N. T., D. T. Trang, et al. (2006). "Leukocyte activation by malarial pigment." *Parasitol Int* 55(1): 75-81.

Hviid, L., T. G. Theander, et al. (1993). "Increased plasma levels of soluble ICAM-1 and ELAM-1 (E-selectin) during acute *Plasmodium falciparum* malaria." *Immunol Lett* 36(1): 51-8.

Inoue, K., H. Takano, et al. (2005). "Urinary trypsin inhibitor protects against systemic inflammation induced by lipopolysaccharide." *Mol Pharmacol* 67(3): 673-80.

Ishii, H., H. Uchiyama, et al. (1991). "Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells." *Thromb Haemost* 65(5): 618-23.

Jackson, M. H., A. M. Millar, et al. (1989). "Neutrophil activation during cell separation procedures." *Nucl Med Commun* 10(12): 901-4.

Jaffe, E. A., R. L. Nachman, et al. (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." *J Clin Invest* 52(11): 2745-56.

Jimenez, J. J., W. Jy, et al. (2003). "Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis." *Thromb Res* 109(4): 175-80.

Jonas, E., A. Dwenger, et al. (1993). "In vitro effect of ascorbic acid on neutrophilendothelial cell interaction." *J Biolumin Chemilumin* 8(1): 15-20.

Kawasaki, M., K. Kuwano, et al. (2000). "Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor." *Am J Pathol* 157(2): 597-603.

Kern, P., C. J. Hemmer, et al. (1989). "Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria." *Am J Med* 87(2): 139-43.

Kharazmi, A. and S. Jepsen (1984). "Enhanced inhibition of in vitro multiplication of *Plasmodium falciparum* by stimulated human polymorphonuclear leucocytes." *Clin Exp Immunol* 57(2): 287-92.

Kharazmi, A., S. Jepsen, et al. (1987). "Generation of reactive oxygen radicals by human phagocytic cells activated by *Plasmodium falciparum*." *Scand J Immunol* 25(4): 335-41.

Kratzius, M. (2010). In-vitro-Untersuchungen über die Rolle verschiedener Blutzellen bei der Entwicklung des Endothelschadens bei *Malaria tropica*.

Kwiatkowski, D., A. V. Hill, et al. (1990). "TNF concentration in fatal cerebral, nonfatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria." *Lancet* 336(8725): 1201-4.

Kwiatkowski, D., M. E. Molyneux, et al. (1993). "Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria." *Q J Med* 86(2): 91-8.

Labat-Moleur, F., C. Guillermet, et al. (1998). "TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement." *J Histochem Cytochem* 46(3): 327-34.

Langreth, S. G. and E. Peterson (1985). "Pathogenicity, stability, and immunogenicity of a knobless clone of *Plasmodium falciparum* in Colombian owl monkeys." *Infect Immun* 47(3): 760-6.

Le Tulzo, Y., C. Pangault, et al. (2002). "Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome." *Shock* 18(6): 487-94.

Lee, C. H., Y. A. Reid, et al. (1995). "Lipopolysaccharide-induced differential cell surface expression of intercellular adhesion molecule-1 in cultured human umbilical cord vein endothelial cells." *Shock* 3(2): 96-101.

Lotz, S., E. Aga, et al. (2004). "Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2." *J Leukoc Biol* 75(3): 467-77.

Luder, C. G., U. Gross, et al. (2001). "Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions." *Trends Parasitol* 17(10): 480-6.

Luscher, T. F. and M. Barton (1997). "Biology of the endothelium." *Clin Cardiol* 20(11 Suppl 2): II-3-10.

Lyke, K. E., R. Burges, et al. (2004). "Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls." *Infect Immun* 72(10): 5630-7.

MacPherson, G. G., M. J. Warrell, et al. (1985). "Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration." *Am J Pathol* 119(3): 385-401.

Malhotra, K., D. Salmon, et al. (1988). "[Stimulation of the chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes in various stages of the intraerythrocyte development of Plasmodium falciparum]." C R Seances Soc Biol Fil 182(3): 270-8.

Martin, G. S., D. M. Mannino, et al. (2003). "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000." N Engl J Med 348(16): 1546-54.

Martins, P. S., M. K. Brunialti, et al. (2008). "Expression of cell surface receptors and oxidative metabolism modulation in the clinical continuum of sepsis." Crit Care 12(1): R25.

May, J., B. Lell, et al. (2000). "Plasma interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications." J Infect Dis 182(5): 1570-3.

Meziani, F., X. Delabranche, et al. (2010). "Bench-to-bedside review: circulating microparticles--a new player in sepsis?" Crit Care 14(5): 236.

Miller, L. H., D. I. Baruch, et al. (2002). "The pathogenic basis of malaria." Nature 415(6872): 673-9.

Muller Kobold, A. C., J. E. Tulleken, et al. (2000). "Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality." Intensive Care Med 26(7): 883-92.

Munford, R. S. (2005). Sepsis und septischer Schock. Harrisons Innere Medizin. M. Dietel, Suttorp, N., Zeitz, M., Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.s., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L. . Berlin, ABW Wissenschaftsverlag GmbH 2: 1721-1727.

Mutunga, M., B. Fulton, et al. (2001). "Circulating endothelial cells in patients with septic shock." Am J Respir Crit Care Med 163(1): 195-200.

Mzayek, F., J. Ylostalo, et al. (2008). "Apoptosis of endothelial cells in bacterial sepsis and severe Plasmodium falciparum malaria: do we know enough to consider clinical trials?" Crit Care Med 36(9): 2690-2.

Nachman, R. L. and E. A. Jaffe (2004). "Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology." J Clin Invest 114(8): 1037-40.

Nakatani, K., S. Takeshita, et al. (2001). "Inhibitory effect of serine protease inhibitors on neutrophil-mediated endothelial cell injury." J Leukoc Biol 69(2): 241-7.

Negoescu, A., C. Guillermet, et al. (1998). "Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity." Biomed Pharmacother 52(6): 252-8.

Newbold, C., P. Warn, et al. (1997). "Receptor-specific adhesion and clinical disease in Plasmodium falciparum." Am J Trop Med Hyg 57(4): 389-98.

Newbold, C. I., A. G. Craig, et al. (1997). "PfEMP1, polymorphism and pathogenesis." Ann Trop Med Parasitol 91(5): 551-7.

Nguyen, P. H., N. Day, et al. (1995). "Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria." Trans R Soc Trop Med Hyg 89(2): 200-4.

Oberholzer, C., A. Oberholzer, et al. (2001). "Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration." Faseb J 15(6): 879-92.

Othoro, C., A. A. Lal, et al. (1999). "A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya." J Infect Dis 179(1): 279-82.

Pankoui Mfonkeu, J. B., I. Gouado, et al. (2010). "Elevated cell-specific microparticles are a biological marker for cerebral dysfunctions in human severe malaria." *PLoS One* 5(10): e13415.

Patnaik, J. K., B. S. Das, et al. (1994). "Vascular clogging, mononuclear cell margination, and enhanced vascular permeability in the pathogenesis of human cerebral malaria." *Am J Trop Med Hyg* 51(5): 642-7.

Perlmann, P. and M. Troye-Blomberg (2002). "Malaria and the immune system in humans." *Chem Immunol* 80: 229-42.

Peyron, F., N. Burdin, et al. (1994). "High levels of circulating IL-10 in human malaria." *Clin Exp Immunol* 95(2): 300-3.

Pichyangkul, S., P. Saengkrai, et al. (1997). "Regulation of leukocyte adhesion molecules CD11b/CD18 and leukocyte adhesion molecule-1 on phagocytic cells activated by malaria pigment." *Am J Trop Med Hyg* 57(4): 383-8.

Pino, P., I. Vouldoukis, et al. (2003). "Plasmodium falciparum--infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells." *J Infect Dis* 187(8): 1283-90.

Pober, J. S. and R. S. Cotran (1990). "The role of endothelial cells in inflammation." *Transplantation* 50(4): 537-44.

Porta, J., A. Carota, et al. (1993). "Immunopathological changes in human cerebral malaria." *Clin Neuropathol* 12(3): 142-6.

Pukrittayakamee, S., R. Clemens, et al. (1992). "Polymorphonuclear leucocyte elastase in Plasmodium falciparum malaria." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86(6): 598601.

Russell, J. A., J. Boyd, et al. (2011). "Molecular mechanisms of sepsis." *Contrib Microbiol* 17: 48-85.

Russwurm, S., J. Vickers, et al. (2002). "Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction." *Shock* 17(4): 263-8.

Sands, K. E., D. W. Bates, et al. (1997). "Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers." *Jama* 278(3): 234-40.

Schofield, L., S. Novakovic, et al. (1996). "Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction." *J Immunol* 156(5): 1886-96.

Schuster, H.-P., Müller-Werdan, Ursula, Ed. (2005). *Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen. Sepsis und MODS.* Heidelberg, Springer Verlag.

Shioiri, T., M. Muroi, et al. (2009). "Caspase-3 is activated and rapidly released from human umbilical vein endothelial cells in response to lipopolysaccharide." *Biochim Biophys Acta* 1792(10): 1011-8.

Silamut, K., N. H. Phu, et al. (1999). "A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain." *Am J Pathol* 155(2): 395-410.

Smedly, L. A., M. G. Tonnesen, et al. (1986). "Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase." *J Clin Invest* 77(4): 1233-43.

Smith, C. W., R. Rothlein, et al. (1988). "Recognition of an endothelial determinant for CD 18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration." *J Clin Invest* 82(5): 1746-56.

Soriano, A. O., W. Jy, et al. (2005). "Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis." *Crit Care Med* 33(11): 2540-6.

Staunton, D. E., S. D. Marlin, et al. (1988). "Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families." *Cell* 52(6): 925-33.

Stefanec, T. (2000). "Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease?" *Chest* 117(3): 841-54.

Strindhall, J., P. E. Lindgren, et al. (2002). "Variations among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* to induce expression of E-selectin and ICAM-1 in human endothelial cells." *FEMS Immunol Med Microbiol* 32(3): 227-35.

Suzuki, K., T. Murakami, et al. (2011). "Human anti-microbial cathelicidin peptide LL37 suppresses the LPS-induced apoptosis of endothelial cells." *Int Immunol* 23(3): 185-93.

Talbott, G. A., S. R. Sharar, et al. (1994). "Leukocyte-endothelial interactions and organ injury: the role of adhesion molecules." *New Horiz* 2(4): 545-54.

Tani, T., H. Aoki, et al. (1993). "Treatment of septic shock with a protease inhibitor in a canine model: a prospective, randomized, controlled trial." *Crit Care Med* 21(6): 925-30.

Taverne, J., J. Tavernier, et al. (1987). "Recombinant tumour necrosis factor inhibits malaria parasites in vivo but not in vitro." *Clin Exp Immunol* 67(1): 1-4.

Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." *Science* 281(5381): 1312-6.

Thornton, S. C., S. N. Mueller, et al. (1983). "Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation." *Science* 222(4624): 623-5.

Thumwood, C. M., N. H. Hunt, et al. (1989). "Antioxidants can prevent cerebral malaria in *Plasmodium berghei*-infected mice." *Br J Exp Pathol* 70(3): 293-303.

Toure, F. S., O. Ouwe-Missi-Oukem-Boyer, et al. (2008). "Apoptosis: a potential triggering mechanism of neurological manifestation in *Plasmodium falciparum* malaria." *Parasite Immunol* 30(1): 47-51.

Trager, W. and J. B. Jensen (1976). "Human malaria parasites in continuous culture." *Science* 193(4254): 673-5.

Tripathi, A. K., W. Sha, et al. (2009). "*Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce NF-kappaB regulated inflammatory pathways in human cerebral endothelium." *Blood* 114(19): 4243-52.

Tripathi, A. K., D. J. Sullivan, et al. (2006). "*Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF-kappaB." *Infect Immun* 74(6): 3262-70.

Tsiotou, A. G., G. H. Sakorafas, et al. (2005). "Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective." *Med Sci Monit* 11(3): RA76-85.

Tsokos, M. and F. Fehlauer (2001). "Post-mortem markers of sepsis: an immunohistochemical study using VLA-4 (CD49d/CD29) and ICAM-1 (CD54) for the detection of sepsis-induced lung injury." *Int J Legal Med* 114(4-5): 291-4.

Turner, G. D., V. C. Ly, et al. (1998). "Systemic endothelial activation occurs in both mild and severe malaria. Correlating dermal microvascular endothelial cell phenotype and soluble cell adhesion molecules with disease severity." *Am J Pathol* 152(6): 1477-87.

Turner, G. D., H. Morrison, et al. (1994). "An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration." *Am J Pathol* 145(5): 1057-69.

Varani, J., I. Ginsburg, et al. (1989). "Endothelial cell killing by neutrophils. Synergistic interaction of oxygen products and proteases." *Am J Pathol* 135(3): 435-8.

Vincent, J. L. (2006). "Organ dysfunction in patients with severe sepsis." *Surg Infect (Larchmt)* 7 Suppl 2: S69-72.

Vincent, J. L., R. Moreno, et al. (1996). "The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine." *Intensive Care Med* 22(7): 707-10.

Weatherall, D. J., L. H. Miller, et al. (2002). "Malaria and the red cell." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 35-57.

Weber, S. U., J. C. Schewe, et al. (2004). "[Apoptosis as a pathomechanism in sepsis]." *Anaesthesist* 53(1): 59-65.

Welty-Wolf, K. E., M. S. Carraway, et al. (2001). "Antibody to intercellular adhesion molecule 1 (CD54) decreases survival and not lung injury in baboons with sepsis." *Am J Respir Crit Care Med* 163(3 Pt 1): 665-73.

Westlin, W. F. and M. A. Gimbrone, Jr. (1993). "Neutrophil-mediated damage to human vascular endothelium. Role of cytokine activation." *Am J Pathol* 142(1): 117-28.

Wheeler, M. E., F. W. Luscinskas, et al. (1988). "Cultured human endothelial cells stimulated with cytokines or endotoxin produce an inhibitor of leukocyte adhesion." *J Clin Invest* 82(4): 1211-8.

White, N. and J. Breman (2005). *Malaria und Babesiose: Parasitäre Erkrankungen der Erythrozyten. Harrisons Innere Medizin.* M. Dietel, Suttorp, N., Zeitz, M., Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L. . Berlin, ABW Wissenschaftsverlag GmbH 1309-1323.

Williams, G. T. (1994). "Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens." *Trends Microbiol* 2(12): 463-4.

Wilson, N. O., M. B. Huang, et al. (2008). "Soluble factors from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce apoptosis in human brain vascular endothelial and neuroglia cells." *Mol Biochem Parasitol* 162(2): 172-6.

Xu, H., J. A. Gonzalo, et al. (1994). "Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice." *J Exp Med* 180(1): 95-109.

6.2 Materialien

Geräte

Inversions-Fluoreszenzmikroskop Axiovert	Zeiss, Jena
Elektronisches Lichtmikroskop Typ CK40-F200	Olympus optical, Japan
CO₂-Brutschrank	Heraeus, Hanau
Abott Cell Counter, CELL-DYN 3500	Abbott Laboratories, USA
Zentrifuge Biofuge stratos Baujahr 1999	Heraeus
Sterile Werkbank: Hera Safe HS 12	Heraeus

Verbrauchsmaterialien

Kulturflaschen	Merck Eurolag GmbH
SFCA-Bottle Top Filter 50mm, für 150ml, 75mm Diameter Membran, 45mm Neck; 0,2µm Pore Size	Nalgene, USA
Sterile Kulturplatten mit 96 Vertiefungen (Flachboden): „96-Well-Platten“	Nuncon™ Delta Surface, Dänemark
Anopore® transwell sieve inserts	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark

Reagenzien

Aceton	Mallinckrodt-Baker
Albumax II	Gibco Labs, Grand Island, New York
Albumin, bovine, Fraktion V, 96%	Sigma, USA
Antibiotic Antimycotic Solution, steril (10.000 units Penicillin + 10 mg Streptomycin + 25µg Amphotericin B) /ml	Gibco Labs, Grand Island, New York

Aqua ad injectabilia	Baxter, Unterschleißheim
Calciumchlorid, CaCl-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Citrat 3%	Sigma, München
DABCO (1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan)	Sigma, München
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement)	Intracel Corporation, Rockville MD, USA
FBS (Fetal Bovine Serum), steril	Hy-Clone Laboratories, Lagon, Utah, USA
Gelatine	Sigma, München
Glucose, D-(+)-Glucose	Sigma, USA
Glutamin, L-Glutamin	Gibco Labs, Grand Island, New York
Glycerin	Sigma, München
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kollagenase 440 units/mg, 1,6 FALGPA-units/mg	Sigma, USA
Magnesiumchlorid, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Methanol Analytic Reagent	Lab-Scan
Müller-Hinton-Medium	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Mallinckrodt-Baker
Percoll®, Dichte 1.130 +/- 0.005 g/ml, pH 8,9 +/- 0,3 bei 20°C	Amersham Biosciences AB Uppsala, Schweden
Polymycin B	Gibco Labs, Grand Island, New York
Porcine Heparin Heparin Sodium Salt	Sigma, USA
Triton®100x, Alkylphenylpolyethylenglycol	Merck, Darmstadt
Trypsin EDTA	Gibco Labs, Grand Island, New York

Hemmstoffe**Ascorbinsäure (Vitamin C)**

Jenapharm, Jena

Ulinastatin

Mochida Co., Tokyo, Japan

Bakterienstämme***Escherichia coli***, American Type Promochem, Wesel

Culture Collection Nr.: 25922

Staphylococcus aureus, American Promochem, Wesel

Type Culture Collection Nr.: 29213

Färbesubstanz / Antikörper**TUNEL kit (In Situ Cell Death Detection)** Roche Diagnostics, Mannheim**Leukocyte Function Antigen 1 –**

Acris Antibodies, Hiddenhausen

Antikörper (anti-LFA1;CD11b)**Intercellular Adhesion Molecule 1 –**

R&D Systems, Wiesbaden

Antikörper (anti-ICAM-1;CD 54)

Puffer, Medien und Lösungen**CB⁻ - Puffer, 10fach konzentriert**

Aqua ad injectabilia	700 ml
Glucose	20,0 g
HEPES	23,8 g
MgCl ₂	1,9 g
NaCl	80,0 g
KCl	3,0 g

Zur Herstellung des Puffers werden alle Chemikalien zusammengegeben, auf pH 7,4 eingestellt, auf 1000ml aufgefüllt und sterilfiltriert. Der Puffer wird in 10facher Konzentration auf Vorrat hergestellt und vor Benutzung mit Aqua ad injectabilia 1:10 verdünnt.

CB⁺ - Puffer, 10fach konzentriert

Aqua ad injectabilia	700 ml
Glucose	20,0 g
HEPES	23,8 g
MgCl ₂	1,9 g
NaCl	80,0 g
KCl	3,0 g
CaCl ₂	3,68 g

Zur Herstellung des Puffers werden alle Chemikalien zusammengegeben, auf pH 7,4 eingestellt, auf 1000ml aufgefüllt und sterilfiltriert. Der Puffer wird in 10facher Konzentration auf Vorrat hergestellt und vor Benutzung mit Aqua ad injectabilia 1:10 verdünnt.

PBS-Puffer, einfach konzentriert

Aqua ad injectabilia	ad 1000 ml
Dikaliumhydrogenphosphat	0,57 g

Kaliumdihydrogenphosphat	0,34 g
Natriumchlorid	7,6 g

Der pH wird mit NaOH oder Phosphorsäure auf 7,4 eingestellt, und der Puffer autoklaviert.

Vollmedium

Antibiotic-Antimycotic	5 ml
ECGF	28,0 mg
FBS	100 ml
HEPES	7 ml
L-Glutamin	5 ml
Polymycin B	500 µl
Porcine Heparin	30,0 mg

Diese Substanzen werden mit 400ml RPMI 1640 Medium gelöst und dann wird der pH mit NaOH oder HCl auf 7,4 eingestellt. Das fertige Medium wird sterilfiltriert.

Sparmedium

Antibiotic-Antimycotic	5 ml
HEPES	7ml
L-Glutamin	5 ml
Polymycin B	500 µl

Diese Substanzen werden mit 400ml RPMI 1640 Medium gelöst und dann wird der pH mit NaOH oder HCl auf 7,4 eingestellt. Das fertige Medium wird sterilfiltriert.

Kollagenaselösung

Albumin (BSA)	5,0 g
CB ⁻ - Puffer	50 ml
Kollagenase	250 mg

Diese Zutaten werden in 500ml CB⁻-Puffer gelöst, bei 3900g zwecks Sedimentierung und Eliminierung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert und dann sterilfiltriert.

BSA-Lösung (1%)

Aqua ad injectabilia	50 ml
BSA	0.5 g

Permeabilisierungslösung (0,1% Triton® X-100/0,1%NaCl)

PBS-Puffer	26 ml
Natriumcitrat-Puffer	3 ml
Triton (10x)	1 ml

DABCO-haltige Lösung

DABCO (1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan)	1200 mg
Glycerin (87%)	100 ml
PBS (einfach)	100 ml

Diese Lösung muss im Kühlschrank lichtgeschützt aufbewahrt werden.

Percoll®-Gradienten**Dichte von 1,098 g/ml**

PBS (einfach)	2,2 ml
Percoll® (90%)	7,8 ml

Dichte von 1,090 g/ml

PBS (einfach)	3,0 ml
Percoll® (90%)	7,0 ml

Dichte von 1,081 g/ml

PBS (einfach)	3,7 ml
Percoll® (90%)	6,3 ml

Gelatine

Aqua ad injectabilia	100 ml
Gelatine	2,0 g
Polymycin B	200 µl

Aqua ad injectabilia und Gelatine werden zusammen eine Stunde bei 56°C erwärmt, Polymycin B hinzugefügt und anschließend sterilfiltriert.

6.3 Thesen

- (1) Malaria ist die weltweit häufigste parasitäre Infektionskrankheit. Für die Todesfälle ist fast ausschließlich die Malaria tropica verantwortlich, welche durch *P. falciparum* hervorgerufen wird. Die bakterielle Sepsis gehört mit zu den gravierendsten intensivmedizinischen Krankheitsbildern und tritt meist als Komplikation einer Grunderkrankung oder Intensivbehandlung auf. Sepsis stellt in Deutschland die dritthäufigste Todesursache dar. Die häufigsten Erreger sind *E. coli* als Erreger der gramnegativen und *S. aureus* als Erreger der grampositiven Sepsis.
- (2) Haupttodesursache bei komplizierter Malaria und Sepsis ist das Multiorganversagen. Als wesentlicher Pathomechanismus des Multiorganversagens wird eine Endothelschädigung angesehen. Diese Arbeit zeigt mögliche Mechanismen der Endothelschädigung durch Apoptose.
- (3) Produkte der Erreger von Malaria und Sepsis können neutrophile Granulozyten aktivieren, die dann ihrerseits die Apoptose der Endothelzellen induzieren. Dies geschieht einerseits durch Sekretionsprodukte der Neutrophilen wie reaktive Sauerstoffspezies und proteolytische Enzyme, andererseits durch den direkten Kontakt zwischen Endothelzellen und Neutrophilen. Endothelzellen exprimieren hierzu das Adhäsionsmolekül ICAM-1, an welches der Ligand LFA-1 der Neutrophilen bindet.
- (4) Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob ähnliche Mechanismen bei Malaria und bei Sepsis zur Endothelzellapoptose beitragen.
- (5) Endothelzellen aus Nabelschnurvenen wurden mit Serumproben von Malariapatienten, Sepsispatienten oder gesunden Kontrollpersonen oder mit den Überständen der jeweiligen Krankheitserreger in An- und Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten inkubiert. Anschließend wurden mittels der TUNELFärbung die apoptotischen Endothelzellen detektiert und der prozentuale Anteil der apoptotischen Endothelzellen ermittelt.

- (6) Um die Rolle von Sekretionsprodukten der Neutrophilen zu prüfen, wurden die Sekretionsprodukte mit Ascorbinsäure und Ulinastatin neutralisiert. Durch Verwendung von Siebeinsätzen sowie von Antikörpern gegen die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-1 wurde der Stellenwert des interzellulären Kontaktes zwischen Endothelzellen und Neutrophilen untersucht.
- (7) Nach Inkubation der kultivierten Endothelzellen mit Serum von Patienten mit Malaria tropica oder Sepsis durch *E. coli*, oder *S. aureus* beziehungsweise mit Kulturüberständen der entsprechenden Erreger trat im Vergleich zu der Inkubation mit Serum von gesunden Kontrollpersonen beziehungsweise mit Kontrollüberständen eine höhere Apoptoserate auf. Durch die Zugabe von neutrophilen Granulozyten wurde dieser proapoptotische Effekt deutlich verstärkt.
- (8) Der proapoptotische Effekt von Patientenserum und Erregerkulturüberständen in Anwesenheit von Neutrophilen wurde durch Ascorbinsäure und Ulinastatin reduziert.
- (9) Die Zugabe von anti-LFA-1-Antikörpern bewirkte eine deutliche Verminderung des apoptoseverstärkenden Effektes der Neutrophilen. Die gleiche Wirkung auf die Apoptoserate hatte die Trennung von Endothelzellen und Neutrophilen mittels membranöser Siebeinsätze. Die Zugabe von Anti-ICAM-1-Antikörpern konnte die Anzahl apoptotischer Endothelzellen hingegen nicht reduzieren. Stattdessen hoben Anti-ICAM-1-Antikörper die apoptosevermindernde Wirkung der Siebeinsätze auf.
- (10) Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass der Endothelschaden im verwendeten *in-vitro*-Modell nicht nur bei Malaria tropica, sondern auch bei grampositiver und gramnegativer Sepsis auf Apoptose beruht.
- (11) Für die Vermittlung der Endothelapoptose sind Substanzen verantwortlich, die von den Erregern stammen und die Neutrophilen des Wirtes verstärken diesen

Schaden. Die apoptoseverstärkende Wirkung der Neutrophilen geschieht einerseits über reaktive Sauerstoffspezies und die Neutrophilenelelastase, andererseits durch den direkten Kontakt zwischen Neutrophilen und Endothelzellen.

(12) Da die gleichen Mechanismen zum Endothelschaden bei Malaria und Sepsis beitragen, könnten die gleichen supportiven Therapiestrategien bei Malaria und Sepsis Nutzen bringen. Daher scheinen klinische Studien mit Ascorbinsäure und Ulinastatin bei Malaria und Sepsis sinnvoll. Ferner ist die Gabe von Anti-LFA-1-Antikörpern denkbar, allerdings steht derzeit kein Anti-LFA-1-Präparat für die Anwendung beim Menschen zur Verfügung.

6.4 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig ohne fremde Hilfe und nur unter Nutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Ausland noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Dokortitels nicht vorliegt.

Hamburg, September 2013

Anna Vogt

6.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anna Miriam Vogt
Wohnort: Lutterothstraße 62, 20255 Hamburg
Geburtstag: 31. Juli 1980
Geburtsort: Starnberg, Deutschland
Lebensstand: ledig
Nationalität: deutsch

Beruflicher Werdegang

Seit 02/2013 Fachärztin für Frauenheilkunde und Geburtshilfe in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe in der Helios Mariahilf Klinik Hamburg
02/2009-02/2013 Weiterbildung als Assistenzärztin in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe in der Helios Mariahilf Klinik Hamburg
09/2007-01/2009 Weiterbildung als Assistenzärztin in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe im Klinikum Bremen-Mitte

Universitäre Ausbildung

06/2007 Drittes Staatsexamen
04/2006-03/2007 Praktisches Jahr
03/2006 Zweites Staatsexamen
08/2003 Erstes Staatsexamen
08/2002 Physikum

Schulausbildung

07/1999 Abitur am Reuchlin-Gymnasium Pforzheim

6.6 Publikationen

Malaria and bacterial sepsis: Similar mechanisms of endothelial apoptosis and its prevention *in vitro*

Hemmer CJ, Vogt A, Unverricht M, Krause R, Lademann M, Reisinger EC.

Crit Care Med. 2008 Sep;36(9):2562-8

Activated protein C protects vascular endothelial cells from apoptosis in malaria and in sepsis.

Hemmer CJ, Löbermann M, Unverricht M, Vogt A, Krause R, Reisinger EC.

Trop Med Int Health. 2011 Aug;16(8):906-13

6.7 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Reisinger für die Möglichkeit in seiner Abteilung wissenschaftlich zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. habil Hemmer für die Überlassung des Dissertationsthemas, die besonders freundliche Betreuung dieser Arbeit und den stetigen Rat, mit dem er mir zur Seite stand.

Vielen Dank auch meiner Arbeitsgruppe und den Mitarbeitern des parasitologischen Labors, insbesondere Frau Dr. Diana Riebold, für Unterstützung und Geduld bei meinen ersten Kontakten mit der Arbeit im Labor. Ebenso möchte ich Marcus Unverricht für die Einweisung in den Versuchsaufbau und fortwährende Hilfestellung bei der praktischen Umsetzung danken. Für die Bereitstellung der Kulturüberstände von *Plasmodium falciparum* danke ich Prof. Dr. Rolf Walter aus dem Bernhard Nocht Institut in Hamburg. Für die statistischen Auswertungen bin ich Herrn Prof. Dr. ing. habil Günther Kundt zu großem Dank verpflichtet.

Dem Kreißsaalteam der Frauenklinik der Universität Rostock und der gynäkologischen Abteilung des Südstadtklinikums der Hansestadt Rostock danke ich für die gute Kooperation. Ein großes Dankeschön gilt allen Eltern, die die Verwendung der Nabelschnüre gestattet und somit die Verwendung von HUVEC ermöglicht haben.

Eine große Hilfe beim Einstieg in den theoretischen Teil der Arbeit war mir meine Vorgängerin Dr. Manja Kratzius.

Nicht zuletzt und ganz besonders herzlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mir jederzeit liebevoll zur Seite standen und nie aufhörten mich zu motivieren. Mein ausdrücklicher Dank gilt hier meinem Bruder Niclas Vogt und meiner Freundin Stefanie Höper für die tatkräftige Unterstützung und Hilfestellung bei

der Überwindung auftretender Computerprobleme und meinem Vater Dr. Paul Vogt für fleißiges Gegenlesen und hilfreiche Tipps.