

**Aus der Klinik für Anästhesiologie
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Markus A. Weigand)**

**Individuelle und generationsübergreifende
immunologische Spätfolgen
einer überstandenen Sepsis**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)
an der
Medizinischen Fakultät Heidelberg
Der
Ruprecht-Karls-Universität**

**vorgelegt von
Katharina Bomans**

**aus
Pforzheim**

2020

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Hans-Georg Kräusslich

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Markus Alexander Weigand

Für Philipp

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	XI
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XIII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Sepsis	1
1.1.1 Definition und Diagnose.....	1
1.1.2 Pathophysiologie	2
1.2. Das Gedächtnis der angeborenen Immunantwort	8
1.2.1 Die Rolle des Immunmetabolismus im angeborenen Immunsystem	9
1.2.2 Die Rolle der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in der Entwicklung des angeborenen Immunsystems	12
1.3. Generationsübergreifende epigenetische Vererbung	14
1.3.1 Inter- und Transgenerationale epigenetische Effekte	15
1.3.2 Die Rolle der DNA-Methylierung in der männlichen Gametogenese	16
1.3.3 Umweltinduzierte Fehlregulation der DNA-Methylierung während der Spermato-genese und deren Konsequenzen	20
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	21
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1. Material	23
2.1.1. Versuchstiere	23
2.1.2. Zellkulturmedien.....	23
2.1.3. Puffer und Lösungen.....	24
2.1.4. Reagenzien und Chemikalien.....	26
2.1.5. Kommerzielle Kits	27
2.1.6. Oligonukleotide	28
2.1.7. Antikörper.....	29

2.1.8.	Verbrauchsmaterialien	30
2.1.9.	Geräte	31
2.1.10.	Software	32
2.2.	Methoden	33
2.2.1.	Tierexperimentelle Methoden	33
2.2.2.	Zellbiologische Methoden	37
2.2.3.	Durchflusszytometrie	43
2.2.4.	Molekularbiologische Methoden	48
2.2.5.	Enzymgebundener Immunsorbent-Test (ELISA)	56
2.2.6.	Seahorse	57
2.2.7.	Bioinformatik	59
2.2.8.	Statistik	60
3.	ERGEBNISSE	61
3.1.	Induktion einer Sepsis im Mausmodell	61
3.2.	Immunologische Spätfolgen einer überstandenen Sepsis	63
3.2.1.	Einfluss einer Sepsis auf die Milz	63
3.2.2.	Einfluss einer Sepsis auf die systemische Immunantwort	67
3.2.3.	Einfluss einer Sepsis auf die Hämatopoese	69
3.2.4.	Einfluss einer Sepsis auf die Funktionalität naiver Knochenmarkmonozyten	70
3.2.5.	Einfluss einer Sepsis auf den Zellmetabolismus naiver Knochenmark-monozyten 71	
3.2.6.	Einfluss einer Sepsis auf das Transkriptom naiver Knochenmarkmonozyten	74
3.3.	Intergenerationale Effekte einer paternalen Sepsis	78
3.3.1.	Einfluss der Sepsis auf die Funktionalität männlicher Keimzellen	78
3.3.2.	Einfluss der Sepsis auf die DNA-Methylierung männlicher Keimbahnzellen	79
3.3.3.	Einfluss der Sepsis auf das Hodenmilieu	83
3.3.4.	Einfluss einer paternalen Sepsis auf die Entwicklung der Nachkommen	83
3.3.5.	Einfluss einer paternalen Sepsis auf die systemische Immunantwort der Nachkommen	86
3.3.6.	Einfluss einer paternalen Sepsis auf die pulmonale Immunfunktion der Nachkommen	91
4.	DISKUSSION	93

4.1. Sepsis induziert einen Status der trainierten Immunität in naiven Monozyten des Knochenmarks.....	93
4.2. Sepsis führt zu einem genetischen Imprinting der männlichen Keimbahn und induziert Immunsuppression in den Nachkommen.....	101
4.3. Schlussfolgerung und Ausblick.....	106
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	108
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	110
7. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN.....	124
7.1. Veröffentlichungen dieser Arbeit.....	124
Publikationen (peer-reviewed).....	124
Vorträge	124
Abstracts und Poster	125
7.2. Weitere eigene Veröffentlichungen.....	125
Publikationen (peer-reviewed).....	125
Vorträge	125
Abstracts und Poster	126
8. LEBENSLAUF.....	127
9. DANKSAGUNG.....	129
10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	130

Abkürzungsverzeichnis

2-DG	2-Deoxyglucose
5caC	5-carboxycytosin
5fC	5-formylcytosin
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
ADP	Adenosindiphosphat
AID	<i>activation-induced deaminase</i>
AKT	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	<i>antigen presenting cell</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basen-Exizionsreperatur
BCG	Bacille Calmette Guerin
BSA	bovines Serumalbumin
CARS	<i>compensatory antiinflammatory response syndrome</i>
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CGI	CpG Insel
CMP	<i>common myeloid progenitor</i>
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i>
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CLR	<i>c-type lectin receptor</i>
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
DAMP	<i>damage associated molecular pattern</i>
DC	Dendritische Zelle
dmC	<i>differentially methylated cytosine</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonischer Tag
ECAR	<i>extracellular acidification rate</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESC	<i>embryonic stem cell</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBS	Fetales bovines Serum
FCCP	<i>Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone</i>
GDA	Guanin-Deaminase
gDNA	genomische DNA
glycoPER	glycolytische Protoneneffluxrate
GMP	<i>granulocyte-monocyte progenitor</i>
GMP	Guaninmonophosphat
GO	<i>gene ontology</i>
HAL	Histidin-Deaminase
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
Hk2	Hexokinase 2
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HSPC	<i>hematopoetic stem and progenitor cell</i>
Jak	Januskinase
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
IL	Interleukin
IM	Immotil
LPS	Lipopolysaccharid
LT-HSC	<i>long-term HSC</i>
MCP	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>
MEP	<i>megakaryocyte-erythrocyte progenitor</i>
miRNA	microRNA
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MPP	multipotent progenitor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
NaCl	Natriumchlorid

NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NLRP3	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing 3</i>
Nme7	<i>Nucleoside diphosphate kinase 7</i>
NP	<i>non-progressive</i>
OCR	<i>oxygen consumption rate</i>
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PAMP	<i>pathogen-associated molecur pattern</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PER	Protoneneffluxrate
PFA	Paraformaldehyd
PGC	<i>primordial germ cell</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PPP	<i>pentose phosphate pathway</i>
PR	progressiv
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qRT-PCR	quantitative realtime PCR
RGE	relative Genexpression
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
Rot/AA	Rotenone/Antimycin A
Rpe	Ribulosephosphat-3-Epimerase
RRBS	<i>reduced representation bisulfite sequencing</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SOFA	<i>Sepsis-related organ failure assessment</i>
SPF	spezifiziert Pathogenfrei
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
ST-HSC	<i>short-term HSC</i>
TET	<i>ten-eleven-translocation</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle

TIRAP	<i>Toll/interleukin-1 receptor [TIR] domain- containing adapter protein</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
T _{reg} -Zelle	regulatorische T-Zelle
TRAM	<i>TRIF-related adapter molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
XDH	Xanthin-Dehydrogenase
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grafische Darstellung der Sepsis-3-Definition.	2
Abbildung 2: Die Immunlage im Sepsis-Verlauf.	3
Abbildung 3: PRR Signalkaskaden in der Sepsis.	6
Abbildung 4: Mechanismen im Gedächtnis der angeborenen Immunantwort.	9
Abbildung 5: Die aerobe Glykolyse ist ein zentraler Mechanismus der trainierten Immunität.	11
Abbildung 6: Übersicht über den zellulären Metabolismus in trainierten myeloiden Immunzellen.	12
Abbildung 7: Hämatopoese der myeloiden Linie.	13
Abbildung 8: Inter- und transgenerationale Definitionen.	16
Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der DNA-Methylierung während der männlichen Gametogenese der Maus.	19
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Fragestellungen, die in dieser Arbeit evaluiert wurden.	22
Abbildung 11: Zählfeld des Neubauer improved Hämozytometers.	40
Abbildung 12: Gating-Strategie zur Analyse von Immunzellpopulationen im Vollblut.	44
Abbildung 13: Gating-Strategie zur Untersuchung der Frequenz von Immunzellen der Milz.	45
Abbildung 14: Gating-Strategie zur Identifizierung von HSC und verschiedenen Progenitorzellen.	46
Abbildung 15: Gating-Strategie für die Qualitätskontrolle der Monozyten-Isolation.	48
Abbildung 16: Bisulfit-Reaktion.	52
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Metabolismus Analyse mittels Seahorse- Technologie.	58
Abbildung 18: Postoperative Überwachung der CLP und Sham Tiere.	62
Abbildung 19: Splenomegalie von Sepsis-Überlebenden.	63
Abbildung 20: Frequenzen lymphoider Immunzellen der Milz.	64
Abbildung 21: Monozyten- und Makrophagen-Populationen der Milz.	65
Abbildung 22: Dendritische Zellen der Milz.	66
Abbildung 23: Regulatorische T-Zellen im stimulierten Vollblut.	67
Abbildung 24: Monozyten im stimulierten Vollblut.	68
Abbildung 25: Expression proinflammatorischer Zytokine im stimulierten Vollblut.	68

Abbildung 26: Analyse der Knochenmarknische.	69
Abbildung 27: Proinflammatorische Zytokinantwort von naiven Monozyten des Knochenmarks.....	71
Abbildung 28: Metabolische Aktivität von Knochenmarkmonozyten zwölf Wochen post-CLP.	72
Abbildung 29: Mitochondriale Aktivität von Knochenmarkmonozyten.....	73
Abbildung 30: Glykolytische Rate von Knochenmarkmonozyten.. ..	74
Abbildung 31: Transkriptionelle Reprogrammierung von postseptischen Knochenmark- monozyten.	75
Abbildung 32: Differentiell exprimierte Gene in Monozyten zwölf Wochen post-CLP und deren biologische Funktionen.	76
Abbildung 33: Spermogramm von CLP- und Sham-Tieren sechs Wochen post-OP.....	78
Abbildung 34: Exemplarische Darstellung verschiedener Spermiendefekte.	79
Abbildung 35: Verteilung von differentiell methylierten Cytosinen (dmCs) männlicher Keimzellen sechs Wochen post-CLP.	80
Abbildung 36: Hauptkomponentenanalyse postseptischer Spermien.	81
Abbildung 37: Korrespondierende Gene differentiell methylierter Cytosine und deren biologische Funktion.	82
Abbildung 38: Genexpression proinflammatorischer Zytokine im Hodengewebe.	83
Abbildung 39: Entwicklung der Nachkommen postseptischer Väter.	85
Abbildung 40: TNF-Konzentration im Überstand von Vollblut nach LPS Stimulation.	86
Abbildung 41: TNF-Konzentration von Vollblut nach Stimulation mit Zymosan.....	87
Abbildung 42: Relativer Gewichtsverlust nach intraperitonealer LPS Injektion.	88
Abbildung 43: Zytokin-Konzentrationen im Vollblut 24 Stunden nach LPS-Stimulation <i>in</i> <i>vivo</i>	90
Abbildung 44: TNF-Expression von Alveolarmakrophagen nach LPS-Stimulation.	91
Abbildung 45: Genexpression proinflammatorischer Zytokine im Lungengewebe männlicher Nachkommen.	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bestimmung der Qualität zweier Aliquots.....	42
Tabelle 2: Einteilung der Spermienmotilität	42
Tabelle 3: Übersicht über die Injektionsabfolge und Konzentration der verwendeten Stoffwechselmodulatoren.....	58
Tabelle 4: Übersicht über operierte und überlebende CLP- und Sham Tiere.....	61
Tabelle 5: Differentiell exprimierte Gene der Top fünf hochregulierten und herunterregulierten Gene.....	77
Tabelle 6: Übersicht über die Anzahl lebender Tiere im Beobachtungszeitraum.	84

1. Einleitung

1.1. Sepsis

Die Sepsis ist ein komplexes Syndrom und stellt den schwerwiegendsten Verlauf eines akuten Infekts dar (Giesen and Singer, 2018). Die klinische Relevanz des Syndroms zeigt sich darin, dass die Sepsis nicht nur die Haupttodesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen ist, sondern auch die dritthäufigste Todesursache deutschlandweit (Fleischmann et al., 2015). In Zahlen ausgedrückt handelt es sich dabei in Deutschland um rund 320.000 Sepsisfälle, mit einer jährlichen steigenden Inzidenz von etwa 6 % (Fleischmann-Struzek et al., 2018). Die Mortalität liegt dabei im Gesamten mit zirka 75.000 Fällen um die 25 %, im Falle des schwersten Verlaufs, dem septischen Schock, sogar bei 41 % (Fleischmann-Struzek et al., 2018). Dabei können Menschen jeder Altersgruppe, vom Säugling bis ins hohe Alter, betroffen sein (Angus et al., 2001).

1.1.1. Definition und Diagnose

Nach der neuen Sepsis-3-Definition (Abbildung 1) ist die Sepsis als „lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer inadäquaten Wirtsantwort auf Infektionen“ definiert (Singer et al., 2016). Die korrekte klinische Diagnose einer Sepsis gestaltet sich aufgrund der vielen Facetten des Syndroms recht schwierig. Dies liegt unter anderem an der sehr vagen und unspezifischen Ausprägung der Symptome im frühen Stadium. Zur Erkennung einer akuten Organdysfunktion auf Intensivstationen wird daher der sogenannte SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)-Score zur Bewertung herangezogen. Dieser dient dabei auch zur Einschätzung des Mortalitätsrisikos des betroffenen Patienten (Singer et al., 2016, Weis et al., 2017, Giesen and Singer, 2018). Der SOFA-Score beurteilt die Funktionalität von sechs Organsystemen (Lunge, Niere, Leber, Herz-Kreislauf, Blutkoagulation und ZNS) mit Hilfe eines Punktesystems von 0 bis 4, wobei 0 für keine und 4 für eine schwere Organdysfunktion steht. Die Punkte werden aufsummiert zu einem totalen SOFA-Score von 0 bis 24 (Vincent et al., 1998, de Grooth et al., 2017). Bereits bei einer akuten Veränderung des SOFA-Scores ≥ 2 liegt eine Organdysfunktion vor und ist mit einer 3 – 11fach erhöhten Krankenhausletalität verbunden (Seymour et al., 2016, Weis et al., 2017).

Da die Ermittlung des SOFA-Scores außerhalb von Intensivstationen nicht praktikabel ist, wurde ein vereinfachtes Screening-Tool, der sogenannte qSOFA (quick-SOFA)-Score, eingeführt. Dieser setzt sich aus drei Kriterien zusammen, die mit einer späteren intensivmedizinischen Betreuung oder einer erhöhten Krankenhausmortalität korrelierten. Darunter fällt eine Bewusstseinsveränderung mit einem Glasgow Coma Scale von ≤ 14 , eine

Tachypnoe mit einer Atemfrequenz von $\geq 22/\text{min}$ und eine Hypotension mit einem Blutdruck von $\text{RR}_{\text{sys}} \leq 100 \text{ mmHg}$. Ein qSOFA-Score von mindestens 2 Punkten ist dabei mit einer drei bis 14fach höheren Krankenhausletalität assoziiert. Generell wird für die Diagnose Sepsis nicht zwingend der Nachweis einer Infektion benötigt, allein die Vermutung gilt als ausreichend (Singer et al., 2016, Weis et al., 2017).

Der septische Schock stellt eine Subgruppe der Sepsis dar, bei der zelluläre und metabolische Störungen des zirkulierenden Systems soweit fortgeschritten sind, dass es zu einer substantiellen Zunahme der Letalität führt. Klinisch ist der septische Schock dabei als Sepsis mit einem infusionsrefraktären kardiovaskulären Versagen ($\text{MAP} < 65 \text{ mmHg}$) und einem Serum-Laktat $> 2 \text{ mmol/l}$ definiert (Singer et al., 2016, Weis et al., 2017).

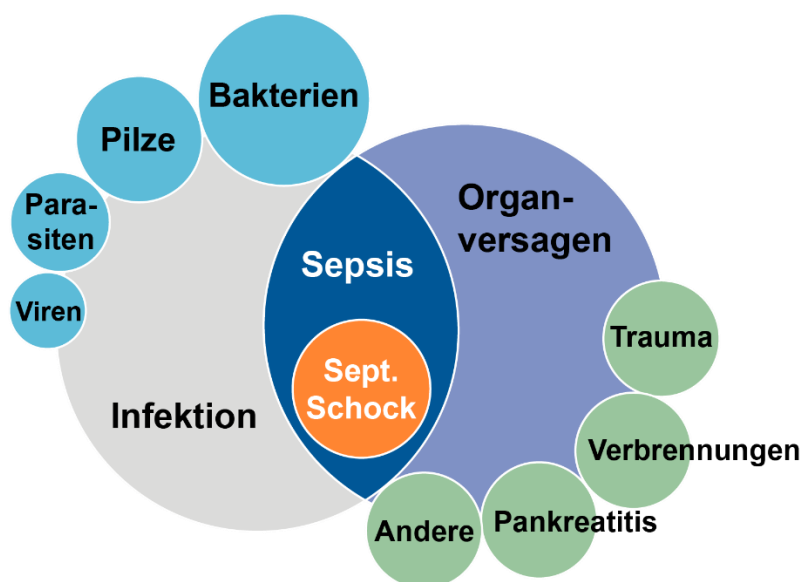


Abbildung 1: Grafische Darstellung der Sepsis-3-Definition. Modifiziert nach (Weis et al., 2017).

1.1.2. Pathophysiologie

Das Syndrom Sepsis ist durch einen sehr komplexen und heterogenen Verlauf gekennzeichnet. Klassischerweise wird eine Sepsis durch eine bakterielle, virale oder fungale Infektion induziert. Dabei kommt es initial zu einer lokalen, übermäßigen Aktivierung von Immunzellen, gefolgt von einer exzessiven Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Dieser „Zytokinsturm“ bewirkt eine systemische Ausbreitung der Inflammation und führt letztendlich zur Schädigung diverser Organe bis hin zum multiplen Organversagen (MODS) (Carson et al., 2011, Uhle et al., 2016, van Engelen et al., 2018). Die Gesamtheit dieser hyperinflammatorischen Reaktionen des Immunsystems werden als „*systemic inflammatory*

response syndrome“ (SIRS) bezeichnet. Parallel kommt es zur Initiierung einer antiinflammatorischen Immunantwort. Diese Immunreaktion ist durch die gesteigerte Freisetzung antiinflammatorischer Chemokine und Zytokine charakterisiert und soll den schädigenden Effekten der SIRS entgegenwirken. In der späten Phase der Sepsis dominiert dieser antiinflammatorische Zustand und wird als „*compensatory anti-inflammatory response syndrome*“ (CARS) bezeichnet. Die Patienten erwerben verstärkt opportunistische und nosokomiale Infektionen, einhergehend mit einer erhöhten Mortalität. Diese antiinflammatorische Prägung des Immunsystems persistiert noch Jahre nachdem betroffene Patienten aus der Klinik entlassen wurden und wird als Sepsis-induzierte Immunsuppression bezeichnet (Carson et al., 2011, Uhle et al., 2015, Weiterer et al., 2015b).

Eine Übersicht über die Immunlage im Verlauf einer Sepsis ist in Abbildung 2 dargestellt.

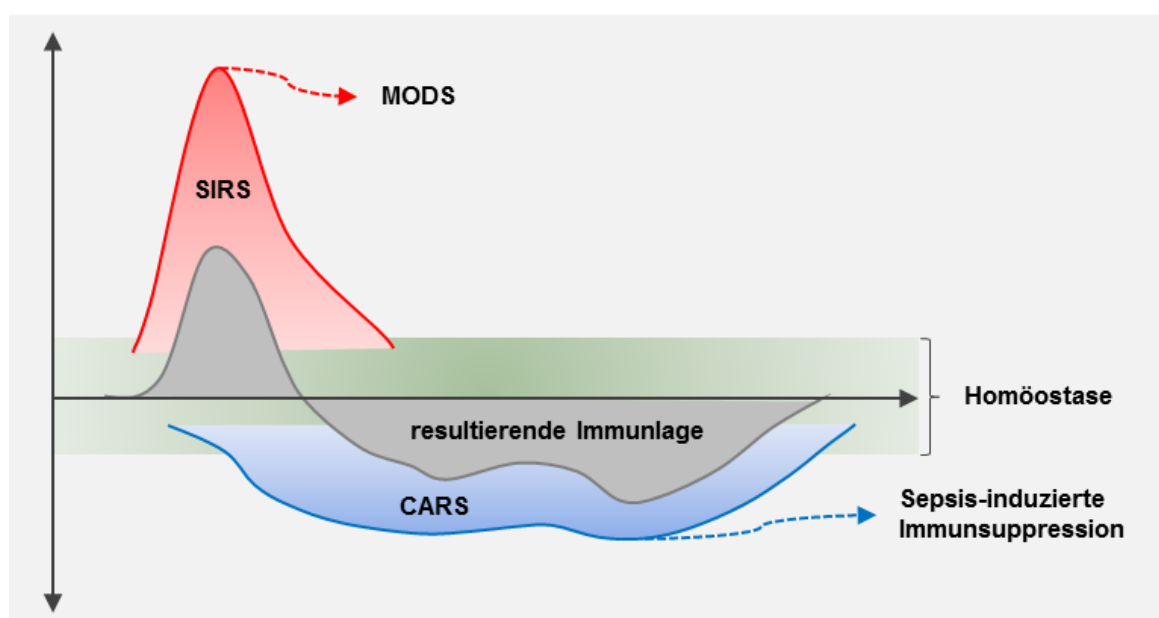


Abbildung 2: Die Immunlage im Sepsis-Verlauf. Modifiziert nach (Uhle et al., 2016).

1.1.2.1. Das angeborene Immunsystem in der Sepsis

Bei der Initiierung einer systemischen Hyperinflammation spielt das angeborene (innate) Immunsystem eine entscheidende Rolle. Dieses Abwehrsystem setzt sich aus verschiedenen Immunzellen zusammen, die unter anderem als unspezifische Sensorzellen fungieren (Murphy and Weaver, 2018). Dazu gehören myeloide Zellen, wie neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, sowie dendritische Zellen und lymphoide Zellen, wie natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Myeloide und dendritische Zellen sind dabei nicht nur in der Lage Eindringlinge zu erkennen, sondern auch als Effektorzellen zu wirken. Mikroorganismen werden von der Zellmembran umschlossen, in ein intrazelluläres Vesikel, dem Phagosom, aufgenommen und internalisiert. Dieser Vorgang wird als Phagozytose bezeichnet. Im Anschluss werden die

Erreger abgetötet und verdaut. Darüber hinaus können einige dieser sogenannten Phagozyten, wie Monozyten/Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen, phagozytierte Bruchstücke der Erreger an die Zelloberfläche transportieren und präsentieren. Daher werden sie auch als Antigenpräsentierende Zellen (APCs) bezeichnet. Diese Fähigkeit ermöglicht die Kommunikation mit anderen Immunzellen und führt unter anderem auch zu einer Aktivierung von Zellen der adaptiven Immunantwort (Schütt and Bröker, 2009, Murphy and Weaver, 2018).

1.1.2.1.1. Pathogenerkennung und Signalwege der angeborenen Immunantwort

Bevor jedoch eine immunologische Antwort als Reaktion des Wirtes auf eindringende Erreger ausgelöst werden kann, müssen diese zunächst erkannt werden. Dies geschieht mittels sogenannten „Pathogen-Associated Molecular Patterns“ (PAMPs). Dabei handelt es sich um konservierte Strukturen diverser Zellbestandteile die typisch für verschiedene Mikroorganismen sind. Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der gram-negativen Bakterienzellwand, sowie Zymosan, ein Oberflächenglucan von Hefezellen. Aber auch spezielle Arten von Nukleinsäuren, wie z.B. doppelsträngige RNA oder unmethylierte CpG-DNA, deren Expression im menschlichen Körper untypisch sind, zählen dazu.

Neben den PAMPs können auch sogenannte „Damage-Associated Molecular Patterns“ (DAMPs) die Entstehung einer Sepsis auslösen. Diese werden häufig nach einer Gewebsschädigung, wie nach einem chirurgischen Eingriff oder Traumata, gebildet. Dabei handelt es sich um endogene Zellbestandteile, die nach einem nekrotischen Zelltod freigesetzt werden und ähnlich den PAMPs stark immunogen wirken (Murphy and Weaver, 2018).

In der frühen Phase der Immunreaktion werden PAMPs und DAMPs von den Sensorzellen des angeborenen Immunsystems mithilfe von evolutiv konservierten Mustererkennungsrezeptoren, sogenannten „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs), detektiert. Diese interagieren mit den PAMPs und DAMPs und lösen verschiedene Signalkaskaden aus, die letztendlich in der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen resultieren. Zu den PRRs zählen vier Hauptfamilien: die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die C-Type-Lectin-Rezeptoren (CLRs), die RIG-1-like-Rezeptoren (RLRs) und die NOD-like-Rezeptoren (NLRs), sowie noch einige Rezeptoren ohne Familienzugehörigkeit (Waisenrezeptoren) (Kawai and Akira, 2010, Uhle et al., 2016).

Die Familie der TLRs gehört dabei zu den am bekanntesten PRRs. Im Menschen sind bisher zehn verschiedene TLR-Rezeptoren bekannt (TLR1-10), in der Maus zwölf (TLR1-9, 11, 12, 13) (Takeuchi and Akira, 2010). Diese können extrazellulär als Transmembranproteine (TLR1, 2, 4, 5, 6) fungieren oder sich intrazellulär an Endosomen und Liposomen befinden (TLR 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) (Kawai and Akira, 2010, Horiguchi et al., 2018). Der Rezeptor TLR4 und

dessen nachfolgende Signaltransduktion gehören dabei zu den am besten untersuchten Signalkaskaden. Er erkennt unter anderem das bakterielle Endotoxin LPS und spielt somit in der Entstehung der bakteriellen Sepsis eine entscheidende Rolle (Uhle et al., 2016). Nach Bindung von LPS an TLR4 kann es zur Auslösung von zwei verschiedenen Signalkaskaden kommen. Die klassische, frühe TLR4 Signaltransduktion ist von dem Adapterprotein MyD88 („myeloid differentiation primary response 88“) abhängig. Dabei homodimerisiert der TLR4-Rezeptor nach Ligandenbindung und bildet einen Komplex mit den Kofaktoren CD14 („cluster of differentiation 14“) und MD-2 („myeloid differentiation factor 2“). Die Adapterproteine TIRAP („TIR domain-containing adapter protein“) und Myd88 binden intrazellulär an den TLR4-Komplex und aktivieren den Transkriptionsfaktor NFκB. Dieser transloziert in den Zellkern und induziert dort die Expression proinflammatorischer Gene, wie z.B. TNF und IL-6 (Park et al., 2009, Kawai and Akira, 2010). Die zweite, alternative Signalkaskade ist MyD88 unabhängig. Dabei bewirkt die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) eine Translokation des TLR4-Komplexes in Endosomen. Dort kommt es zur Bindung der Adapterproteine TRIF („TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β“) und TRAM („TRIF-related adapter molecule“). Diese späte TLR4-Signaltransduktion führt zum einen ebenfalls zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB, aber zum anderen auch zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 („interferon regulatory factor 3“) und resultiert in der Expression antiinflammatorischer Gene, wie z.B. IL-10, und IFN-β („Interferon β“) (Kawai and Akira, 2010, Uhle et al., 2016). Ein zentraler Signalweg in der Sepsis-Pathogenese ist der JAK/STAT („Janus kinase-signal transducer and activator of transcription“)-Signalweg (Cai et al., 2015). IFN-β aktiviert sowohl auto- als auch parakrin die Signaltransduktion über diesen Signalweg, was in der Sekretion des späten proinflammatorischen Mediators HMGB1 („high mobility group β protein-1“) mündet. Dieser Mediator stimuliert die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Zytokine und trägt somit zur Amplifikation der Immunreaktion bei (Kim et al., 2009, Cai et al., 2015).

CLRs sind Transmembranrezeptoren mit einer Bindedomäne spezifisch für Kohlenhydrate. Eingedrungene Mikroorganismen werden über die Polysaccharid-Strukturen auf ihren Zelloberflächen erkannt. Ein bekannter CLR ist der Rezeptor Dectin-1. Dieser bindet unter anderem β-Glucane wie das β-1,3-Homoglycan Zymosan, ein Zellwandbestandteil verschiedener Mycobionta. Durch Aktivierung dieses Signalweges kommt es zur Bildung verschiedener Zytokine wie TNF oder IL-10. Eine gleichzeitige Aktivierung des MyD88-abhängigen TLR2-Rezeptors hat die Induktion proinflammatorischer Zytokine zur Folge (Brown, 2006).

Eine Übersicht über die in der Sepsis involvierten Signalkaskaden ist in Abbildung 3 dargestellt.

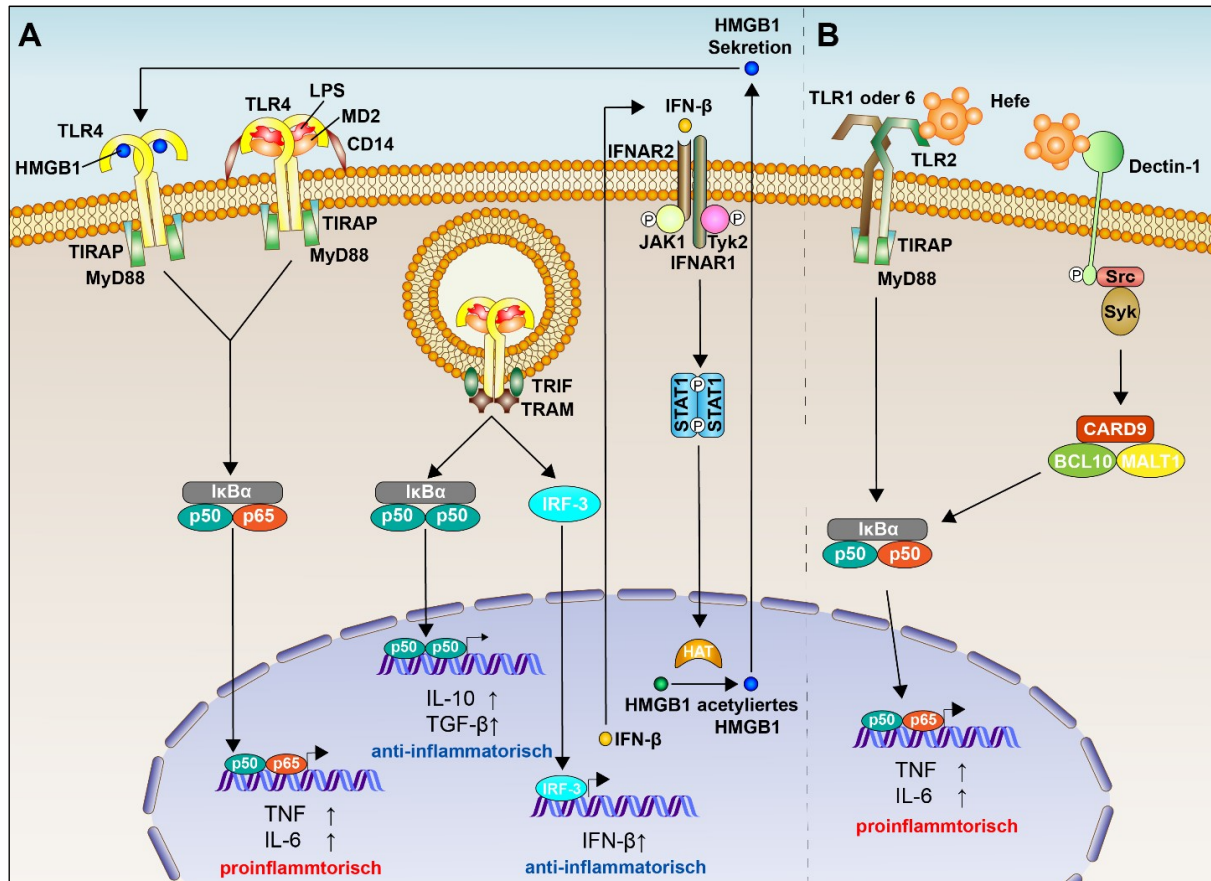


Abbildung 3: PRR Signalkaskaden in der Sepsis. A) Erkennung von LPS über TLR4 B) Identifizierung von Hefezellen über TLR2 und Dectin-1. Modifiziert nach (Taniguchi and Takaoka, 2001, Bianchi and Manfredi, 2014, Uhle et al., 2016).

1.1.2.1.2. Die Spätphase der Sepsis

Im Verlauf der Immunreaktion ist der Organismus bestrebt, eine Schädigung durch den übermäßigen inflammatorischen Output zu verhindern, Reperaturmechanismen einzuleiten und letztendlich in den Zustand der Homöostase zurückzukehren. Dies ist auch in der Sepsis der Fall. Zu diesem Zweck besitzt der Organismus verschiedene Gegenregulationsmechanismen, die in der Sepsis sehr früh eingeleitet werden. Diese Gegenregulation wird als CARS bezeichnet und ist durch die Ausschüttung antiinflammatorischer Mediatoren, wie IL-10 und TGF-β, immunmodulatorischer Zytokine, wie IL-4 und IL-13, sowie Antagonisten zentraler Mediatoren, wie IL-1Ra („IL-1 receptor antagonist“), von Immunzellen charakterisiert (Uhle et al., 2015). In der Sepsis kann auch das CARS als fulminante systemische Überschussreaktion auftreten. Dies hat im weiteren Krankheitsverlauf die Ausprägung einer prolongierten Sepsis-induzierten Immunsuppression zur Folge (Weiterer et al., 2015a).

Ein charakteristisches Merkmal der Sepsis-induzierten Immunsuppression ist die apoptotische Depletion verschiedener Immunzellpopulationen. Davon betroffen sind vor allem CD4⁺ und

CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und dendritische Zellen. Der apoptotische Zelltod findet vor allem in lymphoiden Geweben wie der Milz, dem Thymus und den Lymphknoten statt. Monozyten, Makrophagen und DCs phagozytieren apoptotische Zellen und induzieren eine Anergie der verbliebenen B- und T-Lymphozyten sowie einen Wechsel zu einem T_H2-assoziierten Immunphänotyp mit gesteigerter IL-10 Expression (Hotchkiss et al., 2013b).

Gleichzeitig werden Immunzellpopulationen mit einem immunsuppressiven Phänotyp, wie regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und „Myeloid Derived Suppressor Cells“ (MDSCs), expandiert und fördern so die antiinflammatorische Immunlage (Hotchkiss et al., 2013b).

APCs sind von solchen zellulären Veränderungen nicht betroffen. Allerdings führt die Sepsis zu funktionellen Beeinträchtigungen der myeloiden Immunzellen. Dieser Effekt wird als Endotoxintoleranz bezeichnet (Biswas and Lopez-Collazo, 2009, Uhle et al., 2015). Postseptische Monozyten und Makrophagen sind nach einem erneuten Stimulus durch bakterielle Agonisten stark in ihrer Fähigkeit eingeschränkt proinflammatorische Zytokine auszuschütten. Es handelt sich dabei jedoch nicht um eine generelle Abschaltung dieser Zellen, sondern eher um eine Reprogrammierung: Die Zellen produzieren unverändert oder verstärkt antiinflammatorische Mediatoren (Cavaillon and Adib-Conquy, 2006, Biswas and Lopez-Collazo, 2009). Zudem ist die Fähigkeit zur Phagozytose in endotoxintoleranten Monozyten erhöht, einhergehend mit einer gesteigerten Kapazität zur Eliminierung internalisierter Pathogene. Gleichzeitig ist die Fähigkeit der Antigenpräsentation beeinträchtigt (Biswas and Lopez-Collazo, 2009).

Die genauen Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung des immunsuppressiven Status und der Endotoxintoleranz führen, sind bisher noch nicht genau geklärt. Der Beteiligung epigenetischer Regulationsmechanismen, wie Histonmodifikationen, Chromatin-Remodellierung oder microRNAs, wird eine große Bedeutung zugesprochen. So induziert z.B. LPS Histonmodifikationen, die zu einer Repression der proinflammatorischen Genexpression führen (Foster et al., 2007). Angeborene Immunzellen wie Monozyten oder Makrophagen haben nur eine relativ kurze Lebensdauer zwischen ein und sieben Tagen (Patel et al., 2017). Mit Hinblick auf diese Kurzlebigkeit wird eine epigenetische Reprogrammierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks hypothetisiert, was die Bildung von vornherein dysfunktionalen Immunzellen zu Folge hätte (Carson et al., 2011). Dies wurde bereits für die chronische Inflammation der Diabetes (Gallagher et al., 2015), sowie die akute Inflammation in der Sepsis gezeigt (Zhang et al., 2016, Faivre et al., 2016). Ein weiterer Faktor, der zur Ausbildung einer Immuntoleranz von Immunzellen der angeborenen Immunantwort beitragen kann, ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses dieser Zellen (Seeley and Ghosh, 2017).

1.2. Das Gedächtnis der angeborenen Immunantwort

Das Immunsystem ist klassischerweise in das angeborene und adaptive Immunsystem unterteilt. Die angeborene Immunantwort fungiert dabei als erste Abwehrreaktion und reagiert dabei schnell und unspezifisch auf eingedrungene Mikroorganismen. Die adaptive Immunreaktion hingegen ist für eine späte, antigenspezifische Immunreaktion verantwortlich. Charakteristisch für das adaptive Immunsystem ist die Fähigkeit, Gedächtniszellen auszubilden. Erfolgt eine zweite Invasion desselben Pathogens ist das Immunsystem in der Lage diesen spezifisch zu erkennen und schneller zu eliminieren. Die Konsequenzen sind eine verstärkte Immunantwort nach Antigenkontakt und die Ausbildung einer schützenden Immunität gegen diesen Erreger (Murphy and Weaver, 2018). Der angeborenen Immunantwort wurde bis im letzten Jahrzehnt die Fähigkeit ein immunologisches Gedächtnis auszubilden abgesprochen. Jedoch hinterlässt jede Interaktion des Immunsystems mit einem Pathogen Spuren im Immunsystem und prägt somit auch Zellen der angeborenen Immunantwort (Netea et al., 2011).

Neuere Studien zeigen, dass Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen, durchaus in der Lage sind ein immunologisches Gedächtnis auszubilden (Quintin et al., 2012, Kleinnijenhuis et al., 2014). Im Vergleich zum Gedächtnis adaptiver Immunzellen ist das Gedächtnis der angeborenen Immunantwort jedoch unspezifisch und somit in der Lage schneller auf verschiedene pathogene Stimuli zu reagieren. In Vertebraten wird das Gedächtnis des angeborenen Immunsystems auch als „trainierte Immunität“ oder „innate immune memory“ bezeichnet (Netea et al., 2011).

Die Konfrontation angeborener Immunzellen mit einem Krankheitserreger kann dabei zur Aktivierung von zwei kontroversen Programmen führen: Immuntraining oder Immuntoleranz (Saeed et al., 2014) (Abbildung 4). Immuntraining ist charakterisiert durch eine verstärkte Reaktivität auf einen zweiten Stimulus, einhergehend mit einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine und der gesteigerten Fähigkeit, Infektionen zu eliminieren. Dieser protektive Effekt myeloider Zellen konnten in humanen und murinen Studien nach Impfung mit *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) und in murinen Modellen auch nach *ex-* und *in vivo* Behandlung mit dem Zellwandkomponent β -Glucan von *S. cerevisiae* gezeigt werden (Arts et al., 2016a). Die Immuntoleranz dagegen ist gekennzeichnet durch eine verminderte Responsivität auf einen zweiten Stimulus zusammen mit einer verminderten Bildung proinflammatorischer und einer verstärkten Sekretion antiinflammatorischer Zytokine (Vergadi et al., 2018). Die Folge ist eine erhöhte Anfälligkeit für sekundäre Infektionen, wie es in der Sepsis-induzierten Immunsuppression der Fall ist (Dominguez-Andres and Netea, 2018).

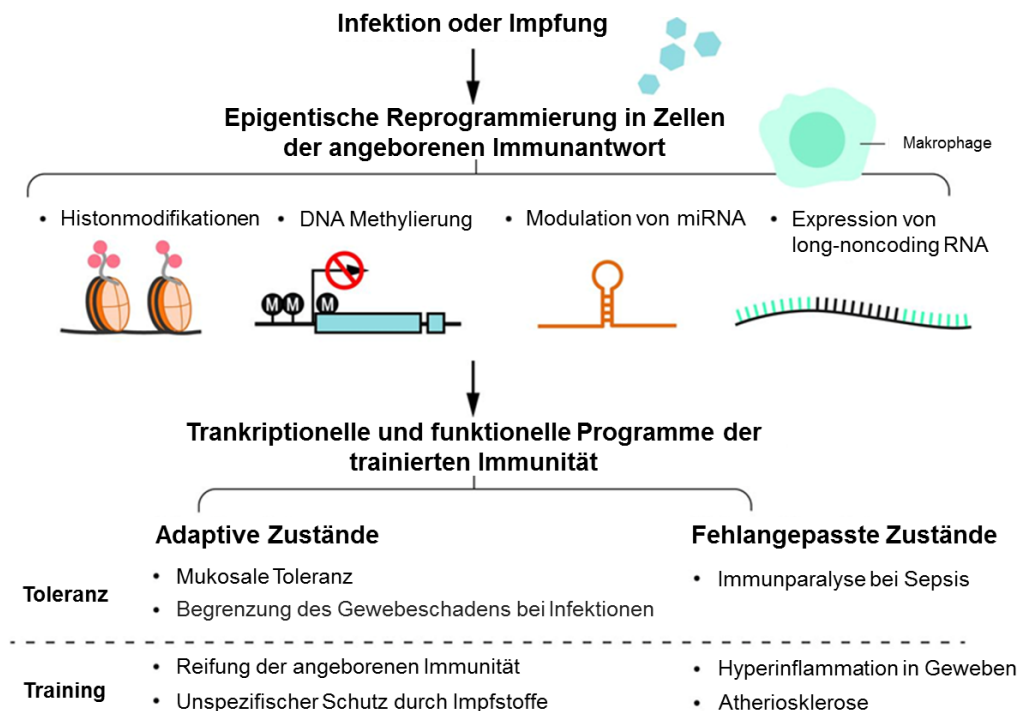


Abbildung 4: Mechanismen im Gedächtnis der angeborenen Immunantwort. Modifiziert nach (Netea et al., 2016).

1.2.1. Die Rolle des Immunmetabolismus im angeborenen Immunsystem

Das junge Forschungsfeld des Immunmetabolismus hat in den vergangenen Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Im Fokus steht dabei das komplexe Zusammenspiel zwischen dem zellulären Metabolismus und dem funktionellen Status der Immunzellen.

Während der Homöostase befinden sich die meisten Immunzellen in einem ruhenden Stadium und haben einen niedrigen energetischen Bedarf. Sobald jedoch Pathogene in den Organismus eindringen, müssen die Zellen in der Lage sein schnell zu agieren und die Immunantwort zu initiieren. Die Aktivierung von Immunzellen führt zu einer zellulären Umstrukturierung (Pearce and Pearce, 2013). Aktivierte Immunzellen haben eine erhöhte glykolytische Aktivität, die in einer gesteigerten Produktionsleistung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF und IL-6 resultiert. Die Anreicherung von Citrat, durch die Unterbrechung des Citratzyklus, führt zu einer erhöhten Lipid-Biosynthese. Die Folge ist unter anderem die Bildung des proinflammatorischen Mediators IL-1 β und die damit verbundene Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms. Des Weiteren fördern die vermehrt gebildeten Fettsäuren die Membran-Biosynthese und somit auch die Fähigkeit zur Zytokinese. Die Hochregulierung des Pentose-Phosphatweges führt zu einer gesteigerten Bildung von Nukleotiden und Aminosäuren für die Synthese von Enzymen (Thapa and Lee, 2019, Patel et al., 2019). Dieser Umbau erfordert nicht nur eine adäquate Verteilung der Nährstoffe auf die entsprechenden

Pfade, sondern vor allem die Deckung des zellulären Energiebedarfes. Um Energie für eine optimale Zellfunktion, sowohl in ruhenden als auch in aktivierten Immunzellen bereitzustellen, ist die Generierung von Adenosintriphosphat (ATP), dem universellen Energieträger der Zelle, unerlässlich (Pearce and Pearce, 2013).

Ein Hauptstoffwechselweg zur Generierung von ATP, sowohl in ruhenden als auch in aktivierten Immunzellen, ist die Glykolyse. Dabei wird Glucose im Zytoplasma zu Pyruvat umgewandelt. Während dieses Prozesses werden Phosphate von glykolytischen Intermediaten auf Adenosindiphosphat (ADP) übertragen und so ATP gebildet. Dieser Weg der Energiegewinnung ist bei niedrigen Glucosekonzentrationen in der Zelle ineffizient, ist jedoch schnell induzierbar und stellt in Anwesenheit von viel Glucose eine effektive Methode der ATP-Synthese dar (Vazquez et al., 2010). Eine weitaus effizientere Möglichkeit zur ATP-Generierung liefert die Kopplung der Glykolyse an den Citratzyklus. Das aus der Glykolyse gewonnene Pyruvat wird zu AcetylCoA umgewandelt und geht direkt in den Citratzyklus ein. Dort entstehen über die Prozessierung verschiedener Intermediate reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) und reduziertes Flavin-adenin-dinukleotid (FADH₂). Beide Agenzien liefern Elektronen für die Elektronentransportkette und die anschließende oxidative Phosphorylierung (OXPHOS), dem Prozess der ATP-Gewinnung in den Mitochondrien. Dieser gekoppelte Stoffwechselweg ist die Grundlage der basalen Respiration und wird vor allem von ruhenden Immunzellen und Zellen mit einem geringen biosynthetischen Bedarf genutzt (Pearce and Pearce, 2013, O'Neill et al., 2016).

Während der Aktivierung von Immunzellen, wie z.B. proinflammatorischer Makrophagen, erfolgt eine verstärkte Produktion von Laktat (Jha et al., 2015). Dieses Phänomen wird als aerobe Glykolyse oder Warburg-Effekt bezeichnet und wurde erstmals zu Beginn des letzten Jahrhunderts von Otto Warburg in metabolisch hoch aktiven Krebszellen beschrieben (Warburg, 1956, Palsson-McDermott and O'Neill, 2013). Auch in der Induzierung der trainierten Immunität stellt der Warburg-Effekt einen zentralen Mechanismus dar (Cheng et al., 2014a, Bekkering et al., 2018). Die Stimulation von ruhenden Monozyten mit β -Glucan aktiviert den AKT-mTor-HIF-1 α Signalweg in den Zellen. Die Folgen sind eine erhöhte aerobische Glykolyse mit einer gleichzeitig reduzierten Rate der basalen Respiration, einem erhöhten Verbrauch an Glucose sowie einer gesteigerten Laktatproduktion und höheren intrazellulären NAD⁺/NADH-Ratio (Cheng et al., 2014a) (Abbildung 5).

Der Citratzyklus ist nicht nur ein grundlegender Stoffwechselweg für die oxidative Phosphorylierung, sondern ist auch an der Induktion der trainierten Immunität beteiligt. Die ATP-Produktion über die mitochondriale Atmung ist, wie bereits erwähnt, in trainierten Immunzellen reduziert (Cheng et al., 2014a).

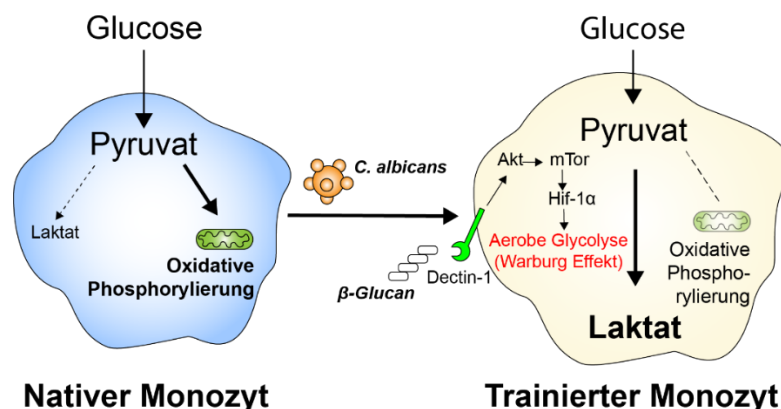


Abbildung 5: Die aerobe Glykolyse ist ein zentraler Mechanismus der trainierten Immunität.
Modifiziert nach (Cheng et al., 2014a).

Der Citratzyklus ist aber dennoch aktiv und führt zu einer verstärkten Bildung von Intermediaten wie Citrat, Fumarat oder Succinat. (Arts et al., 2016b). Citrat kann dabei wieder zurück ins Cytosol transportiert werden, wird dort zurück zu AcetylCoA katalysiert und geht anschließend entweder in den Mevalonat-Stoffwechselweg zur Cholesterolsynthese oder in die Biosynthese von Fettsäuren ein (Bekkering et al., 2018). Neueste Studien zeigen dabei die Relevanz des Cholesterolsynthese-Weges in der Induktion der trainierten Immunität. Des Weiteren dient AcetylCoA als Acetyl-Donor für Histonacetyltransferasen und ist somit an der Histon-Acetylierung von an der Glykolyse beteiligten Enzymen, wie der Hexokinase-2, beteiligt (Arts et al., 2016b).

Das Intermediat Fumarat an sich ist in der Lage einen Status der trainierten Immunität zu induzieren. Durch die Akkumulation von Fumarat kommt es zu einer Erhöhung epigenetischer Histonmodifikationen, wie der Triplemethylierung des Histons H3K4 und der Acetylierung des Histons H3K27. Persistierende epigenetische Veränderungen können so über den Immunmetabolismus etabliert werden. Des Weiteren führt die Anreicherung von Fumarat und Succinat zur Inhibierung des proteosomalen Abbaus von Hif-1 α , wodurch eine Stabilisierung des Transkriptionsfaktors erreicht wird. Das Resultat dieser Inhibierung ist eine Promotion des glykolytischen Glukoseabbaus (Arts et al., 2016a, Arts et al., 2016b).

Auch der Aminosäurenmetabolismus spielt eine entscheidende Rolle in der Induktion der trainierten Immunität. Dabei kommt vor allem der Aminosäure Glutamin eine große Bedeutung zu. Glutamin ist eine essentielle anaplerotische Quelle für die Citratzyklus-Intermediate Succinat und Fumarat, aber auch für Citrat über den reversen Citratzyklus. Dabei wird Glutamin zunächst zu Glutamat katalysiert, geht über α -Ketoglutarat in den Citratzyklus ein und wird dort zu Succinat und Fumarat weiter oxidiert (Arts et al., 2016a, Arts et al., 2016b). Die metabolischen Abläufe in trainierten angeborenen Immunzellen sind in Abbildung 6 abgebildet.

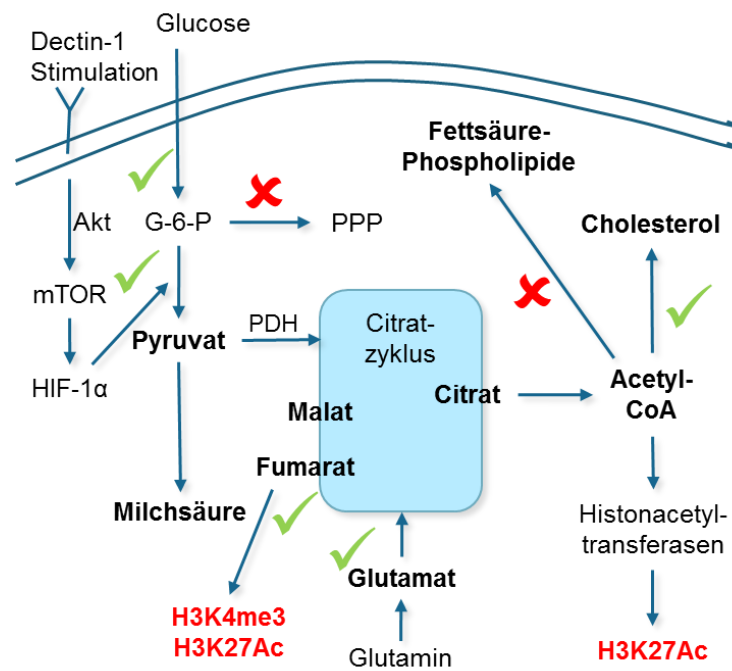


Abbildung 6: Übersicht über den zellulären Metabolismus in trainierten myeloiden Immunzellen.
 Modifiziert nach (Arts et al., 2016b).

Glucose selbst kann nicht nur über die Glykolyse verstoffwechselt werden, sondern auch über den Pentose-Phosphat-Weg (PPP). Dabei entsteht neben NADH/H⁺ auch Ribose-5-phosphat. Ribose-5-phosphat ist ein wichtiges Ausgangsmolekül für die Purinsynthese (Löffler and Müller, 2014). Purine sind Basiskomponenten für die Biosynthese von Nukleotiden, wie Adenosinmonophosphat (AMP) und Guanosinmonophosphat (GMP), sowie von Nucleinsäuren (Löffler, 2014, Yin et al., 2018). Obwohl der PPP nicht direkt an der Induktion der trainierten Immunität beteiligt ist, ist dieser Stoffwechselweg in trainierten Immunzellen aktiviert, um den erhöhten Bedarf an Bausteinen für die verstärkte Genexpression zu decken (Arts et al., 2016a).

Die metabolische Aktivität toleranter angeborener Immunzellen ist, wie im Falle der Sepsis beschrieben, im Vergleich zum Metabolismus trainierter Immunzellen grundlegend herunterreguliert. Davon sind vor allem die Stoffwechselwege der Glykolyse, die oxidative Phosphorylierung und die β -Oxidation betroffen (Cheng et al., 2016, Dominguez-Andres and Netea, 2018).

1.2.2. Die Rolle der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in der Entwicklung des angeborenen Immunsystems

Das Knochenmark ist der zentrale Ort der Blutbildung. Dort werden alle zellulären Bestandteile des Blutes, inklusive der Leukozyten, gebildet. Der Prozess der Blutbildung wird als

Hämatopoese bezeichnet. Dabei handelt es sich um ein hierarchisches System aus hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs). Über die Differenzierung dieser Zellen zu linienspezifischen Vorläuferzellen und letztendlich zu ausgereiften Zellen wird die kontinuierliche Erneuerung der blutbildenden Zellen gewährleistet (Trumpp et al., 2010). Die am wenigsten ausdifferenzierten Zellen stellt die Population der long-term HSCs (LT-HSCs) dar. LT-HSCs sind multipotente Stammzellen. Der Großteil dieser Zellen befindet sich während der Homöostase in einem ruhenden Stadium (Trumpp et al., 2010, Seita and Weissman, 2010, Pietras et al., 2015). Zur Aufrechterhaltung der Hämatopoese proliferieren und differenzieren die restlichen LT-HSCs zunächst zu multipotenten short-term HSCs (ST-HSCs) und schließlich zu multipotenten Progenitorzellen (MPPs). Mit jeder Differenzierung verlieren die Zellen die Kapazität zur Selbsterneuerung. MPPs haben diese Fähigkeit bereits verloren. Im Gegenzug entwickeln MPPs die Fähigkeit zur Linienspezifikation (Seita and Weissman, 2010). Aus ihnen entwickeln sich sowohl die Vorläuferzellen der lymphoiden (common lymphoid progenitors (CLPs)), als auch die myeloiden Immunzelllinien (common myeloid progenitors (CMPs)). Aus diesen oligopotenten Vorläuferzellen entstehen schließlich die linienspezifischen Effektorzellen des hämatopoetischen Systems (Seita and Weissman, 2010).

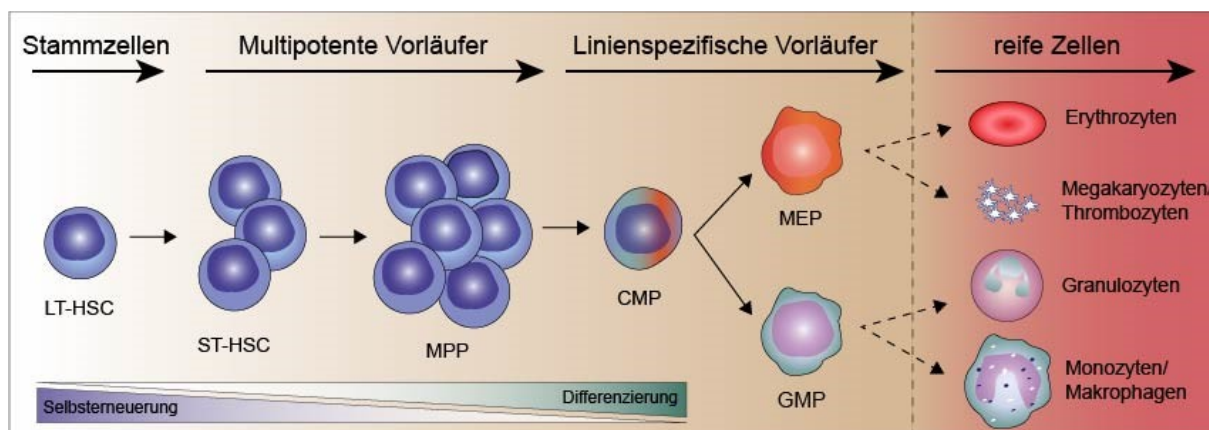


Abbildung 7: Hämatopoese der myeloiden Linie. Modifiziert nach (Larsson and Karlsson, 2005, Pina and Enver, 2007).

Im Falle der Myelopoese, der Entwicklung der myeloiden Immunzelllinien, differenzieren die CMPs zu Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitorzellen (MEPs), aus denen Megakaryozyten und Erythrozyten gebildet werden, oder Granulozyten-Monozyten-Progenitorzellen (GMPs), die Vorläuferzellen der Neutrophilen und Monozyten/ Makrophagen (Seita and Weissman, 2010). Eine Übersicht der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen ist in Abbildung 7 dargestellt.

HSPCs sind in der Lage auf verschiedene Arten von Stress, wie z.B. eine schwere Infektion oder eine systemische Inflammation, zu reagieren. Dies führt zu einer Erhöhung der Proliferationsrate und zu einer verstärkten Differenzierung (Trumpp et al., 2010, Mann et al., 2018).

Neueste Studien demonstrieren dabei, dass bereits in hämatopoetischen Stammzellen ein Status der trainierten Immunität etabliert werden kann. Die Stimulation mit β -Glucan führt zu einer Expansion der HSPCs einhergehend mit einer gesteigerten Myelopoese. Dies findet sich auch in β -Glucan stimulierten HSPCs wieder. Die Vorläuferzellen weisen nicht nur eine erhöhte Glykolyse, sondern auch eine gesteigerte Cholesterol-Biosynthese auf (Mitroulis et al., 2018). Die Toleranz ist dagegen mit einer Erschöpfung der Stammzellen assoziiert. Eine Stimulation mit LPS führt zu einer dysfunktionalen Expansion der Stammzellen einhergehend mit einer Myelosuppression (Rodriguez et al., 2009, Zhang et al., 2016).

1.3. Generationsübergreifende epigenetische Vererbung

Der Begriff Epigenetik (griechisch „epi“ = darüber) umfasst alle vererbbaaren Mechanismen, die Genexpressionsmuster regulieren ohne dabei die zugrundeliegende DNA-Sequenz zu verändern (Carson et al., 2011, Hamilton, 2011). Epigenetische Informationen sind zellspezifisch, dynamisch und fähig auf äußere Umwelteinflüsse zu reagieren (Champroux et al., 2018). Dabei werden drei epigenetische Hauptmechanismen beschrieben: (I) die chemische Modifikation von DNA-Bausteinen (DNA-Methylierung), (II) die post-translationale Veränderung von DNA-gebundenen Proteinen (Histon-Modifikationen durch Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung), sowie Chromatin-Remodellierung und (III) die post-transkriptionelle Regulation durch kodierende mRNA (messenger RNA) und nicht-kodierende ncRNA (non-coding RNA) (Carson et al., 2011, Champroux et al., 2018).

Diese Mechanismen spielen nicht nur in somatischen Zellen eine entscheidende Rolle, sondern auch in der Regulation der Genexpression in allen kritischen Entwicklungsstadien der Embryogenese und Gametogenese, von den Keimzellen über die Zygote und im frühen Embryo (Hajkova, 2011). Externe Umwelteinflüsse sind in der Lage die epigenetische Reprogrammierung im elterlichen Reproduktionstrakt zu beeinflussen und zu verändern. Die so erworbenen epigenetischen Signaturen bleiben erhalten und können von Generation zu Generation übertragen werden mit negativen Konsequenzen für die Fortpflanzung und die Gesundheit der Nachkommen (Schagdarsurengin et al., 2016). Dieses Phänomen wird als epigenetische Vererbung bezeichnet (Champroux et al., 2018).

1.3.1. Inter- und transgenerationale epigenetische Effekte

Umweltinduzierte erworbene epigenetische Signaturen können zum einen an Tochterzellen weitergegeben werden und so an der Aufrechterhaltung verschiedener langanhaltender Effekte beteiligt sein, aber zum anderen auch generationsübergreifend von den Eltern auf den Nachwuchs übertragen werden. Das Resultat ist eine veränderte Genexpression in den Nachkommen einhergehend mit entsprechend phänotypischen Merkmalen. In Abhängigkeit des elterlichen Ursprungs und der Anzahl der betroffenen Generationen wird das Phänomen als intergenerationale oder transgenerationale Vererbung bezeichnet (Babenko et al., 2015). Intergenerational beschreibt dabei die Vererbung eines erworbenen Phänotyps über die Keimbahn auf die nachfolgende Generation, die somit in direktem Bezug zur exponierten Generation steht. Sobald kein direkter Bezug mehr zur exponierten Generation vorhanden ist, werden die Effekte als transgenerational bezeichnet (Heard and Martienssen, 2014) (Abbildung 8).

In der maternalen Transmission (Abbildung 8A) wird dabei nicht nur die Mutter (F_0) dem belasteten Stressor ausgesetzt, sondern auch der Fetus im Mutterleib. Es kommt zu einer epigenetischen Reprogrammierung von somatischen Zellen, sowie der Zellen der Keimbahn des Fetus. Die F_1 -Generation repräsentiert damit die erste Generation mit veränderter Keimbahn und verändertem Phänotyp. Die Übertragung dieses erworbenen Phänotyps auf die F_2 -Generation wird als intergenerationaler Effekt bezeichnet. Ab der F_3 -Generation besteht kein direkter Bezug mehr zu der exponierten F_1 -Generation. Die Vererbung ist nun transgenerational (Heard and Martienssen, 2014, Siklenka et al., 2015).

In der paternalen Transmission dagegen (Abbildung 8B) ist der Vater direkt dem belastenden Stressor ausgesetzt. Die Konsequenz ist eine epigenetische Reprogrammierung der Keimzellen der F_0 -Generation. Somit stellt der Vater selbst die erste Generation mit veränderter Keimbahn dar. Die Übertragung des erworbenen Phänotyps auf die F_1 -Generation wird in diesem Fall als intergenerational bezeichnet und bereits die Vererbung ab der F_2 -Generation als transgenerational (Heard and Martienssen, 2014, Siklenka et al., 2015)

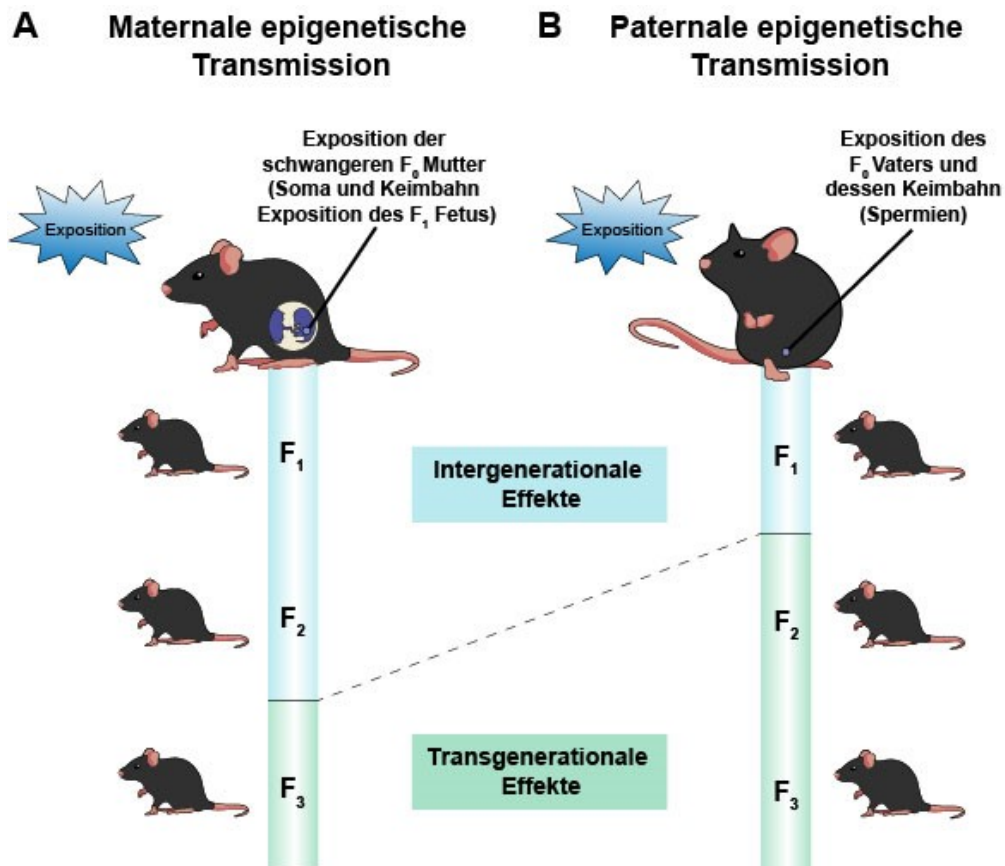


Abbildung 8: Inter- und transgenerationale Definitionen. A) Maternale Transmission. B) Paternale Transmission. Modifiziert nach (Siklenka et al., 2015).

1.3.2. Die Rolle der DNA-Methylierung in der männlichen Gametogenese

Spermien sind hochspezialisierte Zellen mit der Aufgabe das väterliche haploide Genom an eine Oozyte während der Fertilisation weiterzugeben. Die Bildung der Spermien erfolgt in den Hoden während dem Prozess der Spermatogenese. Die Entwicklung der männlichen Gameten beginnt dabei mit der Spezifizierung der Urkeimzellen (Gonozyten oder primordial germ cells (PGCs)) im Epiblast des frühen Embryos und ist erst beendet wenn diese zu fertigen Spermatozoen in der Epididymis herangereift sind. Dieser langwierige Prozess initiiert eine extensive Neugestaltung des paternalen Keimzell-Epigenoms mit dem Ziel, den ursprünglichen basalen, totipotenten Zustand des neu gebildeten Embryos wiederherzustellen (Heard and Martienssen, 2014, Messerschmidt et al., 2014). Die Regulation der Spermatogenese verläuft damit im Vergleich zu anderen Zellen stark auf epigenetischer Ebene ab und bietet damit ein breites Spektrum für die Anfälligkeit epigenetischer Veränderungen induziert durch Umwelteinflüsse (Cui et al., 2016, Schagdarsurengin et al., 2016). Die DNA-Methylierung ist dabei der am besten untersuchte Mechanismus.

1.3.2.1. Prinzipien der DNA-Methylierung

Der Prozess der DNA-Methylierung umfasst den Transfer einer Methylgruppe von S-adenosyl-L-methionin an die C5-Position eines Cytosins (5mC). Dieser Vorgang erfolgt enzymatisch durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) in zwei Modi. Der erste Modus dient zur Aufrechterhaltung der Methylierung während der Mitose und wird durch das Enzym DNMT1 katalysiert. Der zweite Modus umfasst die *de novo* Methylierung vermittelt durch die Enzyme DNMT3A und DNMT3B (Stewart et al., 2016). Im Gegensatz dazu kann der Prozess der DNA-Demethylierung sowohl passiv, unter Ausschluss einer enzymatischen Kontrolle als auch aktiv und enzymvermittelt erfolgen. Die passive DNA-Demethylierung ist dabei abhängig von der DNA-Replikation und umfasst den Verlust von 5mC in mitotischen Zellen ohne *de novo* Methylierung durch einen Verdünnungseffekt mit jeder weiteren Zellteilung (Schagdarsurengin et al., 2016). Die aktive Demethylierung wird durch die „activation-induced Deaminase“ (AID) vermittelt. AID deaminiert 5mC zu Thymin (Ly et al., 2015). Alternativ wird die Demethylierung durch die Enzyme der „ten-eleven-translocation“ (TET) Familie katalysiert. Durch die Enzyme TET1/2 in embryonalen Stammzellen (ESCs) und PGCs, sowie TET3 in Spermatozoen und im frühen embryonalen Stadium, erfolgt eine iterative Oxidation von 5mC zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) (Messerschmidt et al., 2014). 5hmC kann im weiteren Verlauf deaminiert werden oder wird weiter zu 5-formylcytosin (5fC) und 5-carboxycytosin (5caC) oxidiert. Über den Basen-Exzisionsreperatur-Mechanismus (BER) wird der Prozess der Demethylierung komplettiert (Ly et al., 2015, Schagdarsurengin et al., 2016).

Im Genom von Säugetieren findet die DNA-Methylierung hauptsächlich im Kontext von Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpGs) statt und weist eine genomweite bimodale Verteilung auf (Toshimori and Eddy, 2015). Das Genom besteht dabei zu etwa 60 – 90 % aus vereinzelt CpGs, welche generell hypermethyliert vorliegen. Im Gegensatz dazu sind sogenannte CpG-Inseln (CGIs), bei denen es sich um 500 bis 2.000 Basenpaare lange Regionen mit erhöhter CpG-Dichte handelt, hauptsächlich hypomethyliert (Messerschmidt et al., 2014). Hypermethylierte DNA ist dabei mit einer Repression der Gentranskription assoziiert, wohingegen hypomethylierte DNA die Bindung von Transkriptionsfaktoren erlaubt und somit mit einer Aktivierung der Genexpression korreliert (Cui et al., 2016).

1.3.2.2. Pränatale Entwicklung der männlichen Keimzellen

Die Entwicklung der männlichen Keimzellen von Säugetieren ist geprägt durch eine zweimalige Reprogrammierung der DNA-Methylierung im pränatalen Embryo (Heard and Martienssen, 2014). Die erste extensive Reprogrammierung des paternalen Genoms erfolgt in der frühen Embryogenese. Direkt nach der Fertilisation enthält die Zygote substantiell verschiedene maternale und paternale Genome. Aus diesem Grund ist es notwendig eine

totipotente Grundlage zu schaffen, um später eine für den Embryo entwicklungsrelevante Genexpression und Linienspezifizierung zu gewährleisten. In der Maus erfolgt daher unter anderem eine genomweite Demethylierung, die ihren Höhepunkt im Blastozysten-Stadium am embryonischen Tag (E) 3.5 erreicht (Hackett and Surani, 2013, Schagdarsurengin et al., 2016). Elternspezifische, geprägte Genloci sind für die spätere Genexpression relevant und entgehen dieser enormen Remodellierung (Messerschmidt et al., 2014). Zum Zeitpunkt der Implantation (E5.0) kommt es zu einer *de novo* Remethylierung des embryonalen Genoms in der inneren Zellmasse („inner cell mass“, ICM), die ungefähr bis zum Zeitpunkt E6.5 abgeschlossen ist (Hackett and Surani, 2013, Ramathal et al., 2015).

Die Urkeimzellen (PGCs) entstehen direkt nach Implantation und Gastrulation aus extraembryonalen mesodermalen Zellen im Ektoderm des Epiblasts am embryonischen Tag 6.5 (Ramathal et al., 2015, Schagdarsurengin et al., 2016). Zu diesem Zeitpunkt gleicht der Methylierungsstatus der Urkeimzellen dem der somatischen Zellen. Lediglich Gene für die Pluripotenz und CGI-assoziierte keimzellspezifische Gene liegen hypomethyliert vor, um schädigende Effekte nach ektopischer Aktivierung zu verhindern (McSwiggin and O'Doherty, 2018). Die initiale Runde der zweiten Demethylierung beginnt um den Zeitpunkt E8.0. Dabei reduziert sich das Methylierungslevel der PGCs von 70 % auf etwa 30 % an Tag E9.5 (Ly et al., 2015, Schagdarsurengin et al., 2016). Nicht alle genomischen Regionen werden zu diesem Zeitpunkt reprogrammiert und die Reduzierung der DNA-Methylierung wird ab Tag E10.5 fortgesetzt. In diesem Schritt erfolgt auch die Methylierung der Regionen, die der initialen Demethylierung entkommen (Ly et al., 2015).

An Tag E11.0 wandern die Keimzellen über das dorsale Mesenterium in die primitive Genitalleiste ein. Dort proliferieren die Zellen und entwickeln sich zu geschlechtsgeprägten Gonozyten (Ramathal et al., 2015, Schagdarsurengin et al., 2016). An Tag E13.5 ist der Prozess der Demethylierung abgeschlossen und resultiert in einem sehr niedrigen Methylierungslevel von etwa 14 % (Ly et al., 2015, Schagdarsurengin et al., 2016, McSwiggin and O'Doherty, 2018).

Aufgrund der zuvor erfolgten Prägung beginnen die Gonaden nun entweder zu Ovarien oder Hoden auszudifferenzieren. Die männlichen Gonozyten werden von den sich entwickelnden Hodenkanälchen (Tubuli Seminiferi) umgeben und in E15.0 – E16.0 bis kurz nach der Geburt mitotisch arretiert (Ly et al., 2015, Ramathal et al., 2015, Schagdarsurengin et al., 2016). Gleichzeitig erfolgt ab Tag E14.5 eine geschlechtsspezifische Remethylierung in den G1-arrestierten Pro spermatogonien. An Tag E16.5 sind bereits 50 % des männlichen Keimbahngenoms remethyliert und zwei Tage nach der Geburt ist die Mehrheit der DNA-Methylierungen (etwa 75 %) wieder hergestellt (E19-21) (Ly et al., 2015, McSwiggin and O'Doherty, 2018).

1.3.2.3. Postnatale Entwicklung der männlichen Keimzellen

Nach der Geburt wandern die Gonozyten zur Basalmembran der Tubuli und entwickeln sich zu Spermatogonien. Diese Zellen repräsentieren die basale Schicht des Keimepithels und haben die Fähigkeit der Selbsterneuerung, um die Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation zu sichern. Mit der Pubertät beginnt dann der Prozess der Spermatogenese (Schagdarsurengin et al., 2016). Dabei differenzieren einige der diploiden Spermatogonien zu Typ I Spermatozyten. Es folgt die erste meiotische Teilung und Generierung haploider Typ II Spermatozyten. Diese Entwicklung ist durch die *de novo* Remethylierung weiterer Genloci gekennzeichnet (La Salle et al., 2007, Ly et al., 2015). Die zweite meiotische Teilung resultiert in der Ausbildung von haploiden runden Spermatisden. Im letzten Schritt der Spermatogenese, der Spermio-genese, erfolgt die morphologische und strukturelle Transformation der runden Spermatisden zu elongierten Spermatisden (Stuppia et al., 2015). Dieser Prozess ist charakterisiert durch die Ausbildung des Kopfes, einschließlich des Acrosoms, des Mittelstücks und der Schwanzregion, dem Flagellum (Jan et al., 2012, Stuppia et al., 2015).

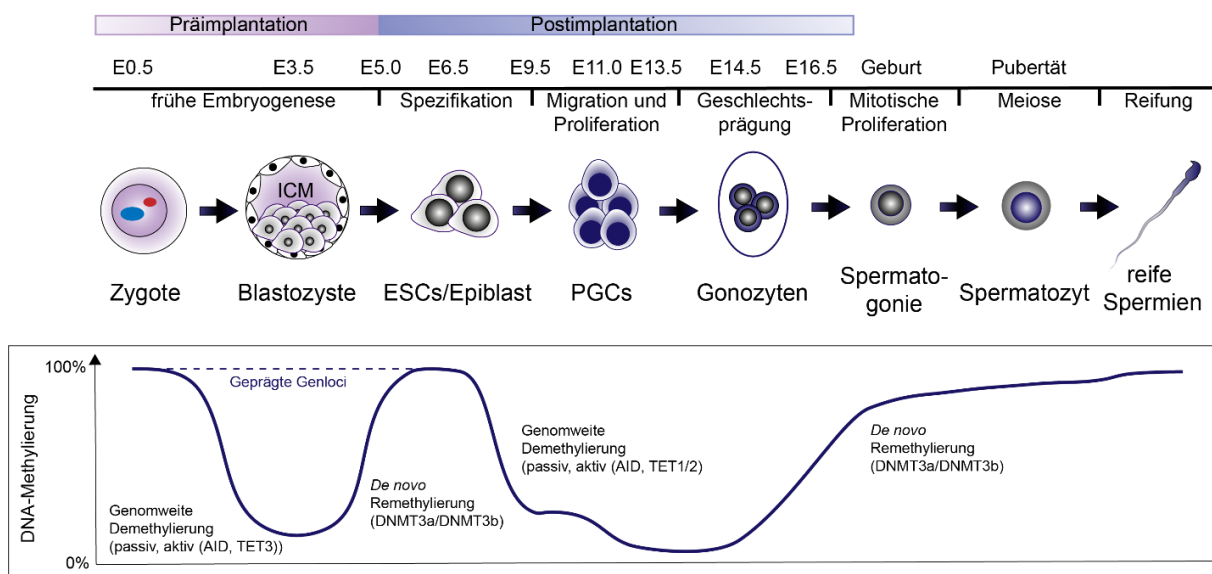


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der DNA-Methylierung während der männlichen Gametogenese der Maus. Modifiziert nach (Heard and Martienssen, 2014, Ramathal et al., 2015, Ly et al., 2015)

Die elongierten Spermatisden werden nun ins Lumen der tubuli seminiferi entlassen und wandern in den Nebenhoden (Epididymis). Dort durchlaufen die männlichen Keimzellen letzte Reifeprozesse und erwerben die Fähigkeit der Motilität (Krawetz, 2005, Stuppia et al., 2015). Während dieses Prozesses erfolgt auch die Remethylierung der letzten Genloci (Schagdarsurengin et al., 2016). Die ausgereiften Spermatozoen sind nun bereit zur

Befruchtung und werden bis zur Ejakulation in der Cauda epididymis gelagert (Toshimori and Eddy, 2015).

Eine Übersicht über den zeitlichen Verlauf der oben beschriebenen Prozesse ist in Abbildung 9 dargestellt.

1.3.3. Umweltinduzierte Fehlregulation der DNA-Methylierung während der Spermatogenese und deren Konsequenzen

Die komplexen Vorgänge während der Gametogenese und Spermatogenese bieten ein breites Spektrum für die Induktion von Epimutationen durch externe umweltinduzierte Einflüsse. Eine wichtige Rolle spielt dabei der Lebensstil der Eltern, wie zum Beispiel deren Ernährungsgewohnheiten. Im Tiermodell litten Nachkommen, deren Väter eiweißarme, fettreich oder Folat-defizient ernährt wurden verstärkt an metabolischen Erkrankungen, die direkt mit Änderungen im Methylom der väterlichen Spermien in Verbindung gebracht werden können. Vor allem regulatorische Gene, die in metabolischen Prozessen wie der Glucose-Insulin Homöostase oder Cholesterinbiosynthese involviert sind, waren von diesen Veränderungen betroffen (Ng et al., 2010, Carone et al., 2010, Fullston et al., 2013, Lambrot et al., 2013, Wei et al., 2014, de Castro Barbosa et al., 2016). Auch im Menschen sind solche Effekte beobachtet worden. Kinder von adipösen Vätern zeigen verringerte Methylierungslevel in mehreren geprägten Genloci (Soubry et al., 2016, Champroux et al., 2018). Diese Effekte sind mit dem Auftreten chronischer und metabolischer Erkrankungen der Nachkommen assoziiert (Champroux et al., 2018). Ein weiteres Beispiel sind Kinder aus der Överkalix Kohorte, deren Großväter während der Pubertät einen Überschuss an Nahrung zur Verfügung hatten. Die Enkel haben ein gesteigertes Risiko an Herzleiden oder Diabetes zu erkranken, einhergehend mit einer verringerten Lebenserwartung (Bygren et al., 2001, Schagdarsurengin and Steger, 2016).

Auch Ernährungseinflüsse während der Schwangerschaft, wie z.B. eine pränatale Unterernährung der Mütter, können ebenfalls gravierende Auswirkungen auf das Spermien-Methylom haben. Im Mausmodell sind Nachkommen der F₁-Generation unterernährter Mütter leichter und zeigen verschiedene metabolische Defekte. Dieser metabolische Phänotyp wird über männliche Keimbahn weiter auf die F₂-Generation übertragen (Siklenka et al., 2015). Ein ähnliches Phänomen konnte auch im Menschen gezeigt werden. Männliche Nachkommen von Müttern, die im niederländischen Hungerwinter von 1944/55 schwanger waren, leiden verstärkt an Herz-Kreislauf-Erkrankungen, kognitiven Störungen, reduzierten Nieren- und Lungenfunktionen und verminderter Glucosetoleranz (Schagdarsurengin and Steger, 2016).

Der Konsum von Lifestyle-Drogen wie Alkohol und Nikotin, aber auch der Konsum von harten Drogen wie Heroin oder Opioiden hat schwerwiegende Auswirkungen auf die männliche

Keimbahn. Die betroffenen Nachkommen zeigen neurobiologische Veränderungen einhergehend mit Änderungen der kognitiven Fähigkeit, sowie dem Angst- und Stressverhalten über mehrere Generationen. Des Weiteren konnten Veränderungen in der Sensitivität zu den entsprechenden Drogen aufgezeigt werden (Ouko et al., 2009, Mead and Sarkar, 2014, Vassoler and Sadri-Vakili, 2014, Goldberg and Gould, 2018).

Die Exposition der Eltern zu verschiedenen Xenobiotika führt ebenfalls zu Veränderungen des männlichen Keimbahn-Methyloms und transgenerationalen Effekten. Dies zeigt die *in utero* Exposition männlicher Mäuse mit Pestiziden wie Vinclozolin (Anway and Skinner, 2008) oder Permethrin in Kombination mit dem Insektizid N,N-Diethyl-3-methylbenzamide (DEET) (Manikkam et al., 2012). Die Nachkommen dieser Tiere sind bis zur F₃-Generation betroffen und zeigen Einschränkungen in der Fortpflanzungsfähigkeit, erhöhte Stressempfindlichkeit, einhergehend mit einem gesteigerten Krankheitsrisiko (Tumorbildung, Einschränkungen des Immunsystems usw.) (Schagdarsurengin et al., 2016).

Neben solchen externen Umwelteinflüssen kann auch posttraumatischer Stress in der frühen postnatalen Entwicklung Einfluss auf epigenetische Signaturen nehmen. Männliche Mäuse, die kurz nach der Geburt von ihrer Mutter getrennt wurden, zeigten soziale Defizite, depressive Verhaltensweisen und neigten verstärkt zu Angststörungen. Diese veränderten Verhaltensweisen lassen sich durch veränderte Methylierungsmuster in den paternalen Keimzellen auf die Nachkommen übertragen (Franklin et al., 2010).

Auch Krankheiten sind durchaus in der Lage ihre Spuren in der männlichen Keimbahn zu hinterlassen. So führt zum Beispiel die Induktion einer chronisch-entzündlichen Darm-erkrankung in männlichen Mäusen zu Veränderungen in den Methylierungssignaturen von Genen, die in den Energiemetabolismus involviert sind. Die Nachkommen dieser Väter zeigen ein verringertes Geburtsgewicht, sowie eine erhöhte Anfälligkeit für den Erwerb einer Colitis (Tschurtschenthaler et al., 2016).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Sepsis mit ihrer komplexen Pathophysiologie stellt nicht nur im akuten Stadium eine enorme Belastung für Patienten, deren Angehörige und das Gesundheitssystem dar, sondern auch noch Jahre danach. Epidemiologische und retrospektive Studien aus den vergangenen Jahren belegen die Existenz einer Sepsis-induzierten Immunsuppression, die lange nach dem eigentlichen Insult im Wirt persistiert. Diese ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Anfälligkeit der Patienten für sekundäre Infektionen, einhergehend mit einem gesteigerten Mortalitätsrisiko (Prescott et al., 2016).

Inwieweit und in welcher Weise eine überlebte Sepsis Spuren im Organismus, besonders im Immunsystem, hinterlässt oder ob diese sogar auf die Nachfolgeneration übertragbar sind,

ist bislang nicht bekannt. Aufgrund der hohen Inzidenz der Sepsis in der Bevölkerung ist es notwendig die langfristigen Auswirkungen nach überstandener Erkrankung vollständig zu begreifen. Mit Fokus auf das Gedächtnis der angeborenen Immunantwort und der intergenerationalen Vererbung soll im Rahmen dieser Arbeit das Konzept der Sepsis-induzierten Immunsuppression auf ein Tiermodell übertragen und folgende Fragen beantwortet werden (Abbildung 10):

1. Gibt es Unterschiede in der Zusammensetzung und Funktionalität von zirkulierenden postseptischen Leukozyten?
2. Bestehen Unterschiede in der Zusammensetzung hämatopoetischer Knochenmarkstammzellen nach überlebter Sepsis?
3. Welche langfristigen Auswirkungen hat eine Sepsis auf naive Knochenmarkmonozyten?
4. Beeinflusst eine Sepsis die männliche Keimbahn?
5. Hat eine überstandene Sepsis der Väter Einfluss auf die Entwicklung der Nachkommen und die Reaktionsfähigkeit des Immunsystems in Nachkommen der F₁-Generation?

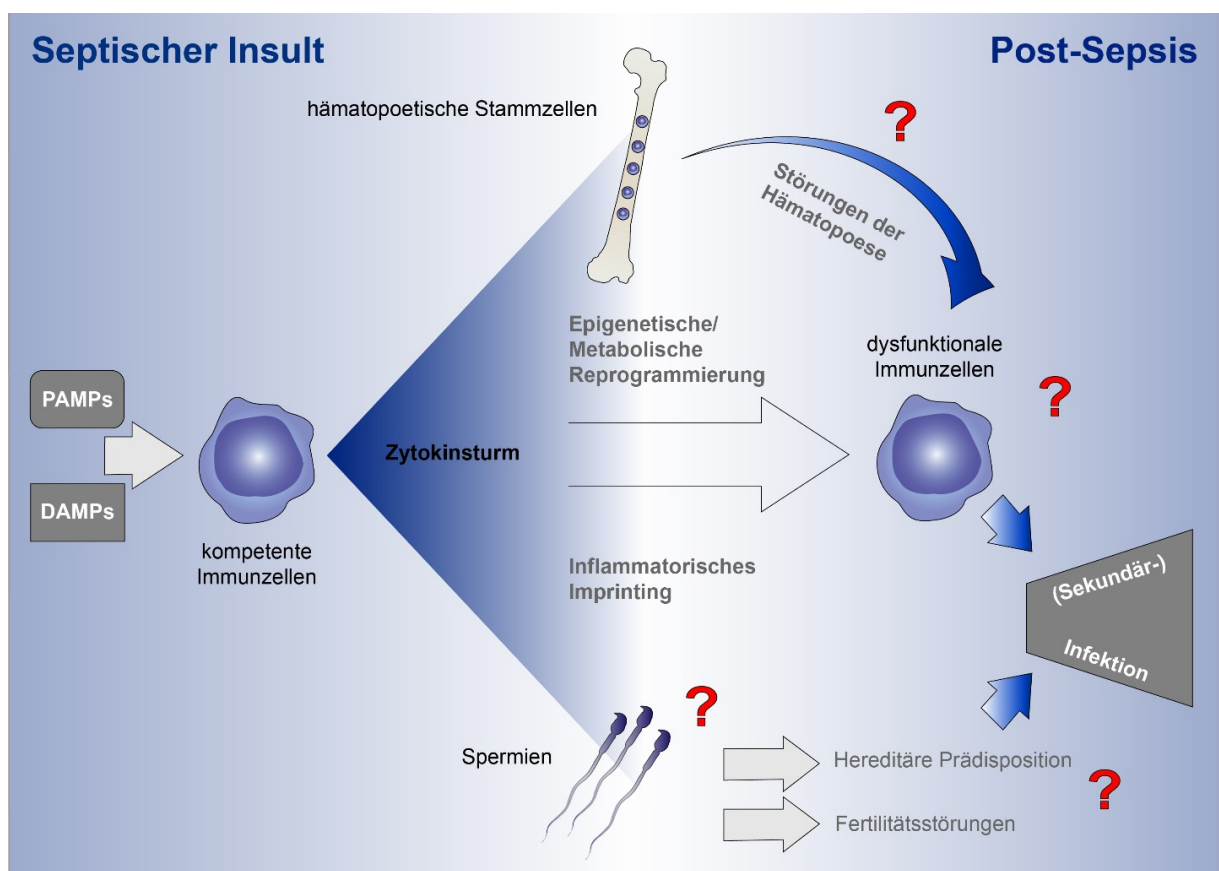


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Fragestellungen, die in dieser Arbeit evaluiert wurden. Modifiziert nach (Uhle et al., 2016).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Versuchstiere

Stamm	Geschlecht	Alter	Bezugsquelle
C57BL/6J	männlich	10 – 12 Wochen	Janvier, Le Genest-Saint-Isle (F)
C57BL/6J	weiblich	10 – 12 Wochen	Janvier, Le Genest-Saint-Isle (F)
C57BL/6J	männlich	Ab Geburt	Eigene Zucht
C57BL/6J	weiblich	Ab Geburt	Eigene Zucht

2.1.2. Zellkulturmedien

Donner's Medium	Natriumhydrogencarbonat	25 mM
	BSA	20 mg/ml
	Natriumpyruvat	1 mM
	Natriumlactat	0,53 %
	In Donner's Stock	
	Täglich frisch ansetzen!	
Donner's Stock	Natriumchlorid	135 mM
	Kaliumchlorid	5 mM
	Magnesiumsulfat	1 mM
	Calciumchlorid	2 mM
	Hepes, pH 7,4	30 mM
	In ddH ₂ O	
RPMI Medium	FBS, inaktiviert	10 %
	In RPMI 1640 Medium + GlutaMAX-I	

Seahorse-Medium	L-Glutamin	2 mM
	Pyruvat	1 mM
	Glucose	10 mM
	In Seahorse Base Medium	
	pH-Wert auf 7,4 einstellen	

2.1.3. Puffer und Lösungen

Agarosegel 0,7 %	Agarose	0,7 %
	In TAE-Puffer 1x	
ACK-Lysepuffer	Ammoniumchlorid	0,15 M
	Kaliumhydrogencarbonat	1 mM
	EDTA	0,1 mM
	In ddH ₂ O	
	pH-Wert auf 7,2 – 7,4 einstellen und steril filtrieren	
Ethanol 70 %	Ethanol	70 %
	In Nuklease-freiem Wasser	
Ethanol 80 %	Ethanol	80 %
	In Nuklease-freiem Wasser	
FBS, inaktiviert	FBS für 30 min bei 56°C inaktivieren und steril filtrieren	
Isolationspuffer	BSA	0,5 %
	EDTA	2 mM
	In PBS	
Ladepuffer 5x	Tris	62,5 mM
	SDS	2 %
	Glycerol	10 %
	β-Mercaptoethanol	5 %
	Bromphenolblau	0,002 %
Narkose	Ketamin	120 mg/kg KG
	Xylazin	16 mg/kg KG
	In NaCl 0,9%	

Natriumchloridlösung 0,2 %	Natriumchlorid In ddH ₂ O	0,2 %
Natriumchloridlösung 1,6 %	Natriumchlorid In ddH ₂ O	1,6 %
PFA 4 %	PFA In PBS	4 %
RLT mit DTT	DTT In RLT Puffer	150 mM
RLT mit β -Mercaptoethanol	β -Mercaptoethanol In RLT Puffer	1 %
TE-Puffer	Tris EDTA In ddH ₂ O pH-Wert auf 7,5 – 8,0 einstellen	10 mM 1 mM
TAE-Puffer 50x	Tris Essigsäure 100% EDTA In ddH ₂ O pH-Wert auf 8,3 einstellen	2 M 5,71 % 50 mM
TAE-Puffer 1x	TAE 50x In ddH ₂ O	1:50 verdünnt
Trypanblau-Lösung	Trypanblau In NaCl 0,9 %	0,5 %
Zellysepuffer, somatisch	SDS Triton X 100 In ddH ₂ O	0,1 % 0,5 %

2.1.4. Reagenzien und Chemikalien

Agarose	#A6013, Sigma-Aldrich, Steinheim
Aim V Medium	#12055-091, Thermo Fisher, St. Leon-Rot
Ammoniumchlorid	#31107, Honeywell, Bukarest (RO)
autoMACS Running Buffer	#130-091-221, Miltenyi, Bergisch-Gladbach
autoMacs Pro Washing Solution	#130-092-987, Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	PZN 1578675, Bayer Vital, Leverkusen
Bromphenolblau	#4F-057, Waldeck, Münster
BSA (Albumin Fraktion V, proteasefrei)	#T844.3, Roth, Karlsruhe
Buprenorphin (Temgesic Ampullen 0,3 mg)	PZN 6318298, RB Pharma, Slough (GB)
Calciumchlorid	#31307, Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	#132950, Sigma-Aldrich, Steinheim
Cell-Tak	#354240, Corning, Kaiserslautern
2-Deoxyglucose	#D8375, Sigma-Aldrich, Steinheim
DTT	#10197777001, Roche, Rotkreuz (CH)
EDTA	#8043.3, Roth, Karlsruhe
Ethanol	#100983, Merck, Darmstadt
Essigsäure	#100063, Merck, Darmstadt
FACS Lysing Solution	#349202, BD Biosciences, Heidelberg
FcR Blocking Reagent, mouse	#130-092-575, Miltenyi, Bergisch-Gladbach
FBS, ultra-low Endotoxin	#S-EUR-I, CellConcepts, Umkirch
Glucose	#8337, Merck, Darmstadt
L-Glutamin 200 mM, Gibco	#25030081, Thermo Fisher, St. Leon-Rot
Glycerol	# A1123, AppliChem, Darmstadt
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	PZN 3029843, Ratiopharm, Ulm
Hepes	#9105.2, Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	#31248, Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumhydrogencarbonat	#P748.1, Roth, Karlsruhe
Ketamin (Ketanest S 25 mg/ml)	PZN 08509909, Pfizer, Berlin
LPS-EB Ultrapure	#tlrl-3pelps, Invivogen, Toulouse (F)
Magnesiumsulfat	#1058861000, Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	#M6250, Sigma-Aldrich, Steinheim

Natriumchlorid	#31434-1KG-R, Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchloridlösung 0,9 %	PZN 2737756, B. Braun, Melsungen
Natriumhydrogencarbonat	#31437, Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumlactat-Lösung 50 %	PZN10094060, Caelo, Hilden
Natriumpyruvat, Gibco	#113-60-039, Thermo Fisher, St. Leon-Rot
PBS, Gibco, pH 7,4	#10010023, Thermo Fisher, St. Leon-Rot
PFA	#158127, Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	#2326.1, Roth, Karlsruhe
SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain	#S11494, Thermo Fisher, St. Leon-Rot
RNAse Zap	#AM9780, Thermo Fisher, St. Leon-Rot
RNAlater™ Stabilization Solution	#AM7021, Thermo Fisher, St. Leon-Rot
RPMI 1640 Medium + GlutaMAX-I, Gibco	#72400-021, Thermo Fisher, St. Leon-Rot
Seahorse XF Base Medium without Phenol Red	#103335-100, Agilent, Waldbronn
Taqman™ Universal PCR Master Mix	#4304437, Thermo Fisher, St. Leon-Rot
Tris	#01882.2, Roth, Karlsruhe
Trizol	# 15596018, Thermo Fisher, St. Leon-Rot
Triton X 100	#1086031000, Merck, Darmstadt
Wasser, Nuklease-frei	#129114, Qiagen, Hilden
Xylazin (Xylavet 20 mg/ml)	CP-Pharma, Burgdorf
Zymosan Depleted 10 mg	#tlrl-dzn, Invivogen, Toulouse, F

2.1.5. Kommerzielle Kits

Agilent RNA 6000 Nano Kit	#5067-1511, Agilent, Waldbronn
Agilent Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit	#103010-100, Agilent, Waldbronn
Genomic DNA Clean and Concentrator-10 Kit	#D4010, Zymo Research, Irvine (USA)
Mouse Inflammation Kit	#552364, BD Biosciences, Heidelberg
Monocyte Isolation Kit (BM), mouse	#130-100-629, Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit	#M6000B, R&D Systems, Wiesbaden
Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA Kit	#MTA00B, R&D Systems, Wiesbaden
Precellys CK14 Soft Tissue Homogenizing Kit, 2 ml	#P000912-LYSK0-A, Bertin, Rockville (F)
Precellys CK28 Hard Tissue Homogenizing Kit, 2 ml	#P000911-LYSK0-A, Bertin, Rockville (F)

Precellys MK28 Hard Tissue Grinding Kit, 2 ml	#P000910-LYSK0-A, Bertin, Rockville (F)
QIAamp DNA Blood Mini Kit	#51104, Qiagen, Hilden
Qiagen RNeasy Micro Kit	#74004, Qiagen, Hilden
Qiagen RNeasy Mini Kit	#74104, Qiagen, Hilden
QIAshredder	#79654, Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	# 205311, Qiagen, Hilden
Qubit dsDNA HS Assay Kit	#Q32851, Thermo Fisher, St. Leon-Rot

2.1.6. Oligonukleotide

Taqman™ Gene Expression Assays:

Zielgen	Assay-ID
Clec7a (Dectin1)	Mm01183349_m1
Hk2	Mm00443392_m1
Hprt	Mm00446968_m1
Il1a	Mm00439620_m1
Il6	Mm00446190_m1
Tlr2	Mm00442346_m1
Tlr4	Mm00445273_m1
Tnfa	Mm00443258_m1

2.1.7. Antikörper

Antikörper	Menge/Volumen	Katalognr.	Hersteller
CD3e-FITC	0,5 µg/1 µl	561827	BD Biosciences, Heidelberg
CD4-PerCP/Cy5.5	0,05 µg/0,25 µl	561115	BD Biosciences, Heidelberg
CD8a-PE/Cy7	0,26 µg/1,3 µl	100721	Biolegend, Koblenz
CD11b-FITC	0,03 µg/0,06 µl	561688	BD Biosciences, Heidelberg
CD16/32-PE	0,3 µg/10 µl	130-107-065	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD19-eFluor450	0,5 µg/2,5 µl	48-0193-80	Thermo Fisher, St. Leon-Rot
CD25-PE	0,2 µg/1 µl	101903	Biolegend, Koblenz
CD34-FITC	0,3 µg/10 µl	130-105-890	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD45-APC/Cy7	0,05 µg/0,25 µl	103115	Biolegend, Koblenz
CD45-eFluor450	0,5 µg/2,5 µl	48-0451-80	Thermo Fisher, St. Leon-Rot
CD45-Pacific Blue	0,5 µg/2,5 µl	103125	Biolegend, Koblenz
CD48-APC/Cy7	0,25 µg/1,25 µl	103431	Biolegend, Koblenz
CD117-APC (c-kit)	0,2 µg/1 µl	135107	Biolegend, Koblenz
CD117-PE (c-kit)	1 µg/5 µl	105807	Biolegend, Koblenz
CD127-APC (IL-7R α)	0,4 µg/2 µl	135011	Biolegend, Koblenz
CD150-PerCP/Cy5.5	1 µg/5 µl	115921	Biolegend, Koblenz
F4/80-PE	0,05 µg/0,25 µl	123109	Biolegend, Koblenz
IgG2b Isotype-PE	1 µg/5 µl	400608	Biolegend, Koblenz
IgG2c Isotype-FITC	1 µg/2 µl	400705	Biolegend, Koblenz
Lineage-Pacific Blue	1 µg/20 µl	133305	Biolegend, Koblenz
Ly-6A/E-PE/Cy7	0,25 µg/1,25 µl	122513	Biolegend, Koblenz
Ly-6C- FITC	2,5 µg/5 µl	128005	Biolegend, Koblenz
Ly-6C-PerCP/Cy5.5	0,05 µg/0,25 µl	128011	Biolegend, Koblenz

2.1.8. Verbrauchsmaterialien

Cell-vu Prestained MorphologySlides DRM-900	Millenium Sciences, New York (USA)
Deckglas 22x22	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Deckglas 24x24	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einmalskalpel	Aesculap, Tuttlingen
FACS-Röhrchen BD Falcon	BD Biosciences, Heidelberg
Filterplatten MultiScreenHTS-BV, 1,2 µm	Merck, Darmstadt
Filterspitzen Axygen Eppendorf 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Corning, Kaiserslautern
Filterspitzen epT.I.P.S.® Reload 19 µl	Eppendorf, Hamburg
Instrumentensatz, chirurgisch	Aesculap, Tuttlingen
Kanülen BD Microlance 3 23G, 25G, 27G	BD Biosciences, Heidelberg
Makrolonkäfig Typ II	Tecniplast, Buguggiate (I)
Makrolonkäfig Typ IV	Tecniplast, Buguggiate (I)
Mikroliterpipetten, Eppendorf Research plus 2,5 µl, 10 µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatte 96-Well für Adhäsionszellen	Greiner, Frickenhausen
Mikrotiterplatte 96-Well für Suspensionszellen	Sarstedt, Nümbrecht
Nahtmaterial, nicht resorbierbar Ethicon Prolene 6-0	Johnson & Johnson, Norderstedt
Nahtmaterial, resorbierbar Ethicon Vicryl 3-0	Johnson & Johnson, Norderstedt
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pasteurpipetten Kunststoff	NeoLab, Heidelberg
PCR Platten MicroAmp™ Fast Optical 96-Well	Thermo Fisher, St. Leon-Rot
Pellets Rod 16A	Lasvendi, Soest
Petrischalen 3 Größen	Greiner, Frickenhausen
Pipette, serologisch 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße, RNase-frei 0,2 ml, 0,5 ml	Kisker, Steinfurt
Reaktionsgefäße, RNase-frei 1,5ml	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Scepter Cell Counter Sensors 40 µm	Merck Millipore, Darmstadt
Seahorse XFp Cell Culture Miniplate	Agilent, Waldbronn
Spritzen 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Stericup Vakuum-Filtrationssystem	Merck Millipore, Darmstadt
Weichholzgranulat, staubfrei ABEDD LTE-001	Lab and Vet Service, Wien (A)
Zellsiebe 70 µm	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugationsröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner, Frickenhausen

2.1.9. Geräte

Akku-Haarschneider AKKURATA	Aesculap, Tuttlingen
Analysewaage Sartorius MC1	Sartorius, Göttingen
autoMACS Pro Separator	Miltenyi, Bergisch Gladbach
BD FACSVerser Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Bioanalyzer 2100	Agilent, Waldbronn
Brutschrank Heraeus	Heraeus, Hanau
ELx50 Microplate Washer	BioTek, Bad Friedrichshall
Epoche 2 Microplate Spectrophotometer	BioTek, Bad Friedrichshall
Hämozytometer Neubauer improved	Brand, Wertheim
Fusion FX	Vilber Lourmat, Collégien (F)
Genomatix Genome Analyzer	Intrexon Bioinformatics, München
Heizplatte Hot Plate 062	Labotect, Göttingen
Mastercycler nexus GX2	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Axiovert25	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Keyence Biozero	Keyence, Neu-Isenburg
Mikrowelle	Shark, Osaka (J)
Mini-Sub [®] Agarose-Gelelektrophorese Kammer	Bio-Rad, München
Nanodrop [™] 2000	Thermo Fisher, St. Leon-Rot
pH-Meter HI22091	Hanna Instruments, Vöhringen
Plattenschüttler Titramax	Heidolph, Schwabach
Precellys Evolution	Bertin, Rockville (F)
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher, St. Leon-Rot
Scepter [™] 2.0 Cell Counter	Merck Millipore, Darmstadt
Seahorse XFp Analyzer	Agilent, Waldbronn
StepOnePlus Real-Time PCR System	Thermo Fisher, St. Leon-Rot
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Thermomixer C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen Micro 200 und Micro 200 R	Hettich, Tuttlingen
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Vortex IKA MS 3 S36 Basic Chip	IKA-Werke, Staufen
Waage Sartorius BP 4100	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen Varifuge 3.0 und Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau

2.1.10. Software

StepOnePlus Software v2.3	Thermo Fisher, St. Leon-Rot
BD FACSuite (1.0.5.3840)	BD Biosciences, Heidelberg
BD FCAP Array v3	BD Biosciences, Heidelberg
Bioanalyzer 2100 Expert vB.02.08 (SR2)	Agilent, Waldbronn
Bioconductor v3.5	https://www.bioconductor.org/
Biotek Gen5 v1.11.5	BioTek, Bad Friedrichshall
Bismark v0.17.0	Babraham Bioinformatics, Cambridge (UK)
Bowtie2 v2.3.4	Johns Hopkins University, Baltimore (USA)
FastQC v0.11.5	Babraham Bioinformatics, Cambridge (UK)
GeneRanker	Intrexon Bioinformatics, München
GFOLD v1.1.4	https://bitbucket.org/feeldead/gfold/
Graphpad Prism v6.01 für Windows	GraphPad, La Jolla (USA)
HTseq count v8.0	EMBL, Heidelberg
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Nanodrop2000 Software v1.6.0.198	Thermo Fisher, St. Leon-Rot
R v3.3.1	The R Foundation, Auckland (NZ)
SAMtools v1.9	https://github.com/samtools/samtools
Seahorse Wave v2.4	Agilent, Waldbronn
SortMeRNA v2.1	Bonsai bioinformatics, Villeneuve (F)
STAR Alignment Software v2.7.0	https://github.com/alexdobin/STAR
Trimmomatic v0.33	https://github.com/timflutre/trimmomatic
TrimGalore v0.4.4	Babraham Bioinformatics, Cambridge (UK)

2.2. Methoden

2.2.1. Tierexperimentelle Methoden

Alle Tierversuche wurden entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) durchgeführt. Die Genehmigung erfolgte durch das Regierungspräsidium Karlsruhe unter der Referenznummer G-132/15.

2.2.1.1. Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit kamen ausschließlich Wildtyp-Tiere des Inzuchtstammes C57BL/6J der Gattung *Mus musculus* (Hausmaus) zum Einsatz. Dieser Stamm eignet sich hervorragend für die Klärung immunologischer und inflammatorischer Fragestellungen. Des Weiteren sind die Tiere einfach zu manipulieren und lassen sich gut für die Züchtung verwenden.

Die Tiere wurden im Alter von zehn bis zwölf Wochen von Janvier bezogen. Um standardisierte Bedingungen bei den Tierversuchen zu gewährleisten, erfolgte die Haltung der Tiere, sowie die Durchführung der Experimente im Klinisch Experimentellen Bereich (KEB) der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg. Vor Versuchsbeginn durften die Tiere eine Woche lang akklimatisieren.

2.2.1.2. Versuchstierhaltung

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte nach konventionellem Standard im KEB des IBF Heidelberg. Dort wurden die Tiere unter spezifiziert Pathogen freien (SPF) Bedingungen, mit regelmäßiger Überprüfung des pathogenen Status, gehalten.

Die Temperatur in den Haltungsräumen betrug standardmäßig 20 – 24 °C, die relative Luftfeuchtigkeit 50 – 60 %. Der Tag-Nacht-Zyklus erfolgte in einem 12-Stunden-Rhythmus.

Jeweils bis zu drei Tiere wurden in einem Makrolon Käfig des Typs II (350 cm²) gehalten. Die Verpaarungen und die Aufzucht der Neugeborenen bis zum Absetzen erfolgten in einem Makrolon Käfig des Typs IV (1815 cm²). Männliche Tiere, die ein extrem aggressives Verhalten zeigten, sowie die für die Verpaarungen eingesetzten Männchen wurden vereinzelt, um Ausfälle durch Revierkämpfe zu vermeiden.

Die Einstreu der Mäuse bestand aus staubfreiem Weichholzgranulat. Zellstoff und Nestlets wurden zur Haltunganreicherung eingesetzt. Die Fütterung der Tiere erfolgte standardmäßig *ad libitum* mit einer pelletierten Alleindiät (LASQCdiet Rod 16). Zur postoperativen Nachbehandlung erhielten die Mäuse ein Spezialfutter bestehend aus in Wasser eingeweichten Pellets, Haferflocken und Erdnussbutter. Als Trinkwasser wurde normales Leitungswasser verabreicht. Das Umsetzen der Tiere erfolgte alle drei bis vier Tage.

2.2.1.3. Anästhesie

Einige der in dieser Arbeit angewendeten Methoden erforderten eine vorherige Narkotisierung der Tiere. Darunter fielen sowohl die Operationen, als auch verschiedene Arten der Probenentnahme, bei denen die Tiere vital sein sollten.

Um dabei eine adäquate Narkosetiefe gewährleisten zu können, wurden die Tiere mittels Injektionsnarkose anästhetisiert. Zum Einsatz kam dabei ein Gemisch aus Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (16 mg/kg Körpergewicht).

Die Tiere wurden zunächst gewogen und das Narkosemittel anschließend gewichtsadaptiert intraperitoneal injiziert. Die Narkosetiefe wurde über den Zwischenzehenreflex geprüft. Das Stadium der chirurgischen Toleranz wurde nach zirka zehn Minuten erreicht und betrug eine Dauer von etwa 30 Minuten.

2.2.1.4. Operationen

Zur Klärung von immunologischen Fragestellungen in Bezug auf das Krankheitsbild Sepsis ist ein adäquates Tiermodell erforderlich. Verschiedene Methoden wurden entwickelt, um eine Sepsis mit ihren typischen pathophysiologischen Eigenschaften im Tier nachzuahmen. Als Goldstandard hat sich dabei die Methode der Cecal Ligation and Puncture (CLP) erwiesen, ein realistisches Modell zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis. Dabei wird das Caecum nach einer Laparotomie in einer definierten Länge ligiert, mithilfe einer Kanüle punktiert und der Bauchschnitt verschlossen. Der infektiöse Darminhalt dringt in den Bauchraum und führt dort zu einer bakteriellen Peritonitis. Die verschiedenen Darmbakterien gelangen in das Blutgefäßsystem und initiieren eine systemische Immunreaktion des Wirtes. Die betroffenen Tiere zeigen die für eine Sepsis typischen Symptome, wie Hypothermie, Tachykardie und Tachypnoe. Ein infauster Verlauf führt zum Multiorganversagen und schließlich zum Tod (Rittirsch et al., 2009).

Die Mortalität der Tiere in diesem Modell ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Eine wichtige Determinante ist dabei die Länge des ligierten Caecums. Aber auch die Größe der für die Punktion verwendeten Kanüle, sowie die Anzahl der Punktionen sind entscheidende Kriterien für den Schweregrad der induzierten Sepsis im Tier (Rittirsch et al., 2009).

Im Falle einer milden CLP, wie sie in der vorliegenden Arbeit praktiziert wurde, liegt die Mortalität männlicher Tiere bei 30 – 40 % und weiblicher Tiere bei 20 – 30 %.

Um eine Standardisierung der Methode zu erreichen, wurden die Operationen konsequent vom selben Experimentator unter denselben Bedingungen durchgeführt.

2.2.1.4.1. Cecal Ligation and Puncture (CLP)

Die narkotisierten Mäuse wurden zunächst in Rückenlage auf einer mit Zellstoffpapier bedeckten Heizplatte fixiert, um einer Hypothermie vorzubeugen. Danach wurde den Tieren eine Augensalbe (Bepanthen) appliziert, um ein Austrocknen der Cornea der kataleptischen Augen zu verhindern. Der Bauchbereich wurde rasiert und desinfiziert. Es erfolgte die Eröffnung des Bauchraumes mit einem ca. 1 cm langen Schnitt entlang der Linea alba (mediane Laparotomie) durch beide Hautlagen. Der Blinddarm wurde vorsichtig ausgelagert und 0,5 cm des Caecums mit einem chirurgischen Faden (Ethicon Vicryl 3-0) abgebunden. Es folgte eine einmalige Punktion mit einer 23G-Kanüle. Mit leichtem Druck wurde eine kleine Menge des Darminhaltes durch die Punktionsstelle gedrückt. Der Blinddarm wurde rückverlagert und die Innenhaut mit einer durchgängigen, sowie die Außenhaut mit einer Punktnaht mit chirurgischen Fäden (Ethicon Prolene 6-0) verschlossen. Die Mäuse erhielten eine subkutane Injektion von 200 µl NaCl 0,9 %, um einer Dehydrierung entgegenzuwirken.

2.2.1.4.2. Placebo Operation (Sham-OP)

Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten lediglich eine Placebo-Operation (Sham-OP). Der Operationsverlauf erfolgte analog dem Operationsverlauf einer CLP, lediglich das Abbinden und die Punktion des Blinddarms entfielen. Folglich kam es hier zu keiner Infektion des Bauchraums und keiner Sepsis.

2.2.1.4.3. Postoperative Nachbehandlung

Für die Aufwachphase wurde die Einstreu mit Zellstoffpapier abgedeckt und die Käfige auf einer Heizplatte positioniert. Um den Tieren die Futteraufnahme zu erleichtern, wurde das angefeuchtete Spezialfutter (s. 2.2.1.2) in einer kleinen Petrischale direkt in den Käfig gestellt. Die operierten Mäuse wurden vorsichtig in Seitenlage in ihre Käfige zurückgesetzt. Bedingt durch die relativ kurze OP-Dauer, flachte die Narkose der Tiere einer Käfiggruppe relativ zeitnah ab und ermöglichte das direkte Rücksetzen der Tiere in ihrer ursprünglichen Konstellation. Die Tiere erwachten nach etwa 120 Minuten vollständig.

Als Schmerzmedikation erhielten die Tiere eine subkutane Injektion von Buprenorphin (0,05 mg/kg Körpergewicht), verabreicht alle acht Stunden über einen Zeitraum von drei Tagen. Der erste Bolus erfolgte unverzüglich nach Erwachen der Tiere.

Des Weiteren wurde der Zustand der Tiere über einen Zeitraum von einer Woche evaluiert. Die Beurteilung erfolgte die ersten drei Tage alle acht Stunden und wurde anschließend auf einmal täglich reduziert. Die Bewertung unterlag einem entsprechenden Punktesystem (Scoring) unter Berücksichtigung von Parametern wie Aussehen, Fluchtverhalten, Atemfrequenz und Gewichtsverlust. Beim Überschreiten eines Schwellenwertes oder im Falle

einer offenen Bauchnaht wurden die Tiere aus dem Versuch genommen und mittels zervikaler Dislokation euthanasiert.

2.2.1.5. Zucht

Zur Untersuchung von generationsübergreifenden Effekten wurden postseptische Mäuse (n = 10) und Kontrolltiere (n = 10) sechs Wochen nach CLP mit jeweils zwei gesunden Weibchen verpaart. Nach acht Tagen, entsprechend zwei Östruszyklen, wurden die Männchen separiert, um einen paternalen Einfluss auf die mütterliche Zuwendung und somit auch auf das Überleben der Nachkommen auszuschließen (Rodgers et al., 2013). Im gleichen Zuge erfolgte die Isolierung der Weibchen zur Bestimmung der Wurfzugehörigkeit.

2.2.1.6. Charakterisierung der Nachkommen

Nach der Geburt wurde die Wurfgröße der F₁-Generation bestimmt und die Überlebensdauer der Welpen über einen Zeitraum von zwölf Wochen evaluiert. 23 Tage postnatal erfolgten das Absetzen von den Muttertieren und die Geschlechtsbestimmung. Zur Ermittlung der Gewichtsentwicklung wurden die Mäuse nach der Absetzung zweimal pro Woche über einen Zeitraum von 57 Tagen gewogen.

2.2.1.7. Tötung der Versuchstiere und Probenentnahme

Die Probenentnahme zur Untersuchung der individuellen Langzeitfolgen erfolgte sechs Wochen oder zwölf Wochen post-CLP. Die Nachkommen wurden im Alter von zwölf Wochen oder 32 Wochen (*In vivo* Stimulation, s. 2.2.1.8) euthanasiert. Bei allen Arbeitsschritten war ein zügiges Arbeiten erforderlich, um die Qualität des biologischen Materials nicht zu gefährden.

Für die Probenentnahme wurden die Tiere zunächst, wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, narkotisiert. Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz wurden die Mäuse in Rückenlage auf einen Styroporblock gelegt und fixiert. Zur Entnahme der männlichen Geschlechtsorgane wurde Abdominalregion mit 70%igem Ethanol desinfiziert und die äußere Haut entlang der Linea alba etwa 1 cm weit eröffnet. Mit einer Pinzette wurde die innere Haut angehoben, das Peritoneum vorsichtig komplett eröffnet und der Bauchschnitt kaudal erweitert. Durch vorsichtiges Ziehen mit einer Pinzette am umliegenden Fettgewebe wurde der Hoden hervorgeholt. Es folgte eine Ektomie von Hoden und Epididymis. Die Epididymis wurde bis zur Weiterverarbeitung in eine Petrischale mit 37 °C warmen PBS überführt und die Hoden in RNAlater bei -20 °C eingefroren.

Im weiteren Vorgehen wurde der Bauchschnitt cranial erweitert, der Thorax eröffnet und das Herz freigelegt. Mit einer zuvor heparinisierten 1 ml Spritze und einer 27G Kanüle erfolgte eine

Punktion des linken Herzventrikels. Das gesamte Blutvolumen wurde langsam aspiriert. Nach Entnahme des Blutes trat unverzüglich der Tod des Tieres ein. Mäuse, bei denen keine Blutentnahme erfolgte, wurden mittels zervikaler Dislokation euthanasiert.

Die Milz wurde vorsichtig herauspräpariert, gewogen und in eine Petrischale mit PBS gelegt. Für die Entnahme des Knochenmarks folgte eine distale Erweiterung des Bauchschnitts. Das Fell, sowie die Muskeln wurden soweit präpariert, dass der Femur frei lag. Es folgte das Ausheben des Caput ossis femoris aus dem Acetabulum und somit die Abtrennung der Beine vom restlichen Korpus. Die Pfote wurde am Sprunggelenk abgetrennt und sämtliche Gewebereste mit einem Zellstofftuch vorsichtig von den Knochen abgerieben. Femur und Tibia beider unterer Extremitäten wurden am Kniegelenk getrennt und bis zur Weiterverarbeitung in eine Petrischale mit 37 °C warmen RPMI Medium mit 10 % FBS überführt.

Für die bronchoalveoläre Lavage wurde die Trachea freigelegt und mit einem kleinen Einschnitt eröffnet. Mit einer 1 ml Spritze wurde langsam 1 ml eiskaltes PBS durch das Ostium injiziert, die Lunge gespült und die Flüssigkeit langsam wieder aspiriert. Dieser Vorgang wurde insgesamt 10x durchgeführt und die Lavage in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss erfolgte die Exzision der Lungenflügel. Diese wurden in mehrere Fragmente geschnitten und in RNAlater bei -20 °C gelagert.

2.2.1.8. *In vivo* Stimulation

Um die systemische Responsivität des Immunsystems der F₁-Generation zu analysieren, erfolgte eine Aktivierung der Immunantwort mittels LPS Stimulation.

Dazu erhielten jeweils acht männliche und acht bzw. sieben (NaCl-Gruppen) weibliche CLP- und Sham-Nachkommen eine Injektion von LPS oder NaCl als Kontrolle intraperitoneal injiziert. 24 Stunden nach Injektion wurden die Tiere gewogen und mittels Herzpunktion euthanasiert. Das gewonnene Blut wurde für fünf Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Das Plasma wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Isolation von murinen Primärzellen

2.2.2.1.1. Isolation von Knochenmarkzellen und Monozyten mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

Für die Isolation der Knochenmarkzellen wurden die zuvor präparierten Knochen an beiden Enden eröffnet und mit 5 ml RPMI Medium plus 10 % FBS mithilfe einer 25G-Kanüle komplett in eine Petrischale ausgespült. Die Zellsuspension wurde mit einer 25 ml serologischen Pipette

aufgenommen und über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Petrischale wurde nochmals mit etwas Medium ausgespült und die Suspension ebenfalls auf das Sieb gegeben. Mithilfe der Rückseite einer 5 ml serologischen Pipette wurden große Knochenmarkstücke durch das Sieb passiert, um die Zellen zu vereinzeln. Um so wenig Zellverlust wie möglich zu erreichen, wurde das Sieb nochmal mit 5 ml Medium nachgespült. Es folgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 300 x g und 4 °C. Das Zellpellet wurde in 20 ml Isolationspuffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Die anschließende Isolation von Monozyten erfolgte mittels immunmagnetischer Depletion am AutoMACS Pro Separator und dem Monozyten-Isolations-Kit von Miltenyi Biotec nach Herstellerangaben. Das Prinzip dieser Technik beruht auf einer indirekten antikörpervermittelten Bindung der Nichtzielzellen an magnetische Kügelchen. Durch Anlegen eines magnetischen Feldes werden die gebundenen Zellen zurückgehalten, während die Zielzellen das magnetische Feld ungehindert passieren.

Die Knochenmarkzellsuspension wurde zehn Minuten bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 175 µl Isolationspuffer resuspendiert und 25 µl FcR Blocking Reagent hinzugefügt. Es folgte die Zugabe von 50 µl des Biotin-gekoppelten Antikörper-Cocktails, sowie eine fünfminütige Inkubation im Kühlschrank (4 °C und dunkel). Die Zellen wurden mit 10 ml Isolationspuffer gewaschen und das Pellet anschließend in 400 µl Isolationspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Anti-Biotin konjugierter Microbeads erfolgte eine weitere Inkubation für zehn Minuten im Kühlschrank. Die Separation erfolgte am AutoMACS Pro unter Auswahl des Programmes „Depeltes“.

Die Volumenangaben des Isolationspuffers, des Antikörper-Cocktails, sowie der magnetischen Microbeads beziehen sich auf eine Zellzahl von bis zu $5 \cdot 10^7$ Knochenmarkzellen. Bei einer höheren Zellzahl wurden die zugegebenen Volumina entsprechend adaptiert.

2.2.2.1.2. Isolation von Milzzellen

Die präparierte Milz wurde durch ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen passiert. Das Zellsieb wurde mit PBS nachgespült, um verbleibende Zellen mitzunehmen. Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Erythrozytenlyse wurden die Zellen in 5 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert und fünf Minuten inkubiert. Die Suspension wurde erneut abzentrifugiert und die Zellen in 5 ml PBS aufgenommen. Im Anschluss wurden die Milzzellen quantifiziert.

2.2.2.1.3. Isolation von Spermien mittels Aufschwimm-Methode (Swim-up)

Zur Isolation der männlichen Keimzellen aus der Cauda Epididymis kam die äußerst effiziente Aufschwimm-Methode („Swim-up“) zum Einsatz. Dabei wird die Cauda Epididymis inzidiert

und mit Spermienisolationsmedium überdeckt. Freibewegliche Spermatozoen können nun während einer Inkubationszeit von etwa 30 bis 60 Minuten über den Zellbruchstücken in den Überstand aufschwimmen. Durch Abnahme der oberen Fraktion erhält man eine reine Zellkultur mit intakten Spermien.

Die Dissektion der Cauda Epididymis erfolgte unverzüglich in warmen PBS, um ein Überleben der Spermien zu gewährleisten und somit einen Bias in der Auswertung der Spermioграмme auszuschließen. Dabei wurden Hoden, Caput und Corpus Epididymis, sowie das noch anhaftende Fettgewebe vorsichtig entfernt. In einem 5 ml FACS-Röhrchen wurde 1 ml 37 °C warmes Donner's Medium vorgelegt. Die Cauda Epididymis wurde mehrfach inzidiert und vorsichtig, ohne die Wände des Röhrchens zu berühren, in das vorgelegte Medium überführt. Die Vorgehensweise wurde mit der zweiten Cauda Epididymis wiederholt. 3 ml warmes Donner's Medium wurden langsam, am Rand des Gefäßes entlang dazu pipettiert, gefolgt von einer 45-minütigen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Um eine Kontamination mit somatischen Zellen oder Zellbruchstücke auszuschließen, wurden die obersten 2,5 ml der Spermien suspension abgenommen und in ein neues FACS-Röhrchen überführt. Es folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 2.500 x g bei 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen in 2 ml PBS resuspendiert. Die Reinheit der Spermien suspension wurde mikroskopisch überprüft, gefolgt von einer Zellzahlbestimmung.

2.2.2.2. Quantifizierung der Zellen

Die Ermittlung der Zellzahlen ist notwendig, um die Zellen definiert in die Versuche einsetzen zu können. Dabei kann die Quantifizierung optisch mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauerzählkammer) oder automatisiert mittels eines Zellzählgerätes erfolgen. In dieser Arbeit kamen beide Varianten zum Einsatz.

Die Zellzahlen der Milzzellen und der Spermien wurden mit einem Hämozytometer des Types Neubauer improved ausgezählt. Dabei handelt es sich um einen speziellen Objektträger, dessen Mittelsteg um 0,1 mm vertieft liegt. Diese Tiefe gewährleistet nach Aufbringen des Deckglases eine valide Auszählung der Zellen. Zur Beurteilung der Vitalität können die Zellen mit Trypanblau angefärbt werden. Trypanblau ist ein toxischer, anionischer Azofarbstoff und ist nicht membrangängig. Infolgedessen werden tote Zellen blau eingefärbt wohingegen vitale Zellen farblos bleiben.

Für die Quantifizierung der Zellen in dieser Arbeit wurden die Splenozyten 1:100 in PBS und die bronchoalveolären Zellen 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Die Spermien wurden unverdünnt gezählt. Die Auszählung aller Zellen erfolgte, mit Ausnahme der Spermien, über die vier Großquadrate („L“, Abbildung 11).

Die Zellkonzentration wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (VF) nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Konzentration} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Zellen}_{\text{gesamt}}}{4} \times 10^4 \times \text{VF}$$

Bei den Spermien erfolgte die Auszählung der fünf mittleren Felder („E“, Abbildung 11). Dabei wurden alle Spermienköpfe gezählt, die genau oder mehr als die Hälfte im Feld lagen. Spermienköpfe die genau zur Hälfte im Feld lagen wurden nur am oberen und am rechten Rand mitgezählt. Die Berechnung der Spermienkonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \text{Zellen}_{\text{gesamt}} \times 0,05 \times 10^6$$

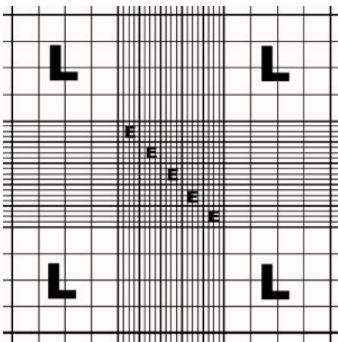


Abbildung 11: Zählfeld des Neubauer improved Hämocytometers. Die mit „E“ gekennzeichneten Felder wurden zur Auszählung der Spermien verwendet, die mit „L“ gekennzeichneten Felder für die anderen Zelltypen.

Knochenmarkzellen und Monozyten wurden mit dem Cell Scepter von Merck quantifiziert. Das Messprinzip dieses Zellzählgerätes basiert auf der Impedanz-basierten Partikelerkennung. Die Zellen werden mit Unterdruck in eine Messkapillare gezogen. In Abhängigkeit von der Zellgröße kommt es dabei zu einer entsprechenden Erhöhung der Impedanz. Dem Ohm'schen Gesetz zu Folge führt dies zu einer direkt proportionalen Veränderung der elektrischen Spannung. Diese Spannungsspitzen werden beim Durchtritt jeder einzelnen Zelle gemessen. Aus der Anzahl der gemessenen Impulse lässt sich die Anzahl der Zellen bestimmen. Darüber hinaus lassen sich auch Rückschlüsse auf die Zellgröße ziehen und somit auch auf einzelne Zellpopulationen.

Für die Zellzahlmessung wurden das Knochenmark 1:100 und die Monozyten-Suspension 1:10 mit PBS in einem Gesamtvolumen von 200 µl in einem 2 ml Reaktionsgefäß verdünnt. Der verwendete 40 µm Sensor wurde in das Gerät eingebracht und in das Reaktionsgefäß gehalten. Die Flüssigkeit wurde nun in das Gerät aufgesogen und die Zellzahl berechnet. Die gemessene Konzentration musste anschließend noch um den Verdünnungsfaktor korrigiert werden.

2.2.2.3. Stimulationsexperimente

Um funktionelle Einschränkungen der Reaktionsfähigkeit des Immunsystems nach einer überstandenen Sepsis besser charakterisieren zu können, wurden das Vollblut und die Monozyten der 12-Wochen-Tiere, sowie die Alveolarmakrophagen der F₁-Generation mit LPS oder Zymosan stimuliert.

Für die Stimulation der Immunzellen im Vollblut wurden 100 µl RPMI Medium mit 10 % FBS in einer 96-Well Platte vorgelegt. 100 µl heparinisieretes Vollblut wurden dazu pipettiert.

200.000 Monozyten wurden für die Stimulation abgenommen und für fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1.200 µl RPMI Medium mit 10 % FBS resuspendiert. Viermal 300 µl der Zellsuspension wurden in eine 96-Well Platte für adhärenente Zellen pipettiert, sodass letztendlich 50.000 Zellen pro Well vorlagen.

1·10⁶ Zellen der Bronchoalveolarlavage wurden für fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 600 µl Aim V Medium aufgenommen und dreimal 200 µl in eine 96-Well Platte für Suspensionszellen pipettiert.

Die Stimulation selbst erfolgte mit 200 ng/ml LPS (alle drei Zelltypen) oder 250 µg/ml Zymosan (nur Alveolarmakrophagen). Als Kontrolle diente jeweils ein unstimulierter Ansatz durch Zugabe von NaCl. Die Stimulation des Vollblutes und der Monozyten wurden als Duplikate angesetzt. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach 24 Stunden wurden die Proben für fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert, die Überstände abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Die TNF-α (alle Zelltypen) und IL-6 (Vollblut und Monozyten) Konzentrationen wurden mittels ELISA (s. 2.2.5) bestimmt.

2.2.2.4. Spermogramm

Das Spermogramm wurde nach den Richtlinien der WHO erstellt (WHO, 2010). Sowohl für die Bestimmung der Motilität als auch der Morphologie wurden jeweils zwei Aliquots abgenommen und pro Aliquot 200 Spermien im Keyence Biozero Mikroskop bei einer 200x Vergrößerung ausgewertet. Die Qualität der Aliquots wurde entsprechend Tabelle 1 bewertet. Ergaben sich größere Abweichungen, musste ein neues Aliquot gezogen werden.

2.2.2.4.1. Motilität

Obwohl Spermien äußerst robuste Zellen sind, verlieren sie *in vitro* durch den Einfluss von Dehydrierung oder Änderung des pH-Wertes oder der Temperatur sehr rasch ihre Beweglichkeit. Daher wurden für die Motilitätsversuche die beiden Aliquot bereits während des Swim-ups entnommen. Die erste Entnahme erfolgte nach 20 Minuten der Inkubationszeit, die zweite Entnahme am Ende der Inkubationszeit aus der obersten Schicht der Zellsuspension. Um den Temperatureinfluss so gering wie möglich zu halten, wurden die verwendeten

Objekträger auf 37 °C erwärmt. Der Probenauftrag, sowie der Transport zum Mikroskop erfolgten auf einem 37 °C warmen Wärmepad.

Pro Aliquot wurden 10 µl Spermiesuspension auf einen sauberen Objekträger gegeben und ein 22 x 22 mm Deckglas vorsichtig aufgelegt. Es folgt eine kurze Inkubationszeit von einer Minute, um eine Verteilung der Probe zu erlauben. Die Probe wurde unter dem Mikroskop systemisch analysiert. Das zweite Aliquot wurde analog prozessiert.

Die Motilität der Spermien wurde entsprechend Tabelle 2 in drei Kategorien eingeteilt.

Tabelle 1: Bestimmung der Qualität zweier Aliquots: Akzeptable Unterschiede zwischen zwei Prozentsätzen für einen bestimmten Durchschnitt bei einem Konfidenzintervall von 95 %, bestimmt aus Wiederholungszahlen von 200 Spermatozoen (insgesamt 400 gezählt) (WHO, 2010).

Durchschnitt (%)	Akzeptabler Unterschied	Durchschnitt (%)	Akzeptabler Unterschied	Durchschnitt (%)	Akzeptabler Unterschied
0	1	17-23	8	93-95	5
1	2	24-34	9	96-97	4
2	3	35-65	10	98	3
3-4	4	66-76	9	99	2
5-7	5	77-83	8	100	1
8-11	6	84-88	7		
12-16	7	89-92	6		

Tabelle 2: Einteilung der Spermienmotilität.

Kategorie	Kriterien
Progressive Motilität (PR)	Aktive Bewegung der Spermatozoen, linear oder in einem großen Kreis, unabhängig von der Geschwindigkeit
Eingeschränkte Motilität (NP)	Alle Arten der nicht-progressiven Bewegung, z.B. Schwimmen in kleinen Kreisen, minimales Vorankommen des Kopfes oder nur Geißelschlag
Immotil (IM)	Keine Bewegung

2.2.2.4.2. Morphologie

Um die Morphologie der Spermien adäquat untersuchen zu können, müssen die Zellen zuvor angefärbt werden. Zu diesem Zweck kamen spezielle, bereits mit einer Kombination aus Methylblau und Kresylviolett beschichtete Objektträger zum Einsatz (Cell-vu Prestained Slides). 10 µl der Spermienprobe wurden direkt nach dem Swim-up aus der oberen Fraktion abgenommen und auf den Objektträger pipettiert. Ein 24 x 24 mm Deckglas wurde vorsichtig aufgelegt und leicht angedrückt. Die Probe wurde 15 Minuten äquilibriert. Das zweite Aliquot wurde analog behandelt. Die Auswertung erfolgte systematisch unter dem Mikroskop.

Die Spermien wurden hinsichtlich Malformation von Kopf (verformt, zu groß, zu klein), Mittelstück (geknickt, asymmetrisch, zu dick, zu dünn) und Schwanz (zu kurz, geknickt, zusammengerollt (coiled)) analysiert und generell als intakt oder defekt bewertet.

2.2.3. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein wichtiges Werkzeug zur Charakterisierung von Zellen. Dabei fließen die Zellen hintereinander, also vereinzelt, im Probenstrom an einem Laser vorbei. Es kommt zu einer Streuung des Lichtes, die an einem Sensor gemessen wird. Nach vorne gestreute Strahlung (Forwardscatter, FSC) gibt dabei Aufschluss über die Zellgröße, während die in einem 90 °C-Winkel seitliche Strahlung (Sidescatter, SSC) Aufschluss über die Granularität der Zellen gibt. Durch die Koppelung von fluoreszenzkonjugierten Antikörpern an die Oberflächenmoleküle von Zellen, werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch den Laser angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses spezifische Signal dient dazu, die Zellen entsprechend ihrer Markierung zu sortieren. In dieser Arbeit wurde das BD FACSVerser zusammen mit der FACSsuite Software verwendet. Ausgestattet mit drei Lasern können bis zu acht Parameter gleichzeitig analysiert werden.

2.2.3.1. Frequenzanalyse von Lymphozyten und deren Vorläuferzellen

Zur Klärung der Frage, ob es lange nach einer überstandenen Sepsis bestehende Änderungen von Immunzellpopulation gibt, wurden verschiedene Organe hinsichtlich der Leukozytenfrequenz durchflusszytometrisch analysiert. Die Zentrifugation erfolgte generell für fünf Minuten bei 500 x g und Raumtemperatur, sofern nicht anders angegeben.

Für das Gating wurden die Zellen zunächst in einem FSC-SSC-Plot dargestellt, gefolgt von einer Exklusion von Dupletten über ein sogenanntes „Area Scaling“ (FSC-A-FSC-H-Plot). Danach erfolgte die Diskriminierung der verschiedenen Zellpopulationen, wie in den entsprechenden Gating-Strategien (Abbildung 12 bis Abbildung 14) dargestellt.

2.2.3.1.1. Vollblut

Für die durchflusszytometrischen Analysen des Vollblutes wurden zweimal 50 µl Vollblut in jeweils ein FACS-Röhrchen überführt und die entsprechenden Antikörper für die Diskriminierung der Monozyten/Makrophagen (CD45-Pacific Blue, CD11b-FITC, F4/80-PE und Ly6C-PerCP/Cy5.5) oder regulatorischen T-Zellen (CD45-APC/Cy7, CD4-PerCP/Cy5.5, CD25-PE und CD127-APC) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten im Kühlschrank, gefolgt von einem Waschschrift mit 500 µl PBS. Um Störungen der Messung durch Erythrozyten zu exkludieren, erfolgte die Resuspension der Zellen in 450 µl FACS Lysing Solution 1x. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation im Kühlschrank und einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 400 µl PBS gelöst und gemessen. Das Gating ist in Abbildung 12 dargestellt.

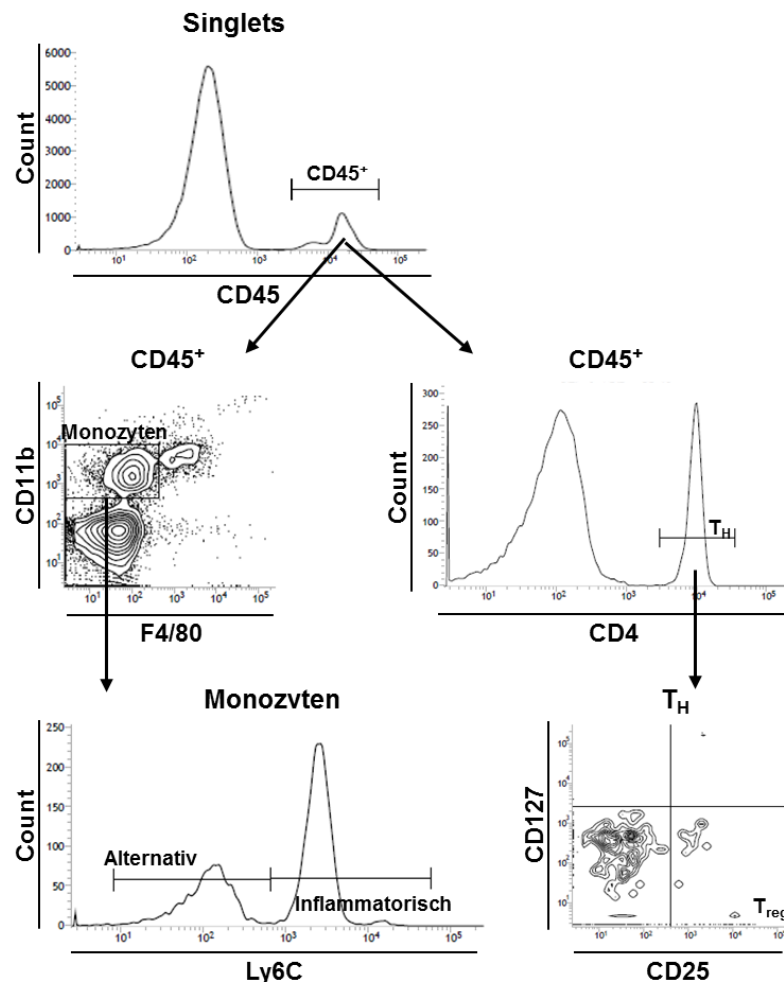


Abbildung 12: Gating-Strategie zur Analyse von Immunzellpopulationen im Vollblut.

2.2.3.1.2. Milz

Zur Untersuchung Zellpopulationen in der Milz wurden $1 \cdot 10^6$ Milzzellen pro Ansatz mit den entsprechenden Antikörpern für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Die Antikörper-Färbung der Milz erfolgte in zwei Ansätzen (Lymphoide Zellen: CD45-APC/Cy7, CD19-eFluor450, CD3e-FITC, CD4-PerCP/Cy5.5, CD8a-PE/Cy7, CD25-PE und CD127-APC; Myeloide Zellen: CD45-eFluor450, CD11b-FITC, F4/80-PE, Ly6C-PerCP/Cy5.5 und CD11c-PE/Cy7). Nach einem Waschschrift mit 2 ml Isolationspuffer wurden die Zellen in 200 μ l Isolationspuffer aufgenommen und am FACS Verse gemessen.

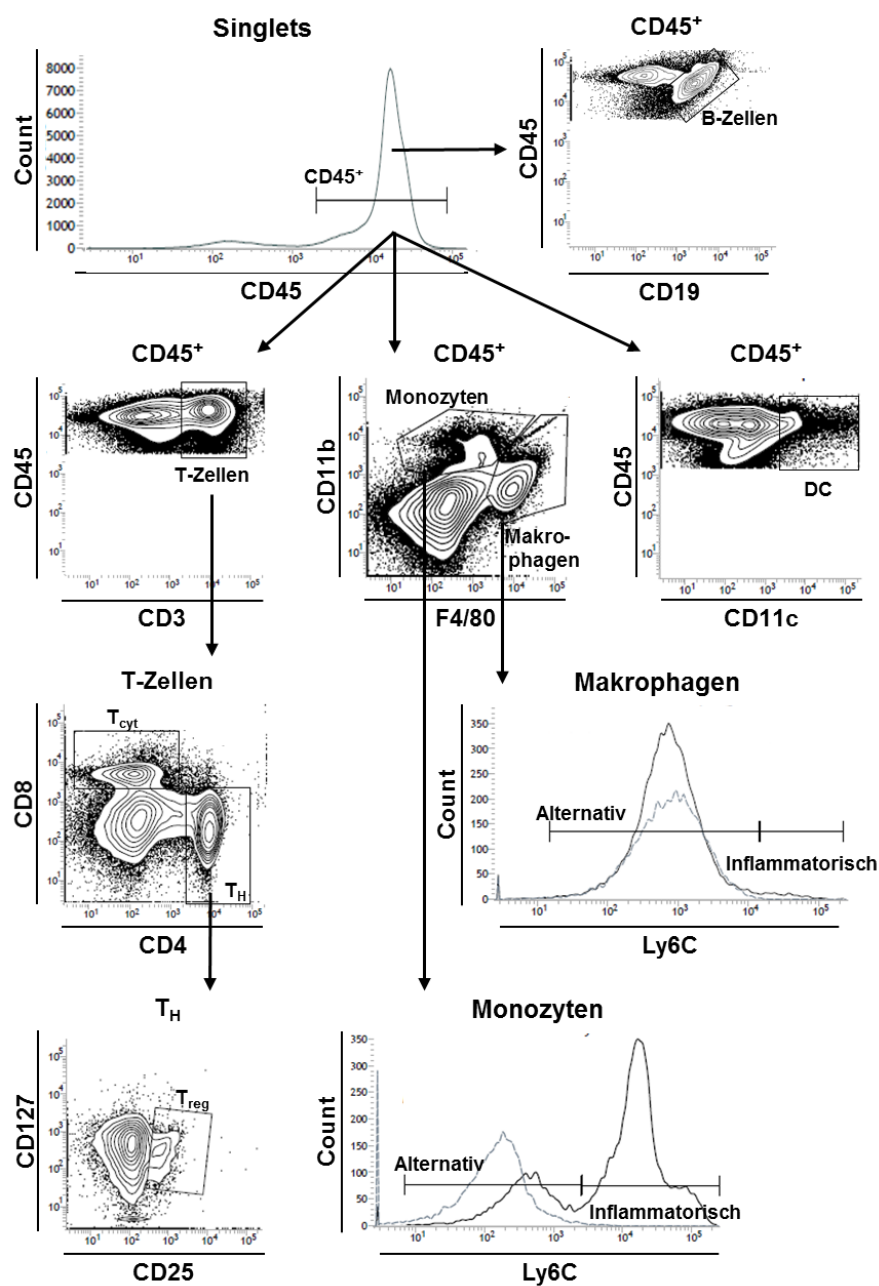


Abbildung 13: Gating-Strategie zur Untersuchung der Frequenz von Immunzellen der Milz.

Das Gating für die Monozyten und Makrophagen erfolgte mittels FMO-Kontrollen (Fluorescence minus one) für CD11b, F4/80, CD11c und Ly6C und ist in Abbildung 13 dargestellt.

2.2.3.1.3. KM-Nische

Für die Evaluierung der Frequenzen von Hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen abgenommen und für fünf Minuten bei $500 \times g$ und $4^\circ C$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in $100 \mu l$ Isolationspuffer resuspendiert, gefolgt von der Zugabe der entsprechenden Antikörper (Lineage-Pacific Blue, LyA/E (Sca-1)-PE/Cy7, CD117 (c-kit)-APC, CD34-FITC, CD16/32-PE, CD48-APC/Cy7 und CD150-PerCP/Cy5.5). Die Färbungen wurden 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert und zweimal mit $2 ml$ Isolationspuffer gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurde das Pellet in $350 \mu l$ PBS mit 4% PFA resuspendiert und erneut für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten bei $4^\circ C$ wurde das Pellet in $500 \mu l$ Isolationspuffer aufgenommen, am FACS Verse gemessen und wie in Abbildung 14 dargestellt gegated. Das Gating erfolgte mittels FMO-Kontrollen für CD34, CD16/32, CD48 und CD150.

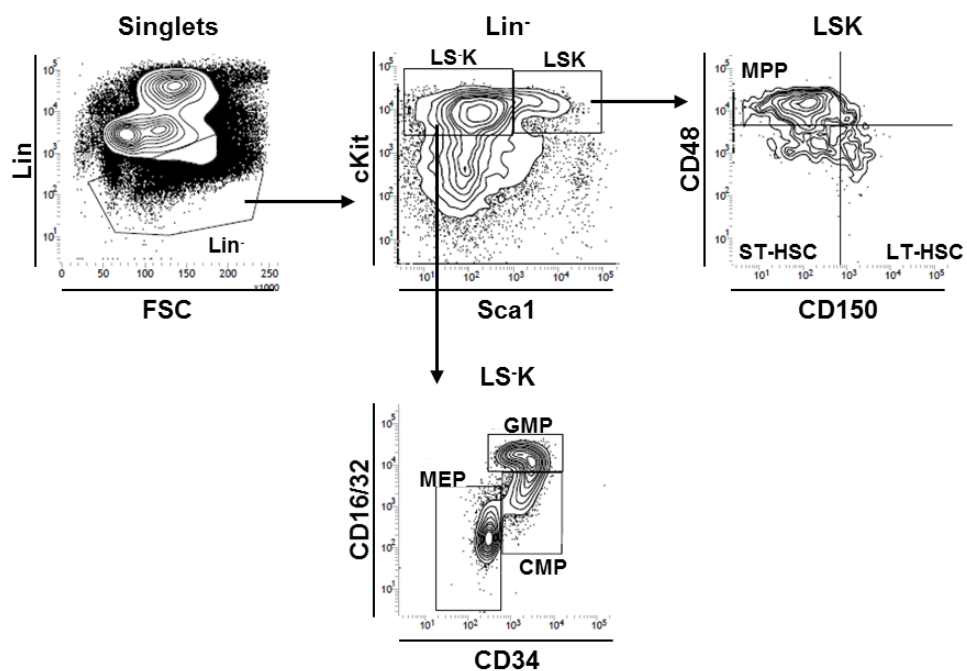


Abbildung 14: Gating-Strategie zur Identifizierung von HSC und verschiedenen Progenitorzellen.

2.2.3.2. Bestimmung muriner Zytokine mittels CBA

Der „Cytometric Bead Array“ CBA basiert auf der Multiplexing-Technologie und ermöglicht die gleichzeitige Messung mehrerer Analyte aus einer Probe. Dabei sind sogenannte Fängerantikörper („Capture-Antibody“) spezifisch für das zu detektierende Analyt an Beads unterschiedlicher Fluoreszenzintensität (APC) gekoppelt. Diese binden an die entsprechenden Antigene in der Probe. Ein zweiter Antikörper, der Detektor-Antikörper, ist mit einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff (PE) konjugiert. Dieser bindet ebenfalls spezifisch an den Analyt. Die so entstandenen Sandwich-Komplexe können nun durchflusszytometrisch analysiert werden. Die Unterscheidung der Analyte erfolgt über die Bead-Fluoreszenz im APC-Kanal und die Bestimmung der Intensität der einzelnen Analyte über die Fluoreszenz des Detektor-Antikörpers im PE-Kanal. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über eine Eichkurve.

In dieser Arbeit wurde das BD Mouse Inflammation Kit für die gleichzeitige Quantifizierung der Zytokine IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF und IL-12p70 mit einem 96-Well Filterplattensystem verwendet. Im ersten Schritt erfolgte das Ansetzen einer Standardreihe in einem Bereich von 20 – 5.000 pg/ml, sowie des Leerwertes (0 pg/ml). Dazu wurden die Standard-Beads in 2 ml Assaydiluent für 15 Minuten äquibriert, vorsichtig gemischt und eine Verdünnungsreihe angesetzt. Zur Durchführung des Assays wurde die Filterplatte zunächst mit 100 μ l Waschpuffer angefeuchtet und über ein angelegtes Vakuum getrocknet. Nun wurden jeweils 50 μ l des Zytokin-Bead-Mixes, 50 μ l der Probe oder des Standards und 50 μ l des PE-Detection Reagents in die Platte pipettiert. Zum Mischen des Reaktionsansatzes wurde die Platte für 5 Minuten bei 1.100 rpm auf einem Plattenschüttler gestellt, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation im Dunkeln. Die Flüssigkeit wurde über ein Vakuum aspiriert und die Beads in 120 μ l Waschpuffer resuspendiert. Die Proben wurden erneut für fünf Minuten bei 1.100 rpm auf einem Plattenschüttler gemischt und am FACSVerse gemessen. Die Auswertung erfolgte über die FCAP Array Software.

2.2.3.3. Qualitätskontrollen

Um den Erfolg der in Abschnitt 2.2.2.1.1 durchgeführten Monozytenisolation zu überprüfen, wurden 50.000 Zellen abgenommen und für fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 μ l Isolationspuffer resuspendiert und jeweils 100 μ l auf FACS-Röhrchen verteilt. Für die Färbung wurden die entsprechen Antikörper (CD11b-PE und Ly6C-FITC; Isotypkontrollen: Rat IgG2b Isotype-PE und Rat IgG2c Isotype-FITC)) hinzugefügt und für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach dem Waschen mit 2 ml Isolationspuffer wurden die Proben in je 200 μ l Isolationspuffer resuspendiert und gemessen. Das Gating ist in Abbildung 15 dargestellt. Die Reinheit der isolierten Monozyten lag zwischen 80 und 95 %.

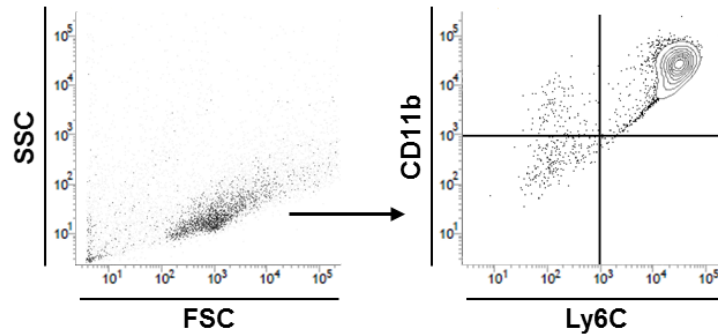


Abbildung 15: Gating-Strategie für die Qualitätskontrolle der Monozyten-Isolation.

2.2.4. Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1. Genexpression

2.2.4.1.1. RNA Isolierung

Hoden und Lunge

Für die Isolation der Gesamt-DNA aus Geweben wurde ein kombiniertes Verfahren der Trizol-Isolation und der Aufreinigung mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit eingesetzt.

Dazu wurden die in RNAlater eingefrorenen Gewebe zunächst aufgetaut und gründlich mit NaCl 0,9 % gründlich abgespült. Jeweils ein halber Hoden wurde in ein Precellys CK14 Röhrchen, sowie ein Viertel des Lungenflügels in ein Precellys CK28 Röhrchen überführt. Zu den Proben wurden jeweils 1 ml Trizol hinzugegeben. Der Zellaufschluss des Hodens erfolgte anschließend im Precellys Evolution für fünfmal 20 Sekunden und 30 Sekunden Pause bei 5.000 rpm, sowie der Lunge für zweimal 20 Sekunden und 30 Sekunden Pause bei 6.800 rpm. Die Homogenisate wurden in RNase-freie 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, 200 µl Chloroform dazu pipettiert, 15 Sekunden von Hand geschüttelt, drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl 70%iger Ethanol zu den Proben hinzugegeben, gemischt, die Lysate auf eine RNeasy Mini Spin Säule gegeben und für eine Minute bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 700 µl RW1 Puffer dazugegeben und erneut zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl RPE Puffer, gefolgt von der erneuten Zugabe von 500 µl RPE Puffer auf die Säulen und einer Zentrifugation für zwei Minuten bei 8.000 x g. Die Säulen wurden auf neue Röhrchen gesetzt und für eine Minute bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Anschließend wurde die Säule auf ein RNase-freies 1,5 ml Tube gesteckt und mit 50 µl

RNAse-freiem Wasser eluiert. Quantität und Qualität wurden mit dem Nanodrop 2000 und dem Bioanalyzer bestimmt. Die Proben wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.4.1.2. RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)

Bei der RNA-Sequenzierung handelt es sich um eine High-Throughput-Sequenziermethode, die es ermöglicht das gesamte Transkriptom einer Zelle zu analysieren. Zur Library Präparation werden die Transkripte zunächst poly(A) gereinigt, um die mRNA zu extrahieren und anschließend fragmentiert. Nach der cDNA Synthese mit Random Primern werden die Proben amplifiziert und mittels Sequencing by Synthesis-Technologie sequenziert.

Die Library Präparation und die Sequenzierung erfolgten bei GATC (Konstanz) mit einem Illumina HiSeq2500 Sequencer.

2.2.4.1.3. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten (Saiki et al., 1988). Die Methode beruht auf dem Prinzip der DNA-Replikation. Im ersten Schritt erfolgt eine Auftrennung der Doppelstränge durch Hitzedenaturierung. Durch Reduzierung der Temperatur wird die Anlagerung von zwei definierten Oligonukleotidprimern an die DNA (Annealing) ermöglicht. Diese Flankierung des zu amplifizierenden DNA-Segmentes ist die Grundlage für die Spezifität der Methode. Im letzten Schritt erfolgt die DNA-Synthese durch die Hitzestabile Taq-Polymerase (Elongation). Eine exponentielle Vervielfältigung der Ziel-DNA entsteht dabei durch repetitive Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation.

cDNA Synthese

Für Genexpressionsanalysen erfolgt zunächst die Umschreibung einzelsträngiger RNA in doppelsträngige cDNA mittels reverser Transkription (RT). Dies geschieht mithilfe der reversen Transkriptase, einem Enzym das ursprünglich aus Retroviren stammt und den Einbau der viralen RNA in das Erbgut des Wirtes katalysiert.

In dieser Arbeit wurde zur DNA-Synthese das QuantiTect Reverse Transcription Kit verwendet. Dabei erfolgte im ersten Schritt die Elimination möglicher Kontaminationen durch genomische DNA (gDNA).

Dazu wurden je nach Probe 500 – 1.000 ng RNA eingesetzt und ein gDNA Eliminationsmix wie folgt angesetzt:

RNA Template	12 µl
gDNA Wipeout Puffer, 7x	2 µl

Die Proben wurden für zwei Minuten bei 42 °C im Mastercycler nexus GX2 inkubiert.

Für die Reverse Transkription wurde zu jeder Probe Reverse Transcription Master Mix wie folgt zugegeben:

Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Puffer, 5x	4 µl
RT Primer Mix	1 µl

Die cDNA-Synthese erfolgte für 20 Minuten bei 42 °C im Mastercycler nexus GX2, gefolgt von der Inaktivierung der Reversen Transkriptase für drei Minuten auf 95 °C. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

qRT-PCR

Bei der quantitativen PCR (qPCR) wird die DNA-Amplifikation in Echtzeit gemessen. Dies erfolgte in dieser Arbeit unter Verwendung von TaqMan Gene Expression Assays. Diese bestehen aus unmarkierten, sequenzspezifischen Primerpaaren und einer TaqMan-Sonde. Bei den für die Quantifizierung eingesetzten TaqMan-Sonden handelt es sich um Hybridisierungs-Sonden, die sich das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) zu Nutze machen. Als Donor dient dabei der Reporter-Farbstoff FAM™ am 5'-Ende der Sonde. Als Akzeptor fungiert am 3'-Ende ein nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ). Bei intakten Sonden unterdrückt der Quencher somit das Fluoreszenzsignal des Reporters. Während der Gegenstrang-Synthese wird das Fluorochrom durch die 5'-3' Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase am 5' abgebaut. Der Reporter entfernt sich vom Quencher und das nun emittierte Fluoreszenzsignal wird am Ende der Elongation in jedem Zyklus detektiert. Die Emission des Reportes nimmt dabei proportional mit der amplifizierten DNA-Menge zu (Holzapfel/Wickert 2007, Livak 1995).

Des Weiteren wurde der Taqman Fast Advanced Master Mix verwendet. Dieser beinhaltet die AmpliTaq® Fast DNA Polymerase, AmpErase® uracil-N glykosylase (UNG) zur Vermeidung von carry-over-Kontaminationen, dNTPs mit dUTP und das Fluorochrom ROX™ als passive Referenz.

Ein Reaktionsansatz für die qPCR war dabei wie folgt zusammengesetzt:

Taqman Fast Advanced Master Mix	10 µl
RNAse-freies H ₂ O	8 µl
Taqman Gene Expression Assay, 20x	1 µl
cDNA	1 µl

Jede Probe wurde als Triplikat angelegt. Zusätzlich wurde für jedes Zielgen eine „No Template Control“ (NTC) mitgeführt, um Kontaminationen der PCR-Reagenzien auszuschließen. Die Amplifikation erfolgte im Fast-Modus über 40 Zyklen im StepOnePlus Real-Time PCR System unter folgenden Bedingungen:

Aktivierung von UNG	2 min	50 °C
Aktivierung der DNA Polymerase	20 s	95 °C
Denaturierung	1 s	95 °C
Annealing/Elongation	20 s	60 °C

Die Real-Time PCR verläuft typischerweise in drei Phasen: die exponentielle Phase, die lineare Phase und die Plateau-Phase. Während der exponentiellen Phase erfolgt die Verdoppelung der DNA-Menge mit jedem PCR-Zyklus. Dies entspricht einer PCR-Effizienz von 2. Gegen Ende des Prozesses kommt es aufgrund des Verbrauchs der PCR-Komponenten und der steigenden Anzahl an PCR-Produkten zunächst zu einer Verlangsamung (lineare Phase) und letztendlich zu einer gänzlichen Hemmung der Amplifikation (Plateau-Phase).

Für die Quantifizierung wird somit die exponentielle Phase herangezogen. Dazu wird der sogenannte C_T -Wert (Threshold cycle – Schwellenwertzyklus) ermittelt. Dieser Wert beschreibt den Zyklus bei dem die Fluoreszenz des Reporters erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Zum Vergleich der einzelnen Proben wird eine Gerade durch die C_T -Werte gezogen. Dies gewährleistet die gleiche Fluoreszenzintensität und somit auch die gleich vorliegende Menge an PCR-Produkt zwischen den verschiedenen Proben.

Die relative Genexpression (RGE) wurde mittels der ΔC_T -Methode berechnet. Dabei erfolgt zunächst eine Normalisierung der Expressionsergebnisse durch den Bezug des C_T -Wertes des Zielgens auf den C_T -Wert eines nicht-regulierten Referenzgens:

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

In dieser Arbeit wurde das *Housekeeping Gen* Hprt als Referenz eingesetzt. Anschließend erfolgte die Berechnung des Genexpressionsunterschiedes (Ratio) mit folgender Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta C_T}$$

2.2.4.2. DNA Methylierungsanalyse

DNA Methylierungen können mittels Bisulfittechnik analysiert werden. Im Fokus der Methode steht die sogenannte Bisulfit-Konvertierung. Dabei erfolgt die Umwandlung der Base Cytosin durch eine hydrolytische Deaminierung (Bisulfit-Reaktion, Abbildung 16) in die Base Uracil. Methylierte Cytosine werden dabei nicht konvertiert. In der nachfolgenden PCR Amplifikation der Bisulfit-behandelten DNA wird Uracil durch die Base Thymin ersetzt. Methylierte und unmethylierte Cytosine können so nach der Sequenzierung bioinformatisch unterschieden werden.

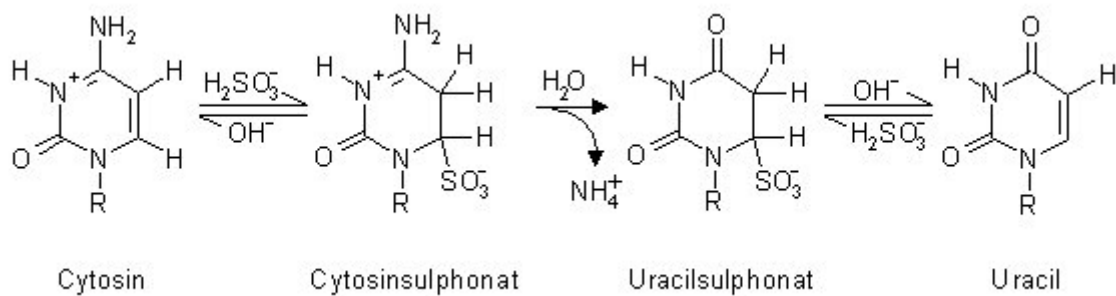


Abbildung 16: Bisulfit-Reaktion. Im ersten Schritt kommt es durch eine nukleophile Addition von Bisulfit (Natriumhydrogensulfit) zu einer Sulphonierung des Cytosins zu Cytosinsulphonat. Im zweiten Schritt erfolgt dann die hydrolytische Deaminierung zu Uracilsulphonat. Schlussendlich wird die Sulphonsäuregruppe hydrolytisch abgespalten (Desulphonierung) und Uracil liegt vor (Shapiro et al., 1973).

2.2.4.2.1. DNA Isolation aus Spermien

Die Isolierung der Spermien DNA erfolgte mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit nach einem modifizierten Protokoll.

Zunächst wurden $1 \cdot 10^6$ Spermien von CLP und Sham Tieren bei $2.500 \times g$ für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Spermien für zehn Minuten mit somatischem Zelllysepuffer auf Eis inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 1 ml PBS. Die Zellen wurden in 500 ml RLT mit DTT resuspendiert und in ein Precellys MK28 Tube mit Stahlkügelchen überführt. Die Homogenisierung erfolgte bei 6.000 rpm für fünfmal 30 Sekunden mit jeweils 30 Sekunden Pause mit dem Precellys Evolution. Die Zellen wurden in ein RNase- freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 250 μ l AL-Puffer und 250 μ l Ethanol dazugegeben. Die Zellsuspension wurde auf eine QIAamp Mini Spin Säule gegeben und bei $6.000 \times g$ für 1 min zentrifugiert. Im Anschluss wurden 500 μ l AW1 Puffer auf die Säule gegeben, gefolgt von einer erneuten Zentrifugation. 500 μ l AW2 Puffer wurden auf die Säule gegeben und für drei Minuten mit voller Geschwindigkeit ($20.000 \times g$) zentrifugiert. Die Säule

wurde auf ein neues Collection Tube gesetzt und zum Trocknen der Membran erneut für eine Minute bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach übersetzen der Säule auf ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß erfolgte die Elution der DNA in drei Zentrifugationsschritten bei 6.000 x g für eine Minute in jeweils 200 µl AE Puffer. Die Konzentrations- sowie Reinheitsbestimmung erfolgte am Nanodrop 2000.

Die DNA-Isolate wurden mithilfe des DNA Clean and Concentrator-10 Kit nach Herstellerprotokoll aufkonzentriert. Dazu wurde die zweifache Volumen an DNA Binding Buffer zur Probe gegeben und gemischt. Die Proben wurden auf eine Zymo-Spin IC-XL Säule gegeben und für 30 Sekunden bei 13.000 x g zentrifugiert. Die Säulen wurden zweimal mit 200 µl DNA Wash Buffer gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte zweimal mit je 10 µl Nuklease-freiem Wasser. Die Reinheit der Proben wurde am Nanodrop und die Quantität am Qubit Fluorometer bestimmt.

2.2.4.2.2. Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)

Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) ist eine effiziente Hochdurchsatz-Methode für die Analyse von DNA Methylierungen. Das Besondere dieser Methode ist die reduzierte Repräsentation des Gesamtgenoms durch CpG-reiche genomische Regionen (CpG-Inseln). Dies wird erreicht, indem im ersten Schritt ein Verdau der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym *MspI* vorgenommen wird. Das Enzym *MspI* schneidet die palindromische Sequenz 5'CCGG3' und führt zur Anreicherung von DNA Fragmenten unterschiedlicher Länge mit einem CpG-Dinukleotid an jedem Ende. Im nächsten Schritt werden die durch den Verdau der doppelsträngigen DNA entstehenden ‚sticky ends‘ an den 3'-Enden aufgefüllt (End-Repair) und an beiden Strängen mit einem Adenosin versehen. Dieses sogenannte A-Tailing ist für die nachfolgende Adapterligation erforderlich. Nach Ligation der Adapter werden die Fragmentlängen bestimmt (Size-Selection). Im Anschluss erfolgen die Bisulfit-Konvertierung und die Amplifikation der Fragmente mittels PCR. Die so erhaltenen DNA-Fragmente werden aufgereinigt und nachfolgend sequenziert.

Für die vorliegende Arbeit wurden fünf Spermien-DNA-Proben pro Kondition (CLP und Sham) mittel RRBS analysiert. Der Restriktionsenzymverdau mit *MspI*, sowie die Library Preparation und die anschließende Sequenzierung mit dem Illumina HiSeq 3000 erfolgte durch den Diagenode RRBS Service (Liege, Belgien).

2.2.4.3. Quantität und Qualität von Nukleinsäuren

Um adäquate Sequenzierdaten zu erhalten, müssen die Nukleinsäuren für NGS-Anwendungen bereits nach der Aufreinigung eine entsprechend hohe Qualität aufweisen. Dies

bedeutet, die Nukleinsäuren sollten integer vorliegen und frei von jeglichen Kontaminationen, wie z.B. Proteinen oder organischen Rückständen von der Isolation, sein.

Auch müssen die Nukleinsäuren für die nachfolgenden Analysen in entsprechender Quantität vorliegen. Die Konzentrationsbestimmung kann dabei über die Messung der Absorption oder fluoreszenzbasiert erfolgen. In dieser Arbeit kamen beide Methoden zum Einsatz.

2.2.4.3.1. Spektrometrische Analyse mit dem Nanodrop

Standardmäßig erfolgte die quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren mit dem Nanodrop 2000. Dabei handelt es sich um einen UV-VIS-Spektrometer, das die Optische Dichte (OD) von RNA und DNA bei ihrem Absorptionsmaximum von 260 nm misst. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz entspricht dabei eine $OD_{260} = 1$ bei RNA 40 µg/ml und bei DNA einer Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook & W Russell 2001). Zusätzlich werden die Absorptionen bei 280 und 230 nm gemessen, um eventuelle Verunreinigungen zu ermitteln. Der A_{280}/A_{260} Wert gibt dabei die relative Häufigkeit von Proteinen an. Dieser Wert sollte für RNA, als auch für DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Mit dem A_{230}/A_{260} Wert können Verunreinigungen durch organische Rückstände ermittelt werden. Dieser Wert sollte für RNA über 1,5 und für DNA über 2,0 liegen. Die Methode ist dabei nicht sehr empfindlich. Bei geringen Mengen an Nukleinsäuren ist keine Unterscheidung zu Artefakten möglich. Zur Messung wurden 1 µl der isolierten Nukleinsäure auf das Messpodest pipettiert, der Probenarm geschlossen und die Probe vermessen.

2.2.4.3.2. Fluoreszenz-basierte Messung mittels Qubit

Für die RRBS-Analyse der Spermien DNA erfolgte eine Messung der Konzentration am Qubit Fluorometer mit dem Qubit dsDNA HS Assay Kit. Das dahinterliegende Messprinzip beruht auf die spezifische Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen an die Nukleinsäuren. Die Fluoreszenz wird angeregt und das emittierte Licht gemessen. Da es sich um eine indirekte Messmethode handelt, erfolgt die Ermittlung der Nukleinsäurekonzentrationen über zuvor gemessene Standards.

Dazu wurde zunächst die Working Solution vorbereitet, indem das dsDNA HS Reagent 1:200 mit dem dsDNA HS Puffer verdünnt wurde. Die Standards wurden aus 190 µl Working Solution und 10 µl Standard gemischt und für die Proben wurde 199 µl Working Solution mit 1 µl Probe vermischt. Standards und Proben wurden kurz gevortext und dann die beiden Standards im Qubit vermessen. Nach der Kalibrierung konnten die Proben gemessen werden.

2.2.4.3.3. Elektrophoretische Verfahren

Die Elektrophorese ist eine wichtige molekularbiologische Methode und beschreibt die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Im Falle der Nukleinsäuren macht

sich dabei die negative Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrates nutzbar. Die Auftrennung erfolgt mit Hilfe eines festen Trägermaterials, wie einem porösen Agarose- oder SDS-Gel. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die Nukleinsäuren zur Anode. Durch die poröse Struktur der Gelmatrix werden die Teilchen in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich verzögert. Dies bedeutet, kleine Fragmente wandern schneller durch die Gelmatrix als große Fragmente. Nukleinsäure-Fragmente können so ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Bioanalyzer

Der Bioanalyzer ist ein auf Mikrofluidtechnik basierendes automatisiertes Lab-on-a-Chip Elektrophorese System. Zur Durchführung der Analyse werden die Mikrokanäle des Chips mit einem porösem Gel und einem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt. Anschließend werden die Proben in die Wells pipettiert. Über einen Spannungsgradienten wandern die Proben durch die Mikrokanäle und werden in den im Chip integrierten Trennkanal injiziert. Dort erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Komponenten nach ihrer Größe. Die Detektion der Fragmente erfolgt über den im Gel befindlichen Fluoreszenzfarbstoff. Dieser interkaliert mit den Nukleinsäuren und wird über einen Laser angeregt. Die Größe der einzelnen Fragmente wird über die Migrationszeit ermittelt. Die Berechnung der Fragmentgrößen erfolgt dabei mit Hilfe einer Leiter, die Fragmente bekannter Größen und Konzentrationen enthält und ebenfalls auf den Chip aufgetragen wird.

Bei der RNA Analyse wird neben den Fragmentgrößen und der Konzentration auch die ribosomale Relation berechnet. Dieses Verhältnis der 18S zu 28S ribosomalen Untereinheit nimmt mit fortschreitender RNA Degradierung ab. Mithilfe dieser ribosomalen Relation kann die sogenannte „RNA Integrity Number“ (RIN) ermittelt werden. Diese basiert auf einem Nummerierungssystem von 1 bis 10, wobei eine RIN von 1 für stark degradierte RNA steht und eine RIN von 10 für intakte RNA.

Zur Integritätsprüfung der RNA kam das Agilent RNA 6000 Nano Kit zum Einsatz. Der Farbstoff wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur äquilibriert, kurz gevortext und kurz herunterzentrifugiert. 1 µl des Farbstoffes wurde mit 65 µl Gel gemischt, kurz gevortext und für zehn Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert. Zum Befüllen der Mikrokanäle wurde der Chip in die Priming Station gelegt und 9 µl der Gel-Farbstoff-Mischung in das vorgesehene Well pipettiert. Die Priming Station wurde entsprechend der Anleitung eingestellt und die montierte Spritze auf ein 1 ml eingestellt. Die Station wurde geschlossen und die Spritze langsam heruntergedrückt, in der Halterung eingehakt und 30 Sekunden äquilibriert. Anschließend wurde der Clip gelöst und nach fünf Sekunden die Spritze wieder langsam auf 1 ml eingestellt. 9 µl Gel-Farbstoff-Mischung wurden in die mit G gekennzeichneten Felder gefüllt und 5 µl RNA Marker in die 12 Proben Wells, sowie in das Leiter-Well. Nun wurden 1 µl Leiter in das entsprechende Well pipettiert und die Probenwells mit 1 µl Probe befüllt. Der Chip wurde für

eine Minute bei 2.400 rpm auf dem Chip-Vortex geschüttelt und anschließend im Bioanalyzer vermessen. Die RIN-Werte der Monozyten RNA lagen alle bei 10, die RIN-Werte der Lungen RNA zwischen 8,7 und 10 und die RIN-Werte der Hoden RNA zwischen 8,1 und 9,6. Die isolierte RNA lag somit in der geforderten Qualität vor.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Integrität der genomischen Spermien DNA wurde mittels DNA-Agarosegelelektrophorese bestimmt.

Zur Durchführung wurden die in Abschnitt 2.1.3 aufgeführten Komponenten für das 0,7%ige Agarosegel gemischt und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf 55 °C wurde das Gel in den Gelschlitten gegossen und der Kamm für die Probestaschen eingesetzt. Nach Aushärten des Gels wurde der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer gesetzt, diese mit TAE-Puffer 1x befüllt und der Kamm entfernt. 30 µl Probe wurden mit 6 µl Ladepuffer 5x versetzt und in die Probestaschen pipettiert. Das Gel wurde für 45 Minuten bei 100 V laufen gelassen. Die Färbung des Gels erfolgte mit Sybr[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain (1:10.000 in TE-Puffer verdünnt) für 40 Minuten im Dunkeln. Die Auswertung erfolgte im Fusion FX. Die Gelbanden aller Proben lagen im oberen Markerbereich und indiziert somit, dass die vorliegende DNA intakt war.

2.2.5. Enzymgebundener Immunsorbent-Test (ELISA)

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein quantitatives immunologisches Nachweisverfahren für Biomoleküle. Die in dieser Arbeiten verwendeten TNF- α und IL-6 ELISA-Kits funktionieren nach dem Sandwich-Prinzip. Dabei ist eine Mikrotiterplatte mit dem gegen den Analyt gerichteten monoklonalen Antikörper beschichtet. Standard-, Probe- und Kontrolllösungen werden in die entsprechenden Wells pipettiert. Ist der Analyt enthalten, erfolgt eine Bindung an den Antikörper. Ungebundene Moleküle werden gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe eines an ein Enzym (meist HRP, Horseradishperoxidase) gekoppelten polyklonalen Antikörpers. Nach Entfernung der ungebundenen Moleküle erfolgt die Zugabe des Substrates. Dieses wird durch das Enzym umgesetzt. Es kommt zu einem Farbumschlag. Nach dem Abstoppen der enzymatischen Reaktion erfolgt die Messung an einem ELISA-Reader. Die gemessene Farbintensität ist proportional zu der gemessenen Analytkonzentration. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Dazu wurden zunächst die Standardreihen (TNF- α : 10,9 – 700 pg/ml; IL-6: 7,8 – 500 pg/ml) angesetzt. 50 µl Assay Diluent pro Well wurden in der Mikrotiterplatte vorgelegt, und 50 µl Standard, Probe oder Kontrolle dazu pipettiert. Danach wurde die Platte für eine Minute auf einem Plattenschüttler homogenisiert und anschließend für zwei Stunden im Dunkeln

inkubiert. Die Proben wurden fünfmal mit 400 ml Waschpuffer automatisiert im BioTek ELx50 gewaschen. Nach Zugabe von 100 ml Substrat-Lösung erfolgte eine weitere Inkubation von 30 Minuten im Dunkeln. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung abgebrochen und die Proben im BioTek Epoche 2 Mikroplatten Reader gemessen.

2.2.6. Seahorse

Die Analyse des Zellmetabolismus erfolgte mithilfe einer und dem Agilent Seahorse XF Extrazellulär Flux Analyzer. Das Gerät misst dabei in Echtzeit den Sauerstoffverbrauch OCR (*oxygen consumption rate*) [pmol/min] der Zellen, sowie den O₂-Verbrauch und die Ansäuerung (H⁺), woraus sich der ECAR (*extracellular acidification rate*) [mpH/min] berechnen lässt. Mit diesem Verfahren können somit Schlüsselparameter der mitochondrialen Atmung (OCR) und der glykolytischen Funktion (ECAR) gemessen werden.

In dieser Arbeit kam eine modifizierte Variante des Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kits zum Einsatz. Dieser Test nutzt verschiedene Modulatoren der Zellatmung, deren Zielstrukturen Komponenten der Elektronentransportkette darstellen. Die Modulatoren (Oligomycin, FCCP und Rotenone/Antimycin A (Rot/AA)) werden nacheinander injiziert und lassen so Rückschlüsse auf die mitochondriale Atmung ziehen (Abbildung 17A). Zur gleichzeitigen Ermittlung der glykolytischen Rate erfolgte entsprechend dem Agilent Seahorse Glycolytic Rate Assay eine zusätzliche Injektion von 2-Deoxyglucose (2-DG)(Abbildung 17B). Für den Seahorse-Lauf wurden am Tag vor dem Lauf die Seahorseplatten mit Cell-Tak beschichtet, um die Zelladhäsion zu verbessern und die Cartridge hydratisiert. In einem Doppelansatz wurden 150.000 Monozyten pro Well in 80 µl Seahorse-Medium auf die Platte pipettiert und eine Minute bei 300 x g ohne Bremse ab zentrifugiert. Danach wurde das Volumen mit Seahorse-Medium auf 175 µl aufgefüllt und die Platte für 30 Minuten bei 37 °C ohne CO₂ inkubiert.

Währenddessen wurden die Stimulanzen vorbereitet und jeweils 25 µl entsprechend in die Ports der Cartridge pipettiert und der Lauf gestartet. Die Injektionen der einzelnen Stoffwechselmodulatoren erfolgten wie in Tabelle 3 dargestellt.

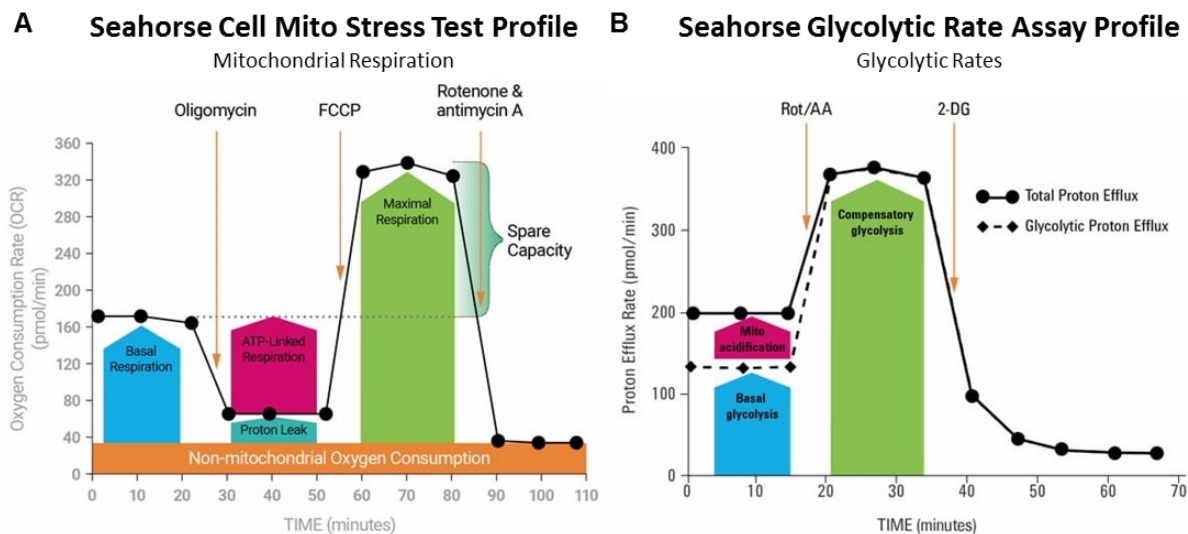


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Metabolismus Analyse mittels Seahorse-Technologie. Assayprofile und Messgrößen des A) Seahorse Mito Stress Test (Agilent, 2019a) und B) Seahorse Glycolytic Rate Assay (Agilent, 2019b).

Tabelle 3: Übersicht über die Injektionsabfolge und Konzentration der verwendeten Stoffwechselmodulatoren.

Port	Programm	Messungen	Modulator	Finale Konzentration (f.c.)
	Base	3x		
A	Injektion 1	3x	Oligomycin	1 μ M
B	Injektion 2	3x	FCCP	2 μ M
C	Injektion 3	3x	Rotenone/AA	0,5 μ M
D	Injektion 4	3x	2-Deoxyglucose	50 mM

Die Auswertung der Läufe erfolgte im Anschluss mit der Seahorse Wave Software auf Basis der von OCR und ECAR. Dabei gibt der OCR den Sauerstoffverbrauch der Zellen an und lässt so Rückschlüsse auf die mitochondriale Atmung bzw. die OXPHOS ziehen. Der ECAR spiegelt den Grad der Azidifizierung im Kulturüberstand wieder und ist ein Indikator für die Glykolyse. Aus diesem berechnet die Software die Protoneneffluxrate (PER), welche ein Indikator für die Anzahl der Protonen ist, die in den Kulturüberstand übergehen. Der glykolytische PER (glykoPER) gibt dabei den Protonenefflux an, der direkt aus der Glykolyse stammt und wird unter Abzug der CO₂-abhängigen Azidifizierung aus dem PER berechnet.

2.2.7. Bioinformatik

Die komplette bioinformatische Auswertung erfolgte durch Dominik Schaack.

2.2.7.1. RNA-Seq Datenanalyse

Die Paired-End RNA-Seq-Daten wurden mit FastQC (Andrews, 2010) einer Qualitätskontrolle unterzogen, mit SortMeRNA (Kopylova et al., 2012) gefiltert und Kontaminationen durch ribosomale RNA entfernt. Die Trimmung der verbliebenen Reads erfolgte mit Trimmomatic. Reads, deren Längen nach der Prozessierung unterhalb der Schwellenwerte von 32 bp für lagen, wurden für die weitere Analyse nicht berücksichtigt. Das Read-Mapping erfolgte mit der STAR Alignment Software (Dobin et al., 2013) unter Verwendung des im Rahmen des GENCODE-Projekts (<http://www.genencodegenes.org>) verfügbaren Referenzgenoms „M17 (GRCm38.p6)“. SAMtools (Li et al., 2009) wurde verwendet, um die resultierenden Sequenz-Alignment-Maps für die Downstream-Analyse in das sortierte binäre Alignment-Format (BAM) zu konvertieren. Das FeatureCounting erfolgte unter Verwendung von HTSeq-count (Anders et al., 2015) für alle Replikate gegen die entsprechenden GRCm38.p6-Gentransferdateien. Das Bioconductor-Paket DESeq2 (Love et al., 2014) wurde für die differentielle Expressionsanalyse der RNA-Seq-Daten verwendet. Die durch DESeq2 identifizierten, differentiell exprimierten Gene wurden auf Ergebnisse mit absoluten \log_2 -Fold-Change-Werten über 0,5 und Benjamini-Hochberg-korrigierten p-Werten unter 0,02 gefiltert. Für die nachfolgende differentielle Expressionsanalyse wurde GFOLD (Feng et al., 2012) verwendet. Es wurden nur Gene differentiell exprimiert angenommen, deren absolute GFOLD-Werte über 1,5 lagen. Überrepräsentierte GO-Terms wurden sowohl für hoch- als auch für herunterregulierte Gene getrennt identifiziert. Die GO-Term-Analyse erfolgte mit dem Genomatrix Genome Analyzer (<https://www.genomatrix.de/solutions/genomatrix-genome-analyzer.html>).

Zur Generierung der Heatmap (Abbildung 32) wurden library-sized Count-Daten der gefilterten differentiell exprimierten Gene ausgewählt. Die normalisierten Counts pro Gen wurden auf Z-Scores standardisiert. Die Gruppierung erfolgte auf der Grundlage der hierarchischen agglomerativen Clustering-Methode von Ward2 (Euklidisches Abstandsmaß; Ward2-Kriterium).

Die Hauptkomponentenanalysen wurden auf Basis der \log -transformierten Library-size-normalisierten Count-Daten für differentiell exprimierte Gene durchgeführt.

2.2.7.2. RRBS Datenanalyse

Die Qualitätskontrolle der RRBS-Daten, sowie das Trimmung der Adapter wurde mit der "Trim Galore!" Software im RRBS-Modus durchgeführt. Dabei wurde der voreingestellte Phred-

Score von 20 als Grenzwert für die Qualität verwendet. Für das Trimming wurde der erforderliche Überlappungsbereich mit der Adaptersequenz (Stringenz) auf einen Wert von "1" gesetzt, während die maximale Fehlerrate auf "0,1" festgelegt wurde. Die minimale Leselänge wurde mit 15 bp definiert. Die Qualitätskontrolle der Daten wurde mit der Software "FastQC" durchgeführt. Die Single-End-Sequenzen wurden unter Verwendung von "Bismark" (Krueger and Andrews, 2011) auf ein Bisulfit-konvertiertes Mausgenom (mm10) gemapped und unter Verwendung des "Bowtie2" Short Read Aligners (Langmead and Salzberg, 2012) kartiert. Die Berechnung der DNA-Methylierungsniveaus und die Methylierungs-Calls pro Base erfolgten anschließend ebenfalls mit "Bismark". Die weitere Downstream-Verarbeitung und Visualisierung wurden mit R/Bioconductor unter Verwendung der Pakete "methylKit", "GenomicFeatures", "Annotatr", "ggfortify", "NMF" und "ggbio" (Akalin et al., 2012, Lawrence et al., 2013, Cavalcante and Sartor, 2017, Gaujoux and Seoighe, 2010, Yin et al., 2012) durchgeführt. Für die Differentialstatistik betrug der minimale Methylierungsunterschied 25 % mit einem q-Wert von $\leq 0,01$. Die Annotation von differentiell methylierten CpGs basiert auf „mm10 refGene“ und der CpG-Insel-Annotation von UCSC (Rosenbloom et al., 2015). GO-Term-Analysen wurden mit GeneRanker (Gonzalez et al., 2008) durchgeführt, dass auf einem Genomatix Genome Analyzer (Genomatix, München, Deutschland) ausgeführt wurde. Die Abbildungen wurden mit den R/Bioconductor-Paketten "NMF" (Gaujoux and Seoighe, 2010), "ggbio" (Lawrence et al., 2013) und "methylKit" (Akalin et al., 2012) erstellt.

2.2.8. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Graphpad Prism. Um die statistischen Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu evaluieren kamen verschiedene Testverfahren in Abhängigkeit von der Verteilung und der Stichprobengröße. Für ungepaarte Proben mit Normalverteilung oder $n > 30$ wurde der zweiseitige Student-t-Test eingesetzt und für ungepaarte Proben ohne Normalverteilung und $n \leq 30$ der Mann-Whitney-U-Test (zweiseitig). Zur Berechnung der statistischen Unterschiede der Überlebenszeit wurde der Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test angewandt, um frühe Ereignisse stärker zu berücksichtigen. Soweit nicht anders vermerkt, werden die Balkendiagramme als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes repräsentiert. Die Überlebensraten sind als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Induktion einer Sepsis im Mausmodell

Um die langfristigen Auswirkungen einer Sepsis im Tiermodell untersuchen zu können, ist ein adäquates Sepsis-Modell erforderlich. Zur Initiierung einer abdominalen polymikrobiellen Sepsis in den verschiedenen Versuchsgruppen wurden männliche C57BL/6J Mäuse einer CLP- oder Sham-Operation unterzogen. Wichtig war hierbei die Induktion einer milden Sepsis, mit einer erwarteten Sterblichkeit von 30 – 40 %. Die Operationen erfolgten gruppenweise in Abhängigkeit des Euthanasie-Zeitpunktes (sechs Wochen und zwölf Wochen post-CLP) oder zu Zuchtzwecken (Väter).

Tabelle 4: Übersicht über operierte und überlebende CLP- und Sham Tiere.

Gruppe	Geschlecht	Prozedur	n _{OP}	n _{Überlebende}	Überleben [%]
6 Wochen	Männlich	CLP	15	9	60
6 Wochen	Männlich	Sham	9	7*	100*
12 Wochen	Männlich	CLP	15	10	67
12 Wochen	Männlich	Sham	9	9	100
Väter	Männlich	CLP	20	11	55
Väter	Männlich	Sham	10	10	100

* Zwei Tiere verstarben direkt nach Narkosegabe und erhielten daher keine CLP. Diese Tiere wurden in der Bewertung exkludiert und das Überleben der post-CLP Tiere somit mit 100 % bewertet.

Die Sterblichkeit der CLP-operierten 6-Wochen-Tiere lag dabei bei 40 % (6/15 Tieren), die der 12-Wochen-Tiere bei 33 % (5/15Tiere) und die der Vatertiere bei 45 % (9/20 Tieren) (Abbildung 18A). Die Sterblichkeit der Sham-operierten Tiere aller Gruppen lag bei 0 % (Abbildung 18A). Eine Ausnahme bilden hier jedoch die Sham-Tiere der 6-Wochen-Gruppe. Bei dieser Kohorte verstarben zwei Tiere kurz nach der OP aufgrund Probleme bei der Verabreichung der Narkose. Da diese Tode nicht durch die induzierte Sepsis verursacht wurden, erhielten sie keine Berücksichtigung bei der Ermittlung der Sterberate. Eine Übersicht über die Anzahl der operierten Tiere und die Anzahl der Tiere, die sieben Tage nach der schweren Infektion noch lebten, ist in Tabelle 4 aufgeführt.

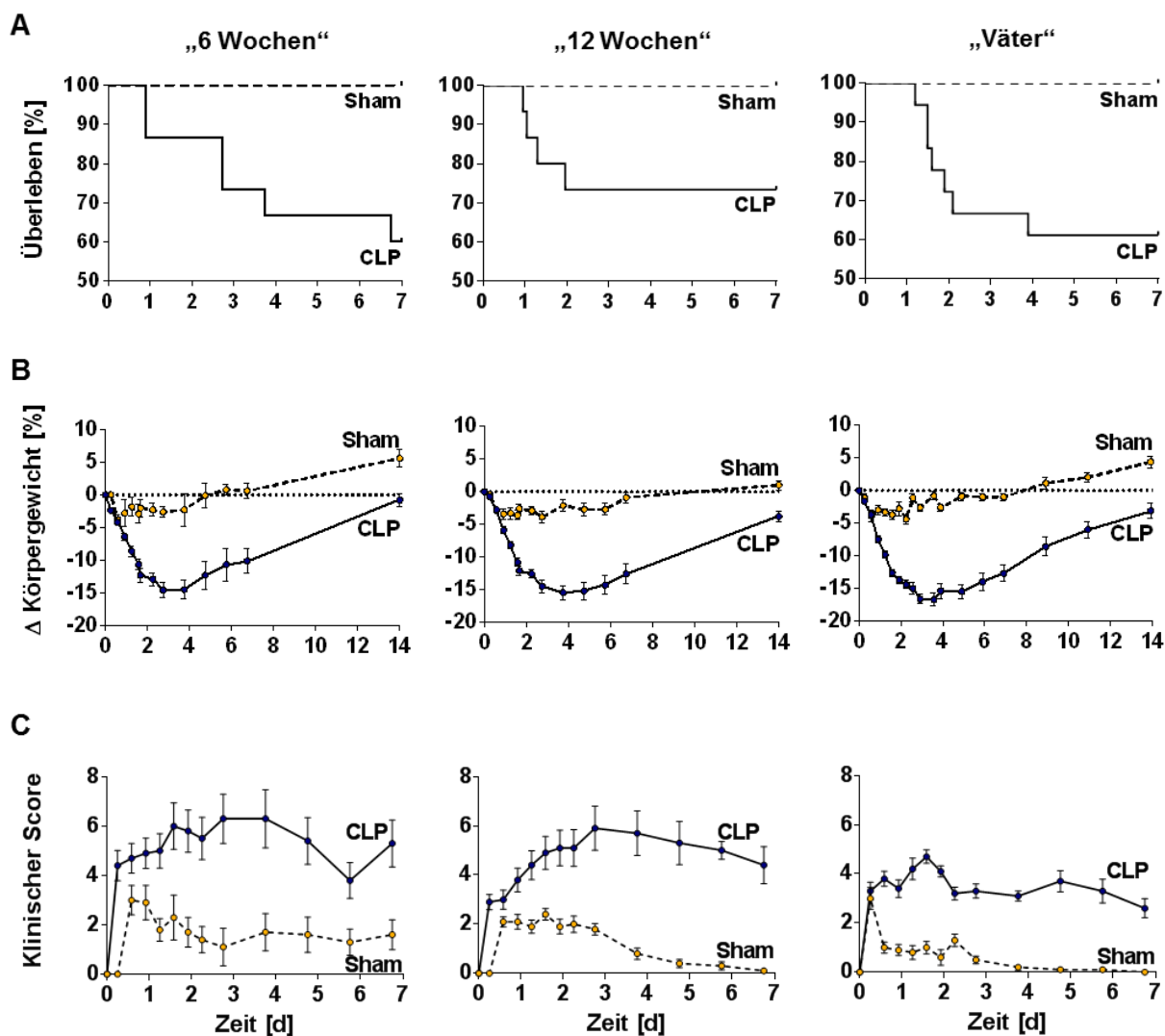


Abbildung 18: Postoperative Überwachung der CLP und Sham Tiere. A) Überleben, B) Körpergewicht und C) Klinischer Score der 6-Wochen-Tiere ($n_{\text{Sham}} = 7$, $n_{\text{CLP}} = 15$), der 12-Wochen-Tiere ($n_{\text{Sham}} = 9$, $n_{\text{CLP}} = 15$) und der Vatertiere ($n_{\text{Sham}} = 10$, $n_{\text{CLP}} = 20$).

Die Tiere wurden sieben Tage lang zu mehreren Zeitpunkten gewogen und beurteilt, um den Verlauf der induzierten Sepsis zu beobachten. Die CLP-Tiere aller drei Gruppen zeigen einen deutlichen Gewichtsverlust gegenüber den Sham-Tieren (Abbildung 18B). Dabei kann der größte Gewichtsverlust von etwa -15 % bei den CLP-Tieren an Tag 3 post-OP beobachtet werden. Analog dazu sind bei den CLP-Tieren bis zu Tag 3 eine deutliche Zunahme klinischer Symptome erkennbar, dargestellt anhand des klinischen Scores (Abbildung 18C). Im weiteren Verlauf lässt sich ab Tag 4 eine kontinuierliche Gewichtszunahme bei den CLP-Tieren mit einem gleichzeitigen Rückgang der Symptomatik bis Tag 7 beobachten. An Tag 14 erreichen die CLP-Tiere wieder ihr Ausgangsgewicht und sind somit klinisch wieder vollständig regeneriert.

Die Sham-Tiere zeigen im Vergleich sowohl einen geringeren Gewichtsverlust (bis zu -5 %) als auch einen niedrigeren klinischen Score im Verlauf. Die Rückkehr zum Ausgangsgewicht erfolgt zwischen Tag 5 und Tag 7.

Zusammengefasst zeigen diese Daten die erfolgreiche Induktion einer abdominalen polymikrobiellen Sepsis, einhergehend mit den für eine Sepsis typischen klinischen Verlauf.

3.2. Immunologische Spätfolgen einer überstandenen Sepsis

Zur Untersuchung der immunologischen Spätfolgen einer Sepsis wurden die überlebenden Tiere sechs und zwölf Wochen nach einer induzierten polymikrobiellen Sepsis analysiert.

3.2.1. Einfluss einer Sepsis auf die Milz

Zunächst sollte ein Überblick über den Immunstatus der Sepsis-Überlebenden geschaffen werden. Dazu wurden die Milzen als sekundäres Lymphorgan, von Tieren sechs und zwölf Wochen post-CLP gewogen und anschließend die Immunzellpopulationen durchflusszytometrisch analysiert.

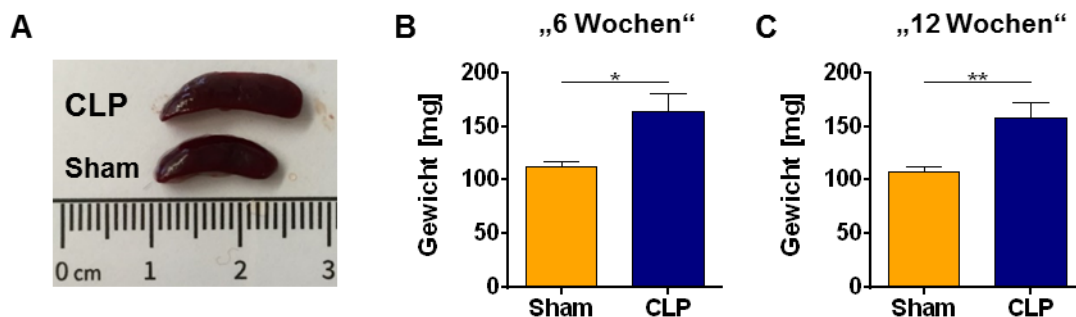


Abbildung 19: Splenomegalie von Sepsis-Überlebenden. Die Milzen wurden sechs und zwölf Wochen post-CLP entnommen und gewogen. A) Repräsentative Milzen von CLP und Sham Tieren. Milzgewicht von Sham (orange) und CLP (blau) Mäusen B) sechs Wochen ($n_{\text{Sham}} = 7$, $n_{\text{CLP}} = 9$) und C) zwölf Wochen ($n = 9$ pro Kondition) post-operativ. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Bereits bei der Entnahme der Milzen beider Gruppen ist ein deutlicher Größenunterschied zwischen CLP- und Sham-Tiere (Abbildung 19A) auffällig. Diese Beobachtung spiegelt sich in den Gewichten der Organe wider. Sowohl sechs Wochen (Sham: 112,1 mg \pm 5,3 mg; CLP: 163,9 mg \pm 17,1 mg; $p = 0,0217$), als auch zwölf Wochen (Sham: 108,1 mg \pm 4,1 mg; CLP: 158,3 mg \pm 13,7 mg; $p = 0,0035$) nach einer Sepsis sind die Milzen der CLP-Tiere signifikant schwerer (Abbildung 19B+C).

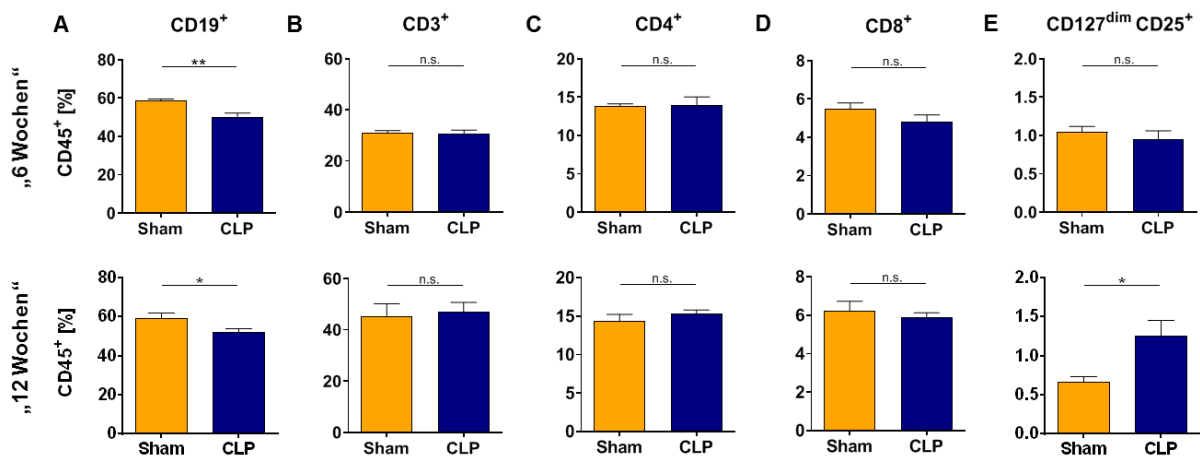


Abbildung 20: Frequenzen lymphoider Immunzellen der Milz. A) B-Zellen, B) T-Zellen, C) T-Helferzellen, D) zytotoxische T-Zellen, und E) regulatorische T-Zellen von Sham (orange) und CLP (blau) sechs Wochen ($n_{\text{Sham}} = 7$, $n_{\text{CLP}} = 9$) und zwölf Wochen ($n = 8$ pro Kondition) post-operativ. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Die FACS-Analyse der Populationsverteilung von lymphoiden Immunzellen (Abbildung 20) zeigt eine signifikante Reduzierung von B-Zellen ($\text{CD45}^+ \text{CD19}^+$). Diese Abnahme der B-Zellen ist sowohl sechs Wochen (Sham: $58,8 \% \pm 0,7 \%$; CLP: $50,3 \% \pm 1,9 \%$; $p = 0,0022$), als auch zwölf Wochen (Sham: $59,5 \% \pm 2,4 \%$; CLP: $52,0 \% \pm 2,2 \%$; $p = 0,0393$) nach dem septischen Insult nachweisbar (Abbildung 20A). Die Frequenzen der T-Zellen ($\text{CD45}^+ \text{CD3}^+$) sind in beiden Gruppen unverändert (6 Wochen: Sham: $30,9 \% \pm 1,0 \%$; CLP: $30,6 \% \pm 1,5 \%$; $p = 0,8753$; 12 Wochen: Sham: $46,5 \% \pm 4,5 \%$; CLP: $47,7 \% \pm 3,1 \%$; $p = 0,7503$) (Abbildung 20B). Ebenso zeigen die Populationen der T-Helfer-Zellen ($\text{CD45}^+ \text{CD3}^+ \text{CD4}^+$) (6 Wochen: Sham: $13,8 \% \pm 0,3 \%$; CLP: $14,0 \% \pm 1,0 \%$; $p = 0,8755$; 12 Wochen: Sham: $14,4 \% \pm 0,8 \%$; CLP: $15,3 \% \pm 0,5 \%$; $p = 0,3268$) (Abbildung 20C), sowie der zytotoxischen T-Zellen ($\text{CD45}^+ \text{CD3}^+ \text{CD8}^+$) (6 Wochen: Sham: $5,5 \% \pm 0,3 \%$; CLP: $4,8 \% \pm 0,3 \%$; $p = 0,1969$; 12 Wochen: Sham: $6,2 \% \pm 0,5 \%$; CLP: $5,9 \% \pm 0,2 \%$; $p = 0,5272$) (Abbildung 20D) keine Unterschiede zwischen den Konditionen. Im Vergleich dazu kann ein signifikanter Anstieg von regulatorischen T-Zellen ($\text{CD3}^+ \text{CD4}^+ \text{CD127}^{\text{dim}} \text{CD25}^+$) zwölf Wochen (Sham: $0,7 \% \pm 0,1 \%$; CLP: $1,3 \% \pm 0,2 \%$; $p = 0,0144$) post-OP in den CLP-Tieren verzeichnet werden, wohingegen sechs Wochen post-CLP noch kein Unterschied erkennbar ist (6 Wochen: Sham: $1,1 \% \pm 0,1 \%$; CLP: $1,0 \% \pm 0,1 \%$; $p = 0,4944$) (Abbildung 20E).

Für die Untersuchung von myeloider Zellpopulationen kam es zu einem Vergleich der Zellzahlen von Monozyten ($\text{CD45}^+ \text{CD11b}^+ \text{F4/80}^-$), Makrophagen ($\text{CD45}^+ \text{CD11b}^+ \text{F4/80}^+$) (Abbildung 21) und dendritischen Zellen ($\text{CD45}^+ \text{CD11c}^+$) (Abbildung 22). Dabei wurden ebenfalls die Frequenzen von inflammatorischen (Ly6C^+) und alternativen (Ly6C^-) Subpopulationen der Monozyten und Makrophagen analysiert (Abbildung 21).

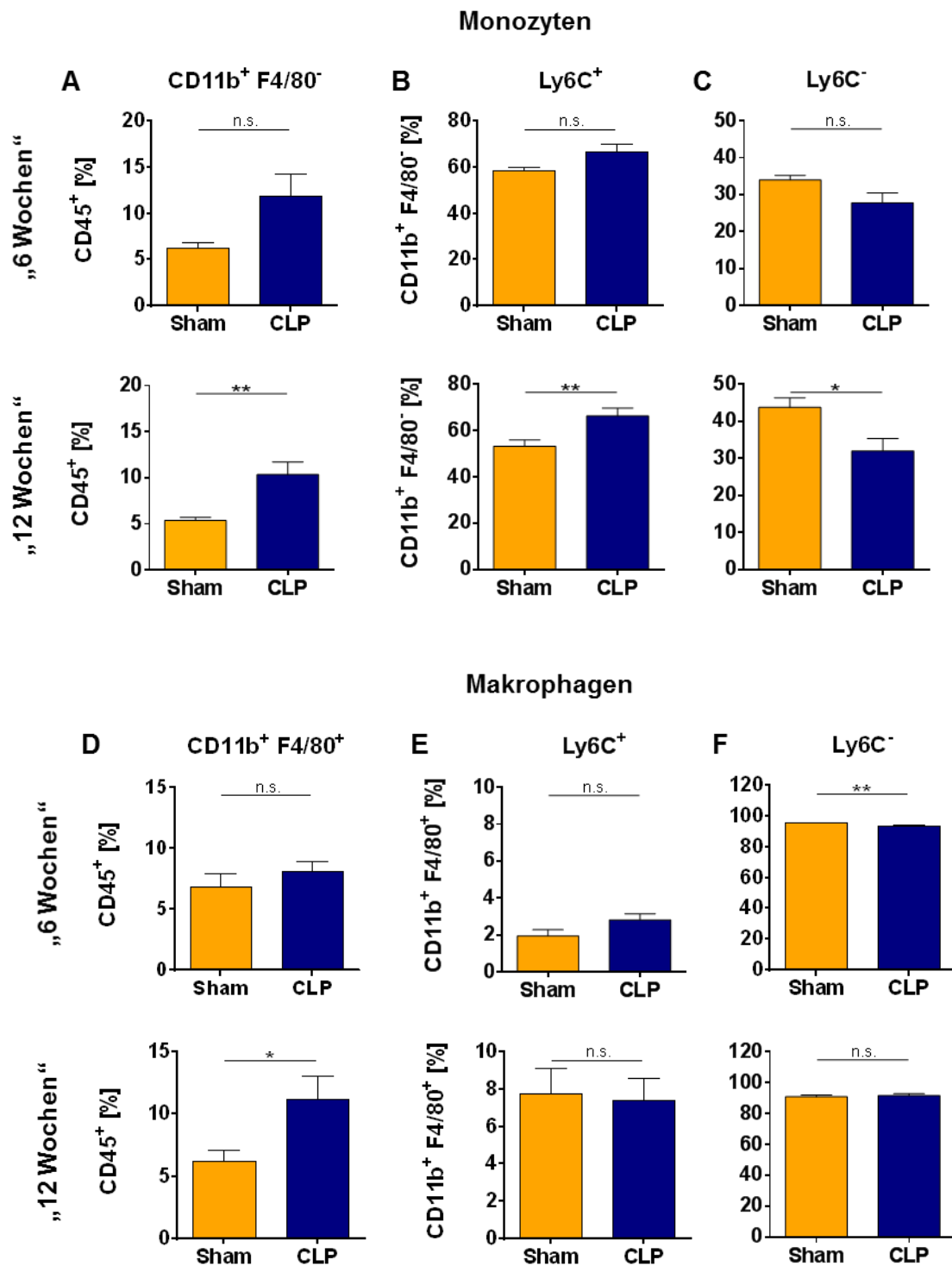


Abbildung 21: Monozyten- und Makrophagen-Populationen der Milz. A) Totale, B) inflammatorische und C) alternative Monozyten und D) totale, E) inflammatorische und F) alternative Makrophagen von Sham (orange) und CLP (blau) sechs Wochen ($n_{\text{Sham}} = 7$, $n_{\text{CLP}} = 9$) und zwölf Wochen ($n = 8$ pro Kondition) post-operativ. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Die Populationen der totalen Monozyten (Sham: 6,3 % \pm 0,6 %; CLP: 11,9 % \pm 2,4 %; $p = 0,0642$) (Abbildung 21A), der inflammatorischen Monozyten (Sham: 58,5 % \pm 1,6 %; CLP: 66,8 % \pm 3,4 %; $p = 0,0634$) (Abbildung 21B), sowie der alternativen Monozyten (Sham: 34,0 % \pm 1,2 %; CLP: 27,8 % \pm 2,7 %; $p = 0,0772$) (Abbildung 21C) der Milz sind sechs Wochen post-CLP nicht signifikant verändert, zeigen aber Tendenzen. Diese Tendenzen werden über den weiteren Zeitverlauf nach zwölf Wochen signifikant. Die Frequenz der totalen Monozyten ist dabei erhöht (Sham: 5,4 % \pm 0,3 %; CLP: 10,3 % \pm 1,4 %; $p = 0,0033$) (Abbildung 21A). Ebenso weisen die inflammatorischen Monozyten innerhalb der totalen Monozyten einen Anstieg der Zellzahl auf (Sham: 53,2 % \pm 2,8 %; CLP: 66,38 % \pm 1,923 %; $p = 0,0082$) (Abbildung 21B). Die alternativen Monozyten sind reduziert (Sham: 43,8 % \pm 2,5 %; CLP: 32,0 % \pm 3,3 %; $p = 0,0142$) (Abbildung 21C).

Die Anzahl der totalen Makrophagen ist analog der Monozyten nach sechs Wochen unverändert (Sham: 6,8 % \pm 1,1 %; CLP: 8,1 % \pm 1,9 %; $p = 0,3427$) und nach zwölf Wochen (Sham: 6,2 % \pm 0,9 %; CLP: 11,2 % \pm 1,9 %; $p = 0,0306$) signifikant erhöht (Abbildung 21D). Die Subpopulation der inflammatorischen Makrophagen ist in beiden Gruppen unverändert (6 Wochen: Sham: 2,0 % \pm 0,3 %; CLP: 2,8 % \pm 0,3 %; $p = 0,0943$; 12 Wochen: Sham: 7,8 % \pm 1,3 %; CLP: 7,4 % \pm 1,2 %; $p = 0,8322$) (Abbildung 21E). Bei der Gruppe der alternativen Makrophagen verhält es sich kontrovers der Monozyten. Nach sechs Wochen zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Zellpopulation (Sham: 95,7 % \pm 0,4 %; CLP: 94,0 % \pm 0,4 %; $p = 0,0088$), der sich nach zwölf Wochen wieder revidiert (Sham: 90,9 % \pm 1,1 %; CLP: 91,7 % \pm 1,6 %; $p = 0,6180$) (Abbildung 21F).

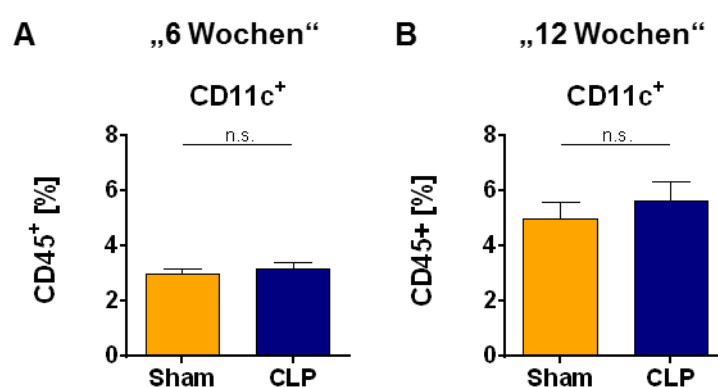


Abbildung 22: Dendritische Zellen der Milz A) Sechs Wochen ($n_{\text{Sham}} = 7$, $n_{\text{CLP}} = 9$) und B) zwölf Wochen ($n = 8$ pro Kondition) nach Sham (orange) oder CLP (blau) Prozedur. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

Die Frequenzen der dendritischen Zellen (CD45⁺ CD11c⁺) sind in beiden Gruppen unverändert (6 Wochen: Sham: 3,0 % ± 0,2 %; CLP: 3,2 % ± 0,2 %; $p = 0,5691$; 12 Wochen: Sham: 5,0 % ± 0,6 %; CLP: 5,6 % ± 0,6 %; $p = 0,4949$) (Abbildung 22).

Zusammenfassend indizieren diese Ergebnisse persistierende Veränderungen von Immunzellpopulationen in der Milz nach einer durchlebten Sepsis, die zwölf Wochen post-CLP fulminanter ausgeprägt sind.

3.2.2. Einfluss einer Sepsis auf die systemische Immunantwort

Zur Aufklärung der Frage, ob die beobachteten Veränderungen der Immunzellpopulationen auch systemisch in der Blutzirkulation nachweisbar sind, erfolgte die durchflusszytometrische Analyse des Vollbluts zwölf Wochen nach Sepsis. Der Fokus lag dabei auf den regulatorischen T-Zellen und den Monozyten.

Die regulatorischen T-Zellen des Vollblutes sind nach CLP tendenziell erhöht (Sham: 1,5 % ± 0,2 %; CLP: 2,0 % ± 0,4 %; $p = 0,2099$), weisen jedoch keine Signifikanz auf (Abbildung 23). Ähnlich verhält es sich bei den Monozyten. Sowohl totale Monozyten (Sham: 19,9 % ± 4,2 %; CLP: 23,5 % ± 4,5 %; $p = 0,5615$) (Abbildung 24A), als auch die inflammatorischen (Sham: 81,0 % ± 4,4 %; CLP: 71,3 % ± 6,8 %; $p = 0,2539$) (Abbildung 24B) und alternativen (Sham: 8,8 % ± 4,4 %; CLP: 28,2 % ± 7,0 %; $p = 0,2706$) (Abbildung 24C) Subpopulationen zeigen keine signifikanten Änderungen der Zellzahlen.

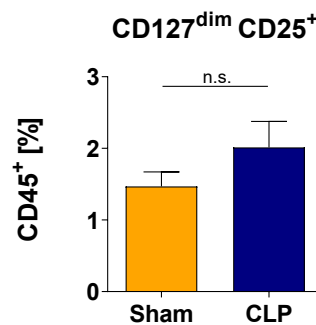


Abbildung 23: Regulatorische T-Zellen im stimulierten Vollblut von Sham (orange) und CLP (blau) Tieren zwölf Wochen ($n = 8$ pro Kondition) post-operativ. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM.

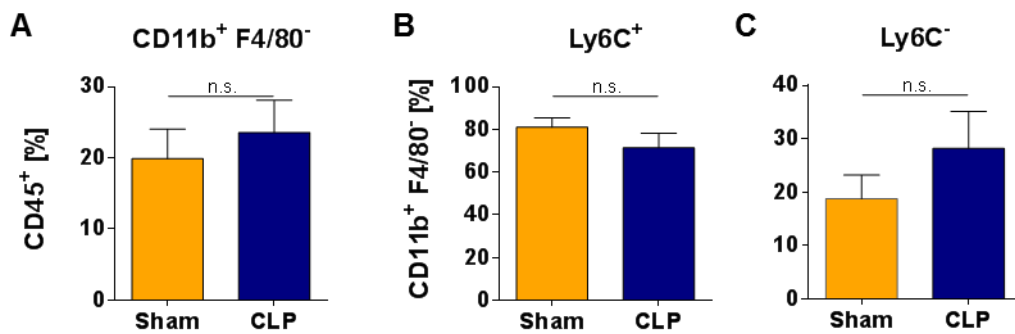


Abbildung 24: Monozyten im stimulierten Vollblut. A) Totale, B) inflammatorische und C) alternative Monozyten von Sham (orange) und CLP (blau) Tieren zwölf Wochen ($n = 8$ pro Kondition) post-operativ. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

Um die Funktionalität der Immunzellen im Blut zu testen, wurden die Zellen des Vollblutes mit LPS, einem Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien, stimuliert. Die Konzentrationsbestimmung der beiden proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6 im Überstand erfolgte 24 Stunden nach Zugabe des Stimulus mittels ELISA (Abbildung 25).

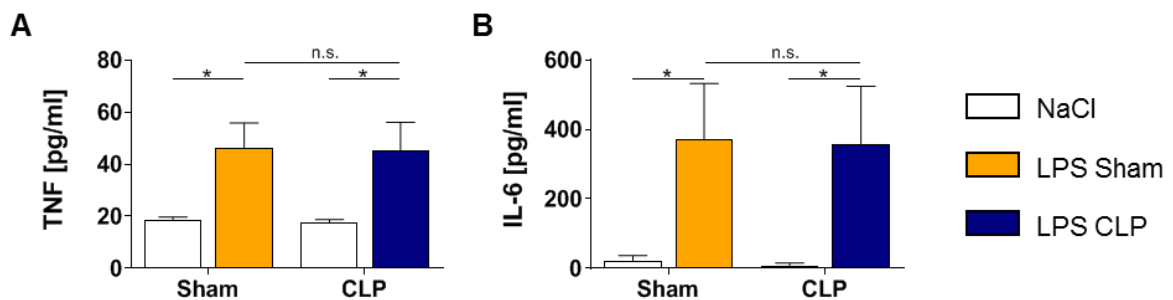


Abbildung 25: Expression proinflammatorischer Zytokine im stimulierten Vollblut. Heparinisiertes Vollblut von zwölf Wochen Tieren wurde für 24 Stunden mit LPS oder NaCl stimuliert und die Konzentrationen von TNF und IL-6 im Überstand mittels ELISA gemessen. A) TNF-Konzentrationen von Sham- und CLP-Tieren. B) IL-6 Konzentrationen von Kontroll- und postseptischen Tieren. Weiße Balken repräsentieren die Zytokin-Konzentrationen nach NaCl, orangene (Sham) oder blaue (CLP) Balken die Zytokinexpression nach LPS. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. $n = 5$ pro Kondition. *: $p < 0,05$.

Sowohl die TNF- (Abbildung 25A) als auch die IL-6 Konzentration (Abbildung 25B) ist wie erwartet nach LPS Stimulation in Sham- (TNF: NaCl ($18,5 \pm 1,23$) pg/ml; LPS ($46,2 \pm 9,7$) pg/ml; $p = 0,0215$; IL-6: NaCl ($20,0 \pm 16,7$) pg/ml; LPS ($372,3 \pm 160,3$) pg/ml; $p = 0,0303$) und CLP-Mäusen (TNF: NaCl ($17,4 \pm 1,4$) pg/ml; LPS ($45,3 \pm 10,8$) pg/ml; $p = 0,0329$; IL-6: NaCl ($8,5 \pm 7,4$) pg/ml; LPS ($358,9 \pm 165,3$) pg/ml; $p = 0,0370$) im Vergleich zu den NaCl-

Kontrollen deutlich erhöht. Ein Unterschied in der Zytokinausschüttung zwischen postseptischen Tieren und Kontrolltieren (TNF: Sham ($46,2 \pm 9,7$) pg/ml; CLP ($45,3 \pm 10,8$) pg/ml; $p = 0,9535$; IL-6: Sham ($372,3 \pm 160,3$) pg/ml; CLP ($358,9 \pm 165,3$) pg/ml; $p = 0,9551$) konnte dabei nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse implizieren, dass eine Sepsis keine langfristigen Auswirkungen auf die Funktionsfähigkeit der Leukozyten im Vollblut hat.

3.2.3. Einfluss einer Sepsis auf die Hämatopoese

Das Knochenmark stellt eine wichtige Nische für blutbildenden Zellen dar. Während der Homöostase findet dort eine ständige Erneuerung von zirkulierenden Immunzellen mittels Hämatopoese statt. Aber auch die Neubildung von Immunzellen für die Rekrutierung der Zellen zum Gewebe z.B. während einer Infektion erfolgt dort. Aufgrund der Beobachtung der persistierenden veränderten Frequenzen der Zellpopulationen der Milz ergab sich die Frage, ob sich solche Veränderungen bereits eine Ebene tiefer, bei der Hämatopoese, manifestiert haben.

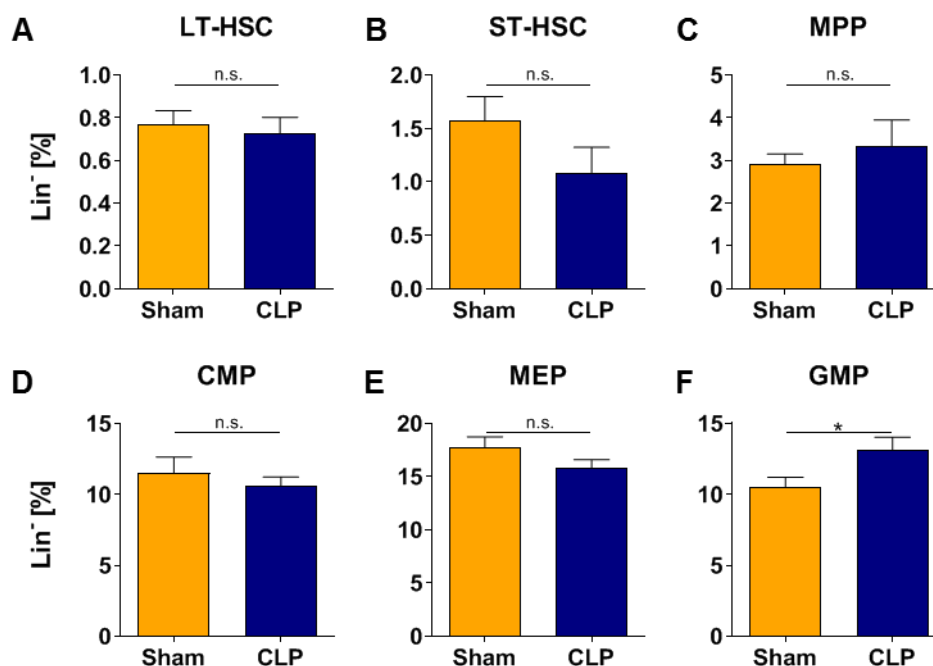


Abbildung 26: Analyse der Knochenmarksnische. Die Messung der HSPC-Verteilung im Knochenmark erfolgte durchflusszytometrisch zwölf Wochen post-OP. Frequenzen von A) LT-HSC B) ST-HSC, C) MPP, D) CMP, E) MEP und F) GMP von Sham- (orangener Balken) und CLP- (blauer Balken) Tieren. $n = 9$ pro Kondition. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$.

Zu diesem Zweck erfolgte eine durchflusszytometrische Untersuchung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (hematopoietic stem and progenitor cells, HSPC). Analysiert wurden die Frequenzen von LT-HSC (Lin⁻ LSK CD48⁻ CD150⁺), ST-HSC (Lin⁻ LSK CD48⁻ CD150⁻), MPP (Lin⁻ LSK CD48⁺ CD150⁻), CMP (Lin⁻ LS⁻K CD16/32^{int} CD34⁺), MEP (Lin⁻ LS⁻K CD16/32⁻ CD34⁻) und GMP (Lin⁻ LS⁻K CD16/32⁺ CD34⁺) (Abbildung 26).

Zwölf Wochen nach einer überstandenen Sepsis gibt es keine Veränderung in der Frequenz der selbsterneuernden LT-HSC (Sham: 0,8 % ± 0,1 %; CLP: 0,7 % ± 0,1 %; $p = 0,6838$) (Abbildung 26A). In der Population der ST-HSC (Sham: 1,6 % ± 0,2 %; CLP: 1,1 % ± 0,21 %; $p = 0,1624$) zeigt sich hingegen eine tendenzielle Reduzierung der Zellzahl in den CLP-Tieren (Abbildung 26B). Die Frequenzen der MPPs (Sham: 2,9 % ± 0,2 %; CLP: 3,3 % ± 0,6 %; $p = 0,5177$) sind in den Sepsis-Überlebenden marginal erhöht (Abbildung 26C). Die Populationen der CMP (Sham: 11,5 % ± 1,1 %; CLP: 10,6 % ± 0,6 %; $p = 0,5068$) (Abbildung 26D) und MEP (Sham: 17,8 % ± 1,0 %; CLP: 15,8 % ± 0,8 %; $p = 0,1331$) (Abbildung 26E) sind gering erniedrigt. Im Gegensatz dazu weist die Vorläuferpopulation der Granulozyten und Monozyten (GMPs) eine signifikant erhöhte Frequenz in den CLP Tieren auf (Sham: 10,5 % ± 0,7 %; CLP: 13,2 % ± 0,9 %; $p = 0,0311$) (Abbildung 26F). Dies impliziert eine Verschiebung der Hämatopoese in Richtung Myelopoese.

3.2.4. Einfluss einer Sepsis auf die Funktionalität naiver Knochenmarkmonozyten

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob nicht nur eine erhöhte Bildung von Monozyten, sondern auch deren Funktion durch eine Sepsis langfristig beeinflusst wird. Dafür wurden die Monozyten aus dem Knochenmark isoliert und *in vitro* mit LPS als einen zweiten Stimulus konfrontiert. Die Kontrollen wurden äquivalent mit NaCl behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zytokinkonzentrationen von TNF und IL-6 mittels ELISA in den Überständen gemessen (Abbildung 27).

Nach LPS-Stimulation zeigt sich eine fulminante Aktivierung der Monozyten beider Gruppen, durch eine signifikant gesteigerte Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF (Abbildung 27A) und IL-6 (Abbildung 27B). Dabei erhöht sich die TNF-Konzentration in den Sham-Tieren von einer basalen Ausschüttung von (11,6 ± 0,6) pg/ml auf eine Konzentration von (132,0 ± 4,4) pg/ml ($p < 0,0001$) nach LPS-Stimulus und bei den Sepsis-Überlebenden von (12,6 ± 0,8) pg/ml auf (168,0 ± 9,8) pg/ml ($p < 0,0001$). Die IL-6 Konzentration steigt bei den Kontrolltieren von (0,0 ± 0,0) pg/ml auf (254,7 ± 11,0) pg/ml ($p < 0,0001$) und bei den CLP-Tieren auf (327,8 ± 25,0) pg/ml ($p < 0,0001$).

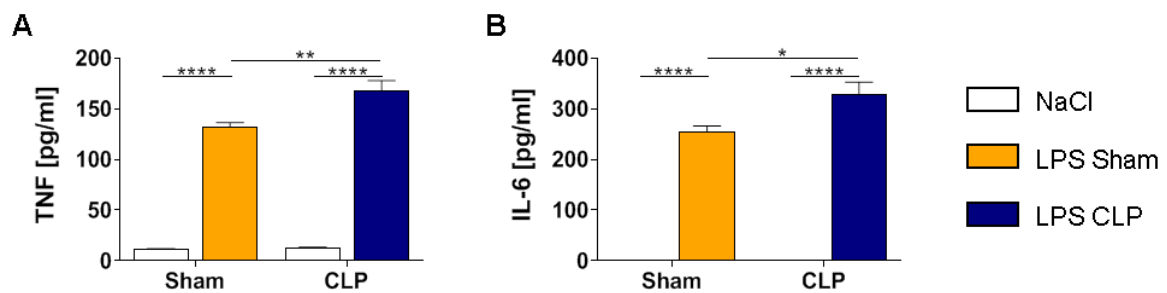


Abbildung 27: Proinflammatorische Zytokinantwort von naiven Monozyten des Knochenmarks.

A) TNF und B) IL-6 Konzentrationen in den Überständen von Sham und CLP 24 Stunden nach Stimulation mit NaCl (weißer Balken) oder LPS (orange bzw. blauer Balken) zwölf Wochen postoperativ. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ****: $p < 0,0001$. $n = 9$ pro Kondition.

Im direkten Vergleich der Zytokinausschüttung nach LPS von Sham- und CLP-Tieren zeigt sich sowohl eine signifikant stärkere Sekretion von TNF (Sham: $(132,0 \pm 4,4)$ pg/ml; CLP: $(168,0 \pm 9,8)$ pg/ml; $p = 0,0040$) (Abbildung 27A), als auch von IL-6 (Sham: $(254,7 \pm 11,0)$ pg/ml; CLP: $(327,8 \pm 25,1)$ pg/ml; $p = 0,0167$) (Abbildung 27B) im Überstand von Monozyten der Sepsis-Überlebenden. Dieses Phänomen einer verstärkten Immunantwort auf einen zweiten Stimulus ist ein typisches Merkmal der trainierten Immunität.

3.2.5. Einfluss einer Sepsis auf den Zellmetabolismus naiver Knochenmarkmonozyten

Ein weiteres Merkmal der trainierten Immunität ist der Warburg-Effekt. Dieser beschreibt die Verschiebung des Zellmetabolismus von der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) zur aeroben Glykolyse. Um zu bestätigen, dass Monozyten von Sepsis-Überlebenden tatsächlich einen Phänotyp der Trainierten Immunität aufweisen, wurden sowohl die mitochondriale als auch die glykolytische Aktivität der Zellen mittels Seahorse-Technologie gemessen.

Der basale Sauerstoffverbrauch (OCR) (Abbildung 28A) ist in den Sepsis-Überlebenden im Vergleich zu den Sham-Tieren nicht verändert (Sham: $(45,1 \pm 3,7)$ pmol/min; CLP: $(48,9 \pm 4,4)$ pmol/min; $p = 0,5102$) (Abbildung 29A). Der ATP-Umsatz repräsentiert den Sauerstoffverbrauch durch die OXPHOS und zeigt keine Differenz der Sepsis-Tiere zur Kontrollgruppe (Sham: $(36,3 \pm 3,0)$ pmol/min; CLP: $(39,7 \pm 4,0)$ pmol/min; $p = 0,4967$) (Abbildung 29B).

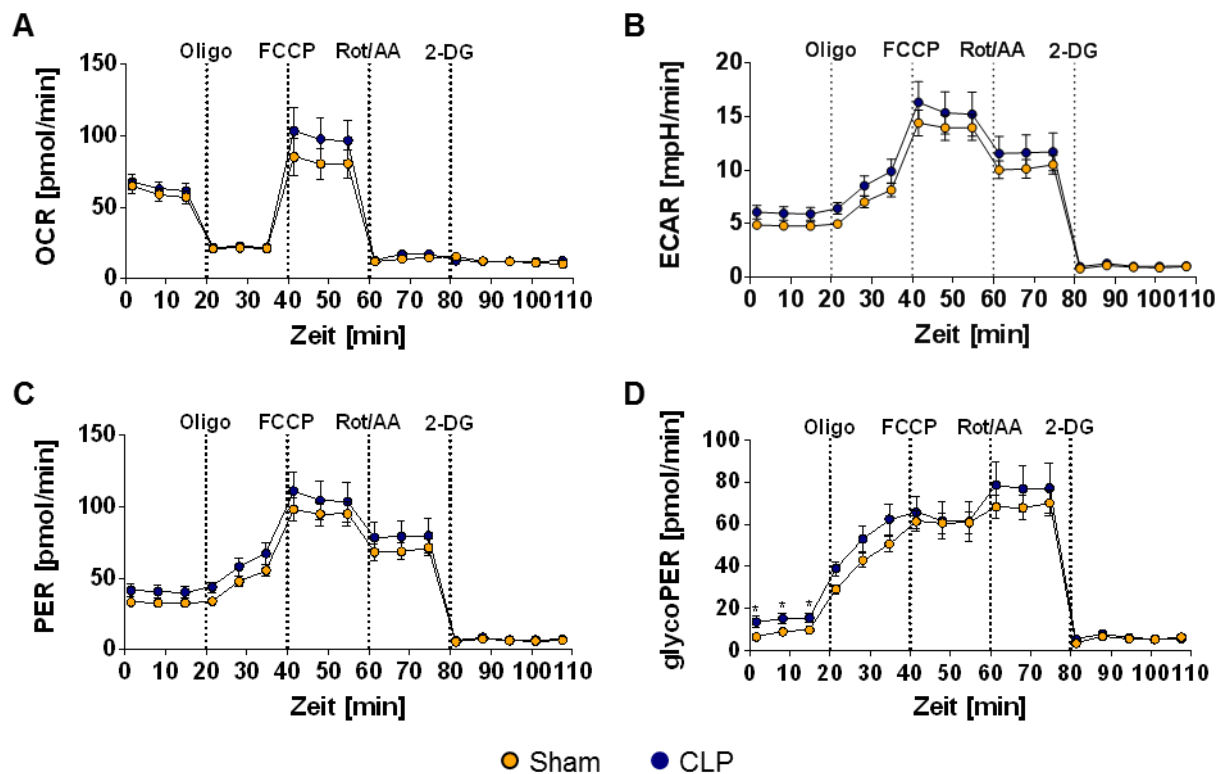


Abbildung 28: Metabolische Aktivität von Knochenmarksmoноzyten zwölf Wochen post-CLP. Kumulative A) Oxygen Consumption Rate (OCR), B) Extracellular Acidification Rate (ECAR), C) Proton Efflux Rate (PER) und D) glykolytic Proton Efflux Rate (glykoPER) von Sham (orange) und CLP (blau) Tieren gemessen mittels Seahorse Technologie. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$. $n = 9$ pro Kondition.

Der Proton-Leak beschreibt den Teil der basalen Atmung, der nicht an die ATP-Produktion gekoppelt ist. Auch hier sind keine signifikanten Unterschiede zwischen CLP- und Sham-Tieren erkennbar (Sham: $(8,8 \pm 1,2)$ pmol/min; CLP: $(3,2 \pm 1,0)$ pmol/min; $p = 0,7985$) (Abbildung 29C). Der maximale Sauerstoffverbrauch ist in den CLP-Tieren minimal erhöht (Sham: $(76,4 \pm 11,1)$ pmol/min; CLP: $(92,4 \pm 14,7)$ pmol/min; $p = 0,3965$) (Abbildung 29D). Die respiratorische Reservekapazität der Zellen ist in 12 Wochen postseptischen Monozyten tendenziell erhöht (Sham: $(31,3 \pm 8,5)$ pmol/min; CLP: $(43,5 \pm 11,0)$ pmol/min; $p = 0,3924$) (Abbildung 29E). Auch die nicht-mitochondriale Atmung zeigt keinen Unterschied zwischen Sham und CLP (Sham: $(12,0 \pm 0,9)$ pmol/min; CLP: $(12,4 \pm 1,1)$ pmol/min; $p = 0,7687$) (Abbildung 29F).

Die extrazelluläre Azidifizierungsrate (ECAR) (Abbildung 28B), sowie die Protoneneffluxrate (PER) (Abbildung 28C) naiver Knochenmarksmoноzyten zeigen keinen Unterschied zwischen postseptischen Tieren und Kontrollen im Verlauf.

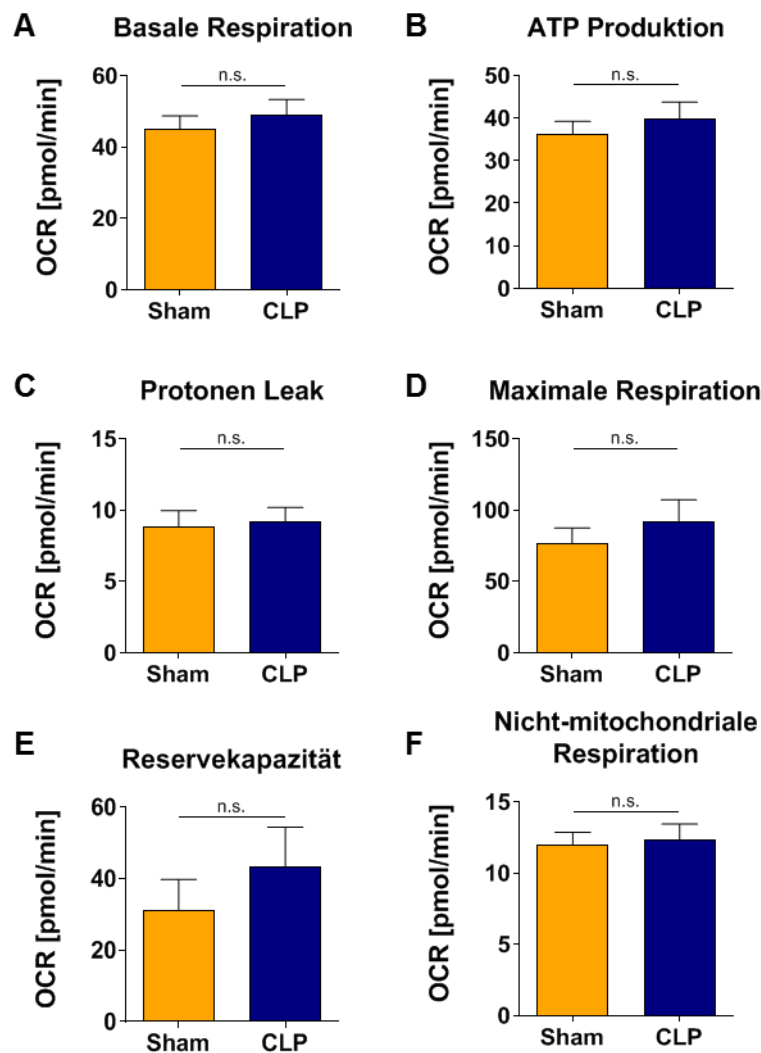


Abbildung 29: Mitochondriale Aktivität von Knochenmarkmonozyten. A) Basale Respiration, B) ATP Produktion, C) Protonen Leak, D) Maximale Respiration, E) Reservekapazität und F) Nicht-mitochondriale Respiration der Monozyten von Sham (orangener Balken) und CLP (blauer Balken) zwölf Wochen post-operativ. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. $n = 9$ pro Kondition.

Für die Bestimmung der glykolytische Rate wird die glykolytische Protoneneffluxrate (glykoPER) herangezogen (Abbildung 28D). Dabei zeigt sich ein signifikanter Anstieg der basalen Glykolyse in den Monozyten der Sepsis-Überlebenden von $(10,0 \pm 1,5)$ pmol/min in den Kontrolltieren auf $(15,7 \pm 2,2)$ pmol/min in den CLP-Tieren ($p = 0,0480$) (Abbildung 30A). Die kompensatorische Glykolyse ist ein Maß für die Kapazität der Zelle, die energetischen Belange rein aus der Glykolyse zu decken und ist nicht signifikant verändert. Jedoch steigt der Wert marginal von $(70,3 \pm 5,7)$ pmol/min in den Sham-Tieren auf $(79,0 \pm 10,9)$ pmol/min in den Sepsis-Überlebenden ($p = 0,4863$) (Abbildung 30B).

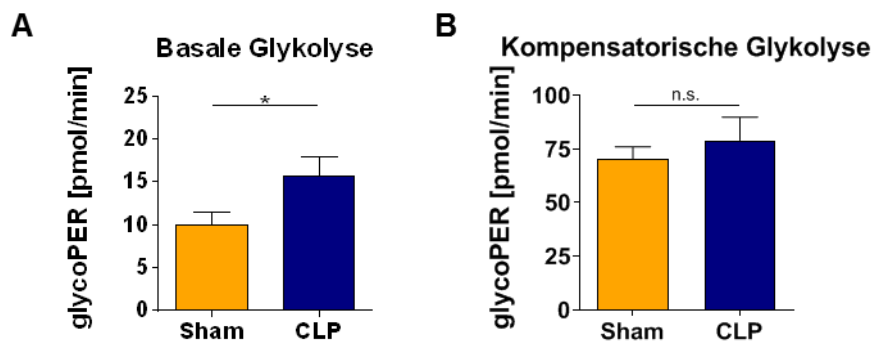


Abbildung 30: Glykolytische Rate von Knochenmarkmonozyten. A) Basale Glykolyse und B) Kompensatorische Glykolyse der Monozyten von Sham (orangener Balken) und CLP (blauer Balken) zwölf Wochen post-operativ. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$. $n = 9$ pro Kondition.

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse einen metabolischen Shift der postseptischen Knochenmarkmonozyten zur Glykolyse. Die mitochondriale Atmung bleibt dabei unbeeinflusst.

3.2.6. Einfluss einer Sepsis auf das Transkriptom naiver Knochenmarkmonozyten

Um einen mechanistischen Hintergrund der beobachteten Effekte zu ermitteln erfolgte die Analyse des Monozyten Transkriptoms von CLP- und Sham-Tieren mittels RNA-Seq.

Eine überstandene Sepsis verändert dabei langfristig die Expression von insgesamt 367 Genen (lineare Expressionsänderung $> 1,5$ -fach; $p < 0,02$). Sowohl die Cluster-Analyse (Abbildung 31A) als auch die Hauptkomponentenanalyse (Abbildung 31B) zeigen eine klare Differenzierung der 367 differentiell exprimierten Gene der Tiere entsprechend ihrer Exposition. Die erste Hauptkomponente (PC1) erklärt dabei 71,6% der Gesamtvarianz, die zweite Hauptkomponente (PC2) 18,2 %.

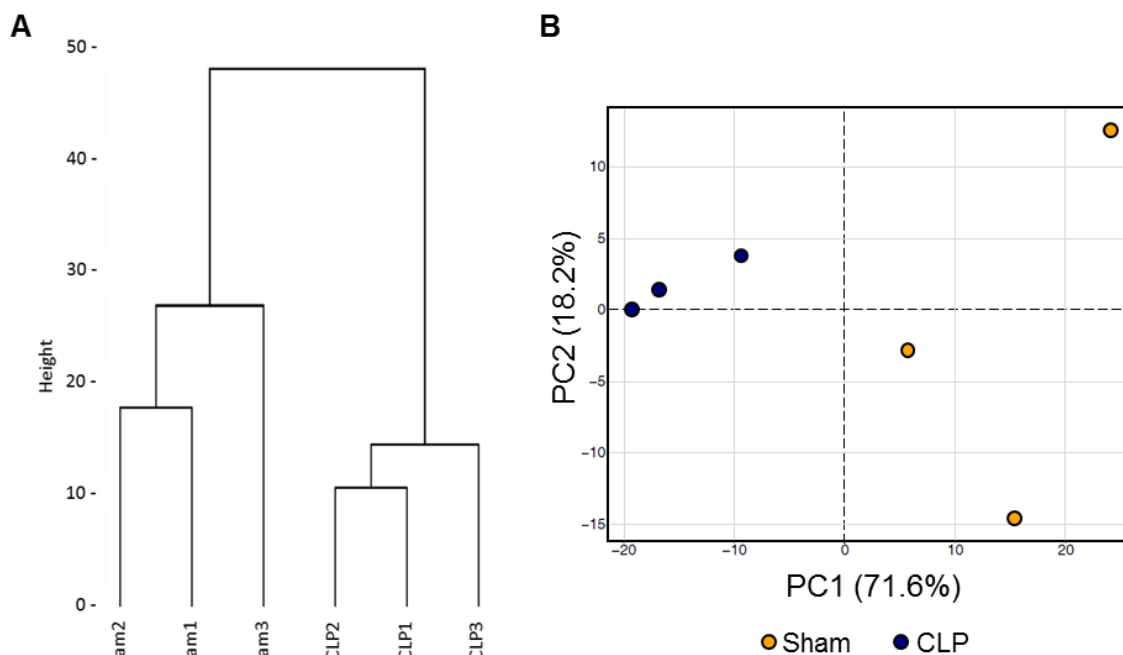


Abbildung 31: Transkriptionelle Reprogrammierung von postseptischen Knochenmarksmoноzyten. A) Cluster Analyse und B) Hauptkomponentenanalyse der 367 differenziell exprimierten Gene. n = 3 pro Kondition.

Die Heatmap in Abbildung 32A zeigt dabei, dass insgesamt 73 der 367 unterschiedlich exprimierten Gene hochreguliert und 294 herunterreguliert sind.

Im weiteren Vorgehen wurden die differenziell exprimierten Gene hinsichtlich ihrer biologischen Funktion mittel GO-Term Analyse untersucht (Abbildung 32B). Die hochregulierten Gene sind dabei in Prozessen wie der „cell mitgration“ oder „response to cytokines“ involviert. Die herunterregulierten Gene sind z.B. an Prozessen der „positive regulation of cilium assembly“ oder „carbohydrate derivative metabolic processes“ beteiligt. In Tabelle 5 sind die differenziell exprimierten Gene entsprechend der zugehörigen biologischen Funktion aufgeführt.

Zusammenfassend unterstreichen diese Ergebnisse die Induktion einer „trainierten Immunität“ in den Knochenmarksmoноzyten als Spätfolge der Sepsis. Änderungen sowohl im Metabolismus, als auch im Transkriptom der Zellen sind an der Etablierung dieses Status beteiligt.

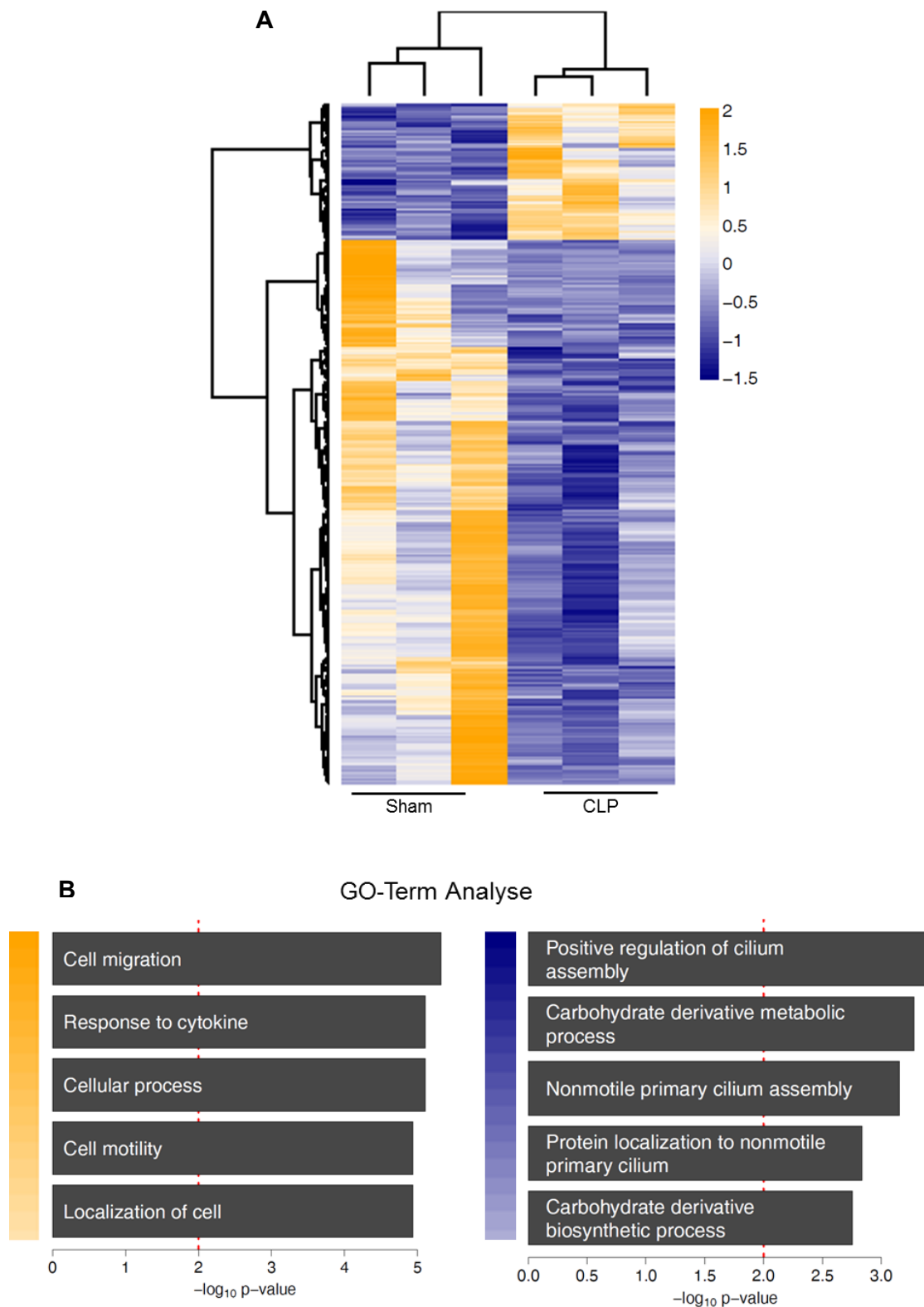


Abbildung 32: Differenziell exprimierte Gene in Monozyten zwölf Wochen post-CLP und deren biologische Funktionen. A) Darstellung als Heatmap der standardisierten Counts der differenziell exprimierten Gene von postseptischen Knochenmarkmonozyten. B) GO-Term Analyse mit den Top fünf hochregulierten (Orange) und Top fünf herunterregulierten (Blau) biologischen Prozessen. $n = 3$ pro Kondition.

Tabelle 5: Differentiell exprimierte Gene der Top fünf hoch- und herunterregulierten Gene.

Differentiell exprimierte Gene ↑	
GO-Term	Gene
Cell migration	<i>Itga5, Camk2d, Vcan, Nrg1, Pla2g7, Shtn1, Myd88, Fndc3b, P2ry12, Jak3, Adam9, Cxcl12, Lamc1</i>
Response to cytokine	<i>Pirb, Etv3, Igtp, Myd88, Csf2rb, Jak3, Adam9, Csf2rb2, Cxcl12</i>
Cellular process	<i>Itga5, Camk2d, Pirb, Vcan, Larp1, Zdhhc21, Atp11a, Txndc5, Nrg1, Kif1c, Pla2g7, Plrg1, Etv3, Hist1h1c, Igtp, Shtn1, Gda, Myd88, Fndc3b, Gsr, Tubb1, Hal, Sfxn5, Irf2bpl, P2ry12, Slc36a1, Hsd17b10, Timm50, Cuta, Rcc1, Ercc6l, Ctsc, Csf2rb, Ctsl, Jak3, Adam9, Psmb2, Csf2rb2, Dip2a, Cxcl12, Xdh, Ifi30, Ston2, Itpr3, Pigs, Fcgr1, Tubb2a, Slpi, F10, Txlna, Lamc1, Phospho1, Pycrl, Auh, Wdr36</i>
Cell motility	<i>Itga5, Camk2d, Vcan, Nrg1, Pla2g7, Shtn1, Myd88, Fndc3b, P2ry12, Jak3, Adam9, Cxcl12, Lamc1</i>
Localization of cell	<i>Itga5, Camk2d, Vcan, Nrg1, Pla2g7, Shtn1, Myd88, Fndc3b, P2ry12, Jak3, Adam9, Cxcl12, Lamc1</i>
Differentiell exprimierte Gene ↓	
GO-Term	Gene
Positive regulation of cilium assembly	<i>Fuz, Bbs4</i>
Carbohydrate derivative metabolic process	<i>Gnal, Has3, Tkfc, Aqp1, Adcy4, Ccdc126, Pigb, B3gnt4, Rpe, St3gal6, Cacnb4, Nme7, Aicda, Art3, Cep290, Ldhd</i>
Nonmotile primary cilium assembly	<i>Cep290, Fuz, Bbs4</i>
Protein localization to nonmotile primary cilium	<i>Bbip1, Bbs4</i>
Carbohydrate derivative biosynthetic process	<i>Gnal, Has3, Aqp1, Adcy4, Ccdc126, Pigb, B3gnt4, St3gal6, Nme7, Art3, Ldhd</i>

3.3. Intergenerationale Effekte einer paternalen Sepsis

Zur Evaluierung der generationsübergreifenden Langzeitfolgen einer Sepsis erfolgte eine Analyse der männlichen Keimbahnzellen sechs Wochen nach CLP. Eine zweite Kohorte männlicher C57/BL6 Mäuse wurde sechs Wochen nach induzierter Sepsis mit gesunden Weibchen verpaart und die Nachkommen hinsichtlich ihrer Entwicklung und Immunfunktion analysiert.

3.3.1. Einfluss der Sepsis auf die Funktionalität männlicher Keimzellen

Zur Untersuchung des Einflusses einer Sepsis auf die männlichen Keimzellen wurde zunächst ein Spermogramm nach WHO-Richtlinien (WHO, 2010) erstellt und die Spermien bezüglich ihrer Zellzahl, Motilität und Morphologie beurteilt.

Postseptische Tiere haben im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikant höhere Spermienanzahl (Abbildung 33A). Die Zellzahl der CLP-Tiere steigt dabei im Median von $2,7 \cdot 10^6$ Spermien auf $4,1 \cdot 10^6$ Spermien ($p = 0,0206$). Die Evaluation der Spermien-Motilität erfolgte entsprechend der drei Kategorien Progressiv (PR), eingeschränkt beweglich (NP) und immotil (IM) (s. Abschnitt 0). Dabei zeigen die Spermien von Sepsis-Überlebenden keine signifikanten Unterschiede in ihrer Beweglichkeit im Vergleich zu den Sham-Mäusen (PR: Sham 40,5 %; CLP: 41,0 %; $p = 0,9398$; NP: Sham 21,8 %; CLP: 20,0 %; $p = 0,5529$) (Abbildung 33B). Jedoch ist eine tendenzielle Erhöhung der Immobilität der Spermien von Sepsis-Überlebenden erkennbar (IM: Sham 32,3 %; CLP: 40,0 %; $p = 0,5177$).

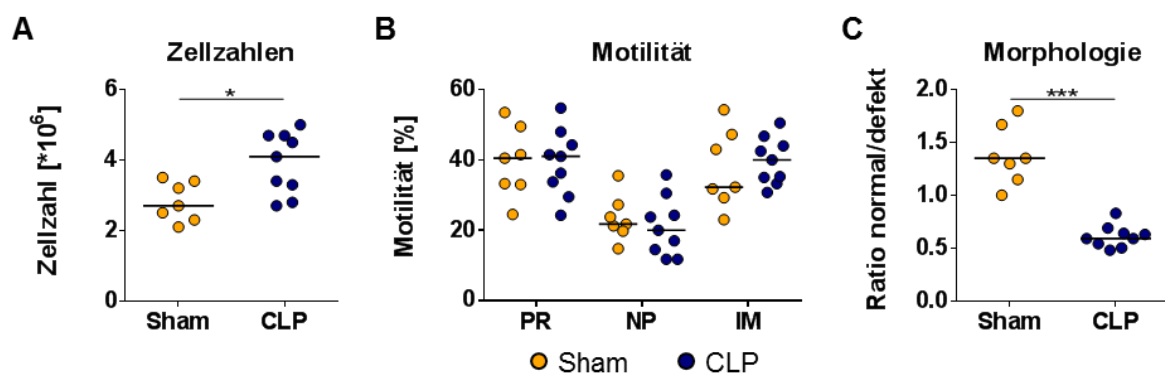


Abbildung 33: Spermogramm von CLP- und Sham-Tieren sechs Wochen post-OP. Die Beurteilung von zweimal 200 Spermien je Versuchstier (Motilität und Morphologie) erfolgte lichtmikroskopisch. A) Zellzahlen, B) Motilität und C) Morphologie. Ergebnisse sind dargestellt als Median. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$. $n_{\text{Sham}} = 7$, $n_{\text{CLP}} = 9$.

Im Vergleich dazu zeigt sich morphologisch eine deutliche Beeinträchtigung der Spermien nach einer durchlebten Sepsis (Abbildung 33C und Abbildung 34). Der Anteil der defekten Keimzellen ist in den Sepsis-Überlebenden signifikant höher als in den Sham-Mäusen (Median Ratio intakt/defekt CLP 0,6 und Sham 1,4; $p = 0,0002$) (Abbildung 33C).

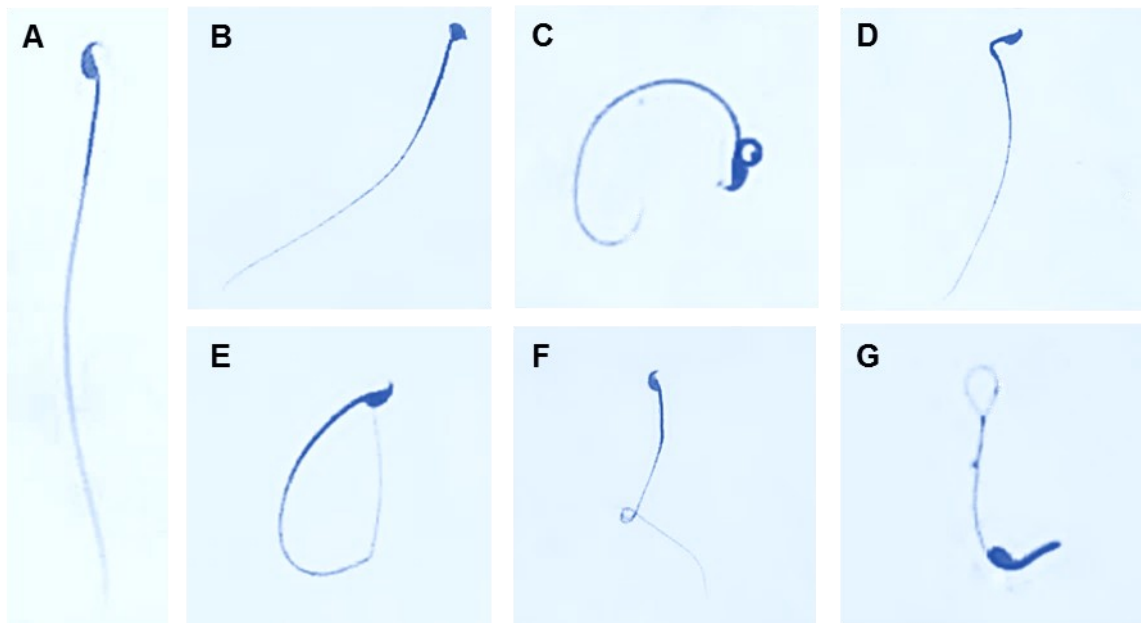


Abbildung 34: Exemplarische Darstellung verschiedener Spermiendefekte. A) Normales, intaktes Spermium. Defektes Spermium mit B) deformiertem Kopf, C) Coil-Bildung im Mittelstück D) geknicktem Mittelstück, E) geknicktem Flagellum und F) Coil im Flagellum. G) Spermium mit mehreren Defekten. Vergrößerung 400x.

3.3.2. Einfluss der Sepsis auf die DNA-Methylierung männlicher Keimbahnzellen

DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle in der Vererbung und Entwicklung (Greenberg and Bourc'his, 2019). Aufgrund der phänotypischen Auffälligkeiten des Spermioграмms wurden die Keimbahnzellen von postseptischen Mäusen und Kontrolltieren einer DNA-Methylierungsanalyse mittels RRBS unterzogen.

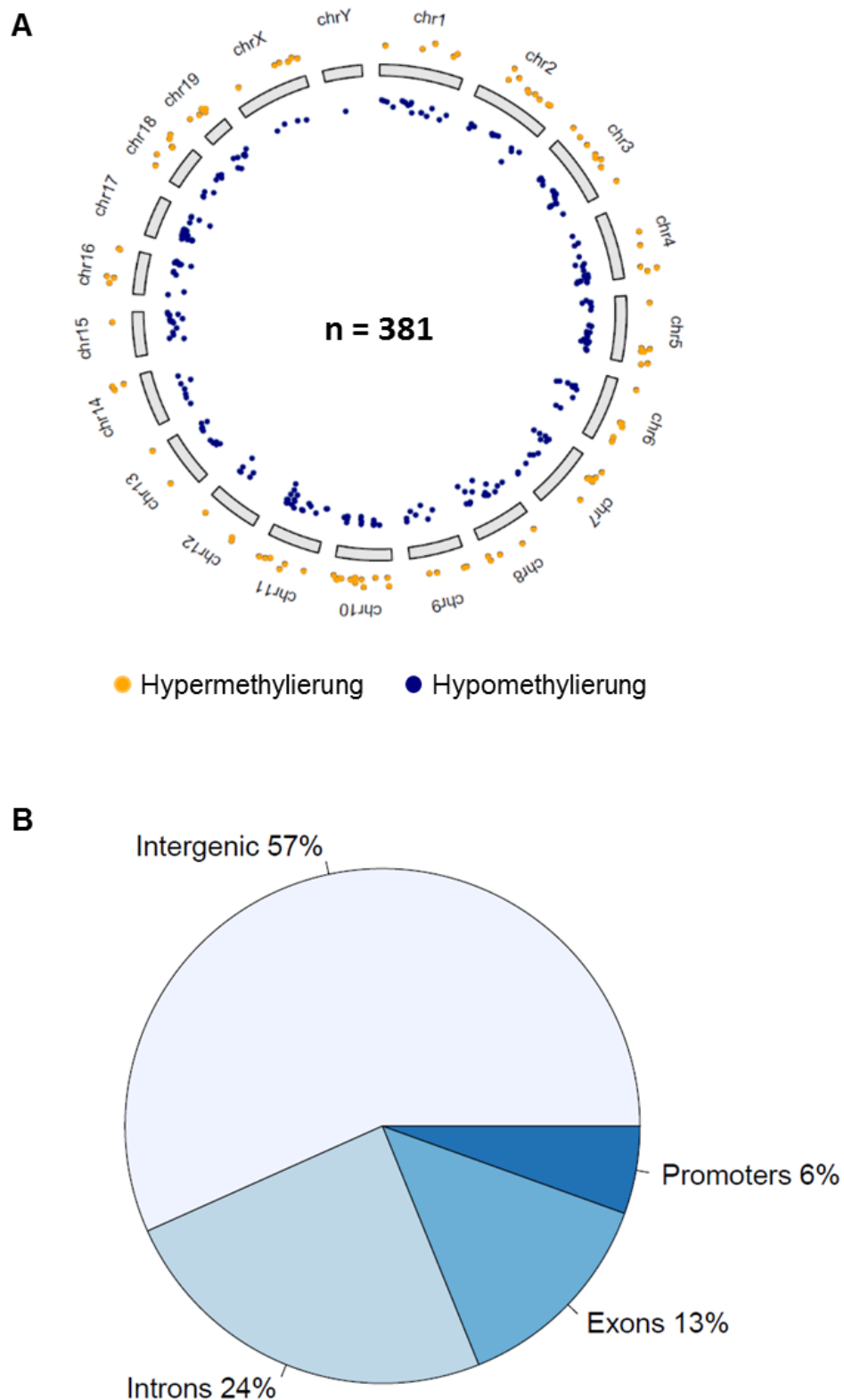


Abbildung 35: Verteilung von differentiell methylierten Cytosinen (dmCs) männlicher Keimzellen sechs Wochen post-CLP. A) Chromosomale Verteilung der hypermethylierten (orange) oder hypomethylierten (blau) dmCs dargestellt als Circos Plot und B) Verteilung der dmCs über die genomischen Regionen ermittelt via RRBS-Analyse. n = 5 pro Kondition.

Dabei konnten 381 differentiell methylierte Cytosine (dmCs) ausfindig gemacht werden (Methylation change $\geq 25\%$, q -Wert $\leq 0,01\%$). Diese hypo- und hypermethylierten dmCs sind über den gesamten Chromosomensatz verteilt (Abbildung 35A). Der Großteil der dmCs befinden sich dabei in den intergenen Regionen (57 %), gefolgt von Introns (24 %), Exons (13 %) und Promotorregionen (6 %) (Abbildung 35B).

Die Hauptkomponentenanalyse (Abbildung 36) zeigt ein eindeutiges Clustering der dmCs der Tiere entsprechend ihrer Exposition. Die erste Hauptkomponente (PC1) erklärt dabei 47,7 % der Gesamtvarianz zwischen postseptische Mäusen und Kontrolltiere, die zweite Hauptkomponente (PC2) 12,6 %.

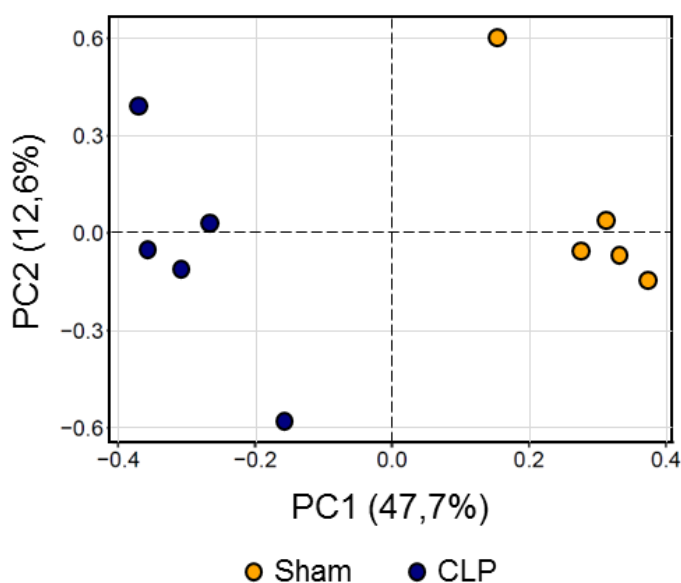


Abbildung 36: Hauptkomponentenanalyse postseptischer Spermien. Das Clustering erfolgte unter der Verwendung der 381 dmCs. $n = 5$ pro Kondition.

Im weiteren Verlauf der Analyse wurden die dmCs unter der Berücksichtigung ihrer genomischen Lage (Promotorregion, Exon oder Intron) den korrespondierenden Genen zugeordnet (Abbildung 37A) und deren biologischen Funktion mittels GO-Term Analyse evaluiert (Abbildung 37B-D).

Dabei sind Gene mit unterschiedlich methylierten Cytosinen im Promotorbereich an Prozessen der Proteinfaltung, an metabolischen Prozessen der Nukleotide oder an der Regulation der Entwicklung von Endothelzellen beteiligt (Abbildung 37B). Gene, mit unterschiedlichen dmCs im Exonbereich beeinflussen Prozesse der Kohlenhydrat-Biosynthese und deren Metabolismus (Abbildung 37C). Gene mit dmCs im Intronbereich sind an der Regulation der Zelldifferenzierung, sowie an Entwicklungsprozessen beteiligt (Abbildung 37D).

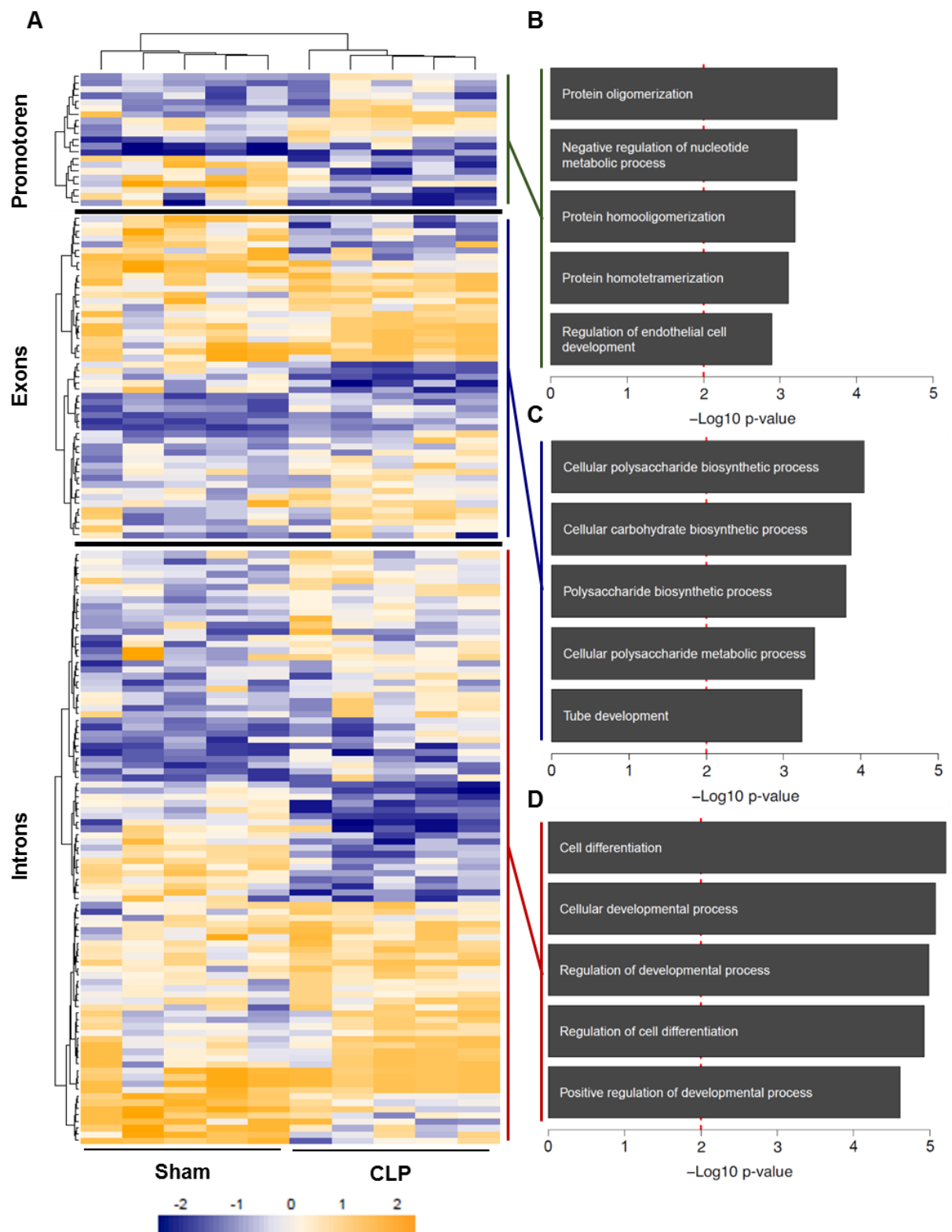


Abbildung 37: Korrespondierende Gene differenziell methylierter Cytosine und deren biologische Funktion. A) Darstellung der Gene mit postseptischen dmCs als Heatmap sortiert nach genomischer Region. B)-D) GO-Term Analyse der Gene differenziell methylierter Cytosine. Dargestellt sind die Top 5 der überrepräsentierten biologischen Prozesse von Genen mit dmCs in B) Promoterregionen, C) Exons und D) Introns. n = 5 pro Kondition.

3.3.3. Einfluss der Sepsis auf das Hodenmilieu

Im nächsten Schritt wurde der persistierende Einfluss der Sepsis auf das Hodenmilieu mit Fokus auf proinflammatorische Zytokine untersucht. Dazu wurde RNA aus den Hoden isoliert und die Expression der Gene Tnf, Il6 und Il1a evaluiert (Abbildung 38).

Tnf und Il1a zeigen keine signifikanten Änderungen in der testikulären Genexpression. Die Expression von Tnf ist dabei tendenziell hochreguliert (Sham: $2,83 \cdot 10^{-3} \pm 0,53 \cdot 10^{-3}$, CLP: $4,0 \cdot 10^{-3} \pm 0,7 \cdot 10^{-3}$ ($p = 0,2362$)) (Abbildung 38A), wohingegen Il1a tendenziell herunterreguliert ist (Sham: $7,8 \cdot 10^{-3} \pm 1,3 \cdot 10^{-3}$, CLP: $6,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,8 \cdot 10^{-3}$ ($p = 0,2717$)) (Abbildung 38B). Im Gegensatz dazu ist die Genexpression von Il6 signifikant reduziert (Sham: $2,4 \cdot 10^{-3} \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$, CLP: $1,7 \cdot 10^{-3} \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$ ($p = 0,0391$)) (Abbildung 38C).

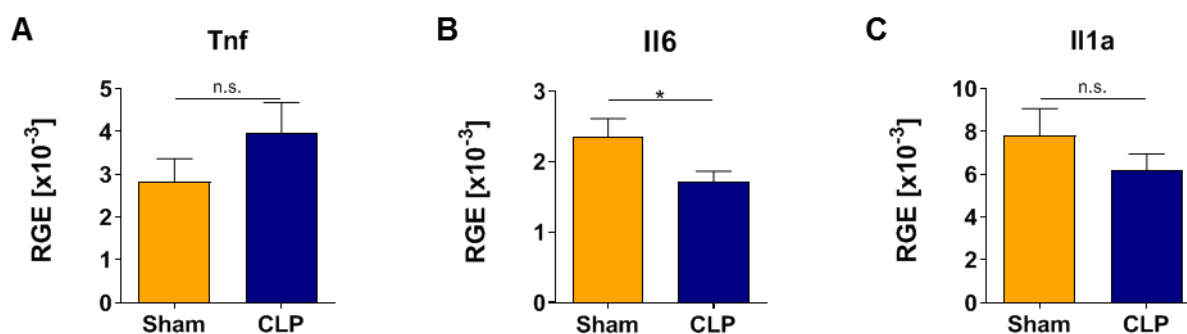


Abbildung 38: Genexpression proinflammatorischer Zytokine im Hodengewebe. A) Tnf, B) Il6 und C) Il1a. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. *: $p < 0,05$. $N_{\text{Sham}} = 7$, $N_{\text{CLP}} = 9$.

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse einen deutlichen Einfluss einer überstandenen Sepsis auf die männliche Keimbahn.

3.3.4. Einfluss einer paternalen Sepsis auf die Entwicklung der Nachkommen

Wichtige Aspekte bei der Evaluierung intergenerationaler Vererbungseffekte sind die Beurteilung der Sterblichkeit, der Würfe und der Entwicklung der Nachkommen.

Dabei erfolgte die Erfassung verstorbener Tiere über einen Zeitraum von 84 Tagen nach Geburt.

Insgesamt wurden 98 Tiere von CLP-Vätern und 110 Tiere von Sham-Vätern geboren. Die Sterblichkeit der Sepsis-Nachkommen ist dabei mit 22,4 % (76/98) im Vergleich zu den Kontrollen mit 13,6 % (95/110) signifikant höher ($p = 0,0454$) (Abbildung 39A). Die meisten

Tiere verstarben dabei innerhalb der ersten Woche nach Geburt, mit Ausnahme eines Tieres, das aufgrund einer Zahnfehlstellung euthanasiert werden musste (Tabelle 6).

Tabelle 6: Übersicht über die Anzahl lebender Tiere im Beobachtungszeitraum. Tag 0 entspricht dabei dem Tag der Geburt.

Tag	0	1	3	6	7	8	33	84	Überleben
Sham	110	107	104	104	104	96	95	95	86,4 %
CLP	98	83	83	82	76	76	76	76	77,6 %

Insgesamt resultierten 13 von 20 Würfen von CLP Vätern und 16 von 20 Würfen von Kontrolltieren. Die Anzahl der geborenen Tiere innerhalb der Würfe zeigt mit einem Median von acht Tieren von postseptischen Vätern keinen Unterschied zu einem Median von sieben Tieren von Sham-Vätern (Abbildung 39B). Auch die Geschlechtsverteilung innerhalb der Würfe zeigt keine relevanten Unterschiede zwischen Nachkommen von CLP- und Sham-Vätern (Abbildung 39B). Innerhalb der Gruppen selbst liegt eine Verteilung von 1,16:1 in der Kontrollgruppe, sowie 1,38:1 in der CLP-Gruppe zugunsten des männlichen Geschlechts vor.

Zur Beurteilung der Entwicklung der Nachkommen wurden die Tiere über einen Zeitraum von 57 Tagen nach dem Absetzen von den Muttertieren zweimal pro Woche gewogen. Sowohl weibliche als auch männliche Nachkommen der Sepsis-Väter sind in ihrer Gewichtsentwicklung beeinträchtigt im Vergleich zu Nachkommen von Nicht-Sepsis-Vätern (Abbildung 39D+E). Dabei ist zu Beginn kein Unterschied in der Gewichtsentwicklung beider Gruppen zu beobachten. Ab Tag 8 hebt sich dann jedoch eine deutlich geringere Gewichtszunahme der postseptischen Nachkommen hervor, die im weiteren Zeitverlauf immer ausgeprägter wird. Tiere des männlichen Geschlechts sind dabei deutlich stärker betroffen als Mäuse des weiblichen Geschlechts.

Am letzten Beobachtungstag, Tag 57 nach dem Absetzen, sind die weiblichen CLP-Nachkommen mit 19,9 g im Median signifikant leichter als die weiblichen Nachkommen der Sham-Väter mit 20,5 g im Median ($p = 0,0072$) (Abbildung 39F). Männliche Sepsis-Nachkommen sind mit einem Gewicht von 25,7 g im Median deutlich leichter als männliche Sham-Nachkommen mit einem Gewicht von 27,1 g im Median ($p = 0,001$) (Abbildung 39F). Hier verdeutlicht sich ein stärkerer Einfluss einer durchlebten Sepsis der Väter auf männliche Nachkommen.

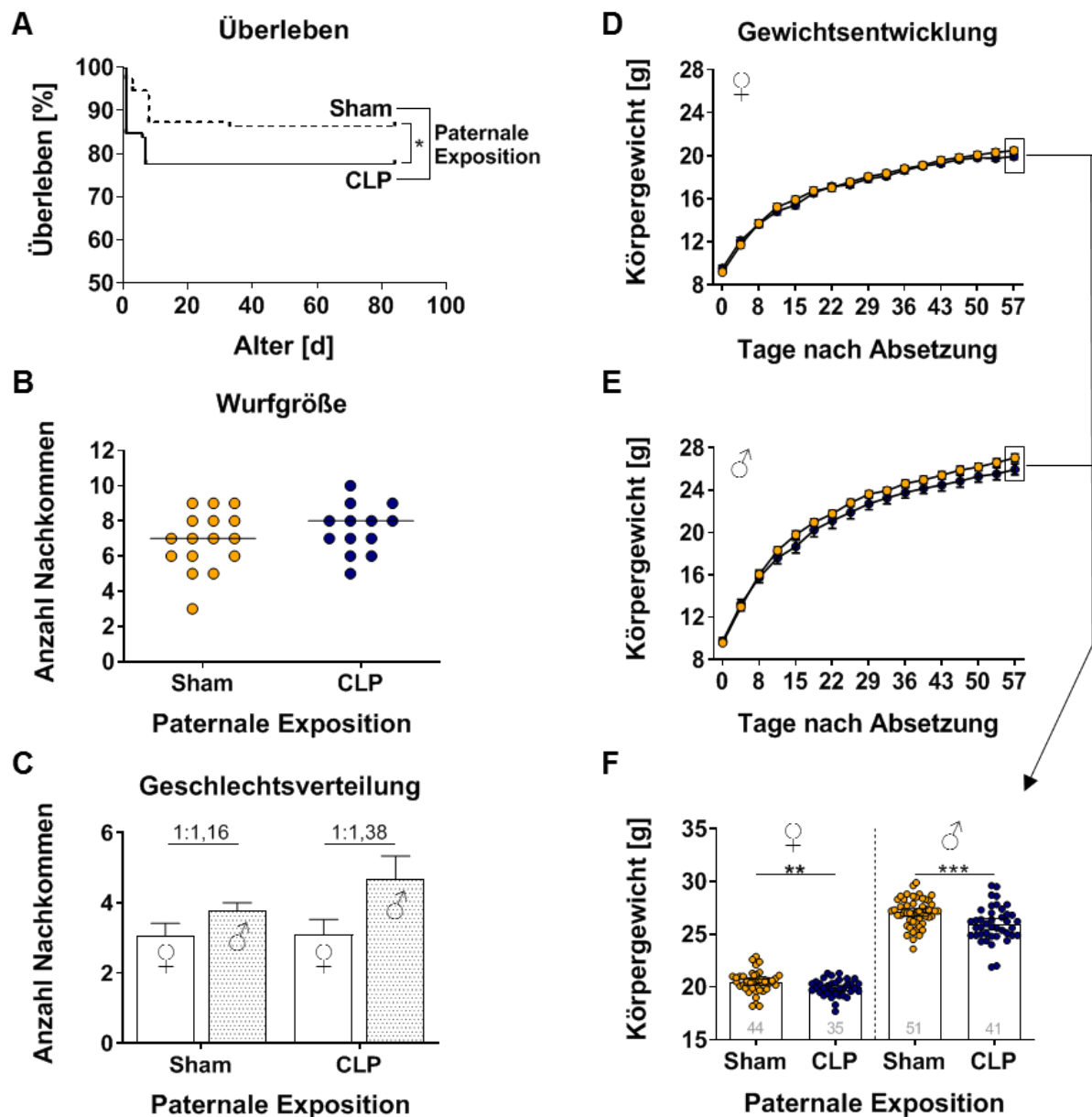


Abbildung 39: Entwicklung der Nachkommen postseptischer Väter. A) Überlebenskurve der Nachkommen über 84 Tage. B) Anzahl der Nachkommen und C) Geschlechtsverteilung innerhalb der Würfe ($n_{\text{Würfe CLP}} = 13$; $n_{\text{Würfe Sham}} = 16$). D) Gewichtsentwicklung weiblicher Nachkommen und E) männlicher Nachkommen nach Absetzung. F) Körpergewicht an Tag 57 nach Absetzung weiblicher (links) und männlicher Tiere (rechts). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine paternale Sepsis einen gravierenden Einfluss auf das postnatale Überleben als auch die Entwicklung von Nachkommen hat und diese besonders im männlichen Geschlecht beeinträchtigt.

3.3.5. Einfluss einer paternalen Sepsis auf die systemische Immunantwort der Nachkommen

Ein wesentliches in der Literatur beschriebenes Merkmal der Sepsis ist das Auftreten einer persistierenden Immunparalyse des Wirtes lange nach Ausheilung des Syndroms. Zur Klärung der Frage, ob ein solches Phänomen sich auch auf Nachkommen übertragen lässt, wurden Nachkommen von männlichen Sepsis-Überlebenden und Kontrolltieren hinsichtlich ihrer systemischen Immunfunktion untersucht.

Zunächst erfolgte dazu eine *ex vivo* Stimulation des zuvor mittels Herzpunktion gewonnenen Vollblutes mit LPS oder Zymosan. Wie erwartet kommt es in beiden Konditionen zu einer Ausschüttung von TNF (LPS-Stimulation (Abbildung 40): Sham Weibchen: NaCl 0,0 pg/ml, LPS 17,5 pg/ml ($p = 0,0006$), CLP Weibchen: NaCl 0,0 pg/ml, CLP 32,0 pg/ml ($p = 0,0070$), Sham Männchen: NaCl 0,0 pg/ml, LPS 4,8 pg/ml ($p = 0,0072$), CLP Männchen: NaCl 0,0 pg/ml, LPS 29,9 pg/ml ($p = 0,0003$); Zymosan Stimulation (Abbildung 41): Sham-Weibchen: NaCl 0,0 pg/ml, Zymosan 2,3 pg/ml ($p = 0,2494$), CLP-Weibchen: NaCl 0,0 pg/ml, Zymosan 4,4 pg/ml ($p = 0,1795$), Sham und CLP Männchen: NaCl 0,0 pg/ml, Zymosan 0,0 pg/ml ($p_{\text{Sham}} = 0,4783$, $p_{\text{CLP}} = 0,0843$)).

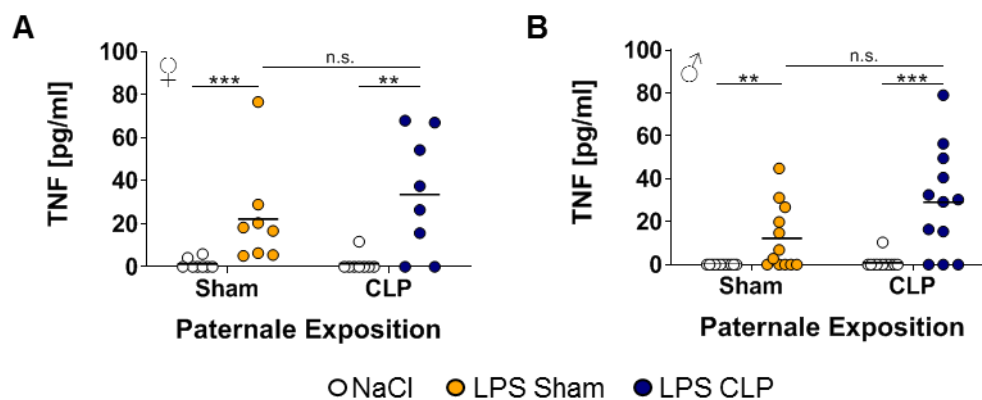


Abbildung 40: TNF-Konzentration im Überstand von Vollblut nach LPS Stimulation. Die Messung der Zytokinexpression erfolgte mittels ELISA 24 Stunden nach Stimulation mit NaCl (weiß) oder LPS (200 ng/ml; orange bzw. blau). A) Weibliche Nachkommen ($n = 8$ pro Kondition) und B) männliche Nachkommen ($n = 12$ pro Kondition) von Sham- (orange) und CLP-Vätern (blau). Dargestellt ist der Median (schwarze horizontale Linie).

Nach LPS-Stimulation ist die TNF-Expression im Überstand von Vollblut in CLP-Nachkommen im Vergleich zu den Sham-Tieren lediglich minimal erhöht (Abbildung 40). Weibliche Tiere (Abbildung 40A) zeigen dabei einen Anstieg im Median von 17,5 pg/ml in den Sham-Tieren auf 32,0 pg/ml in den CLP-Tieren ($p = 0,6227$), männliche Nachkommen (Abbildung 40B) von

4,2 pg/ml auf 29,9 pg/ml ($p = 0,0852$). Ein Sekretionsunterschied zwischen den Geschlechtern zeichnet sich somit nicht ab.

Die Zymosan-Stimulation führt zu keiner Änderung der TNF-Ausschüttung (Abbildung 41). Die TNF-Konzentration im Vollblut-Überstand weiblicher Nachkommen (Abbildung 41A) liegt dabei im Median bei 2,3 pg/ml von Sham-Tieren und bei 4,4 pg/ml von CLP-Tieren ($p = 0,5235$), die der männlichen Nachkommen (Abbildung 41B) in beiden Konditionen bei 0,0 pg/ml ($p = 0,1981$).

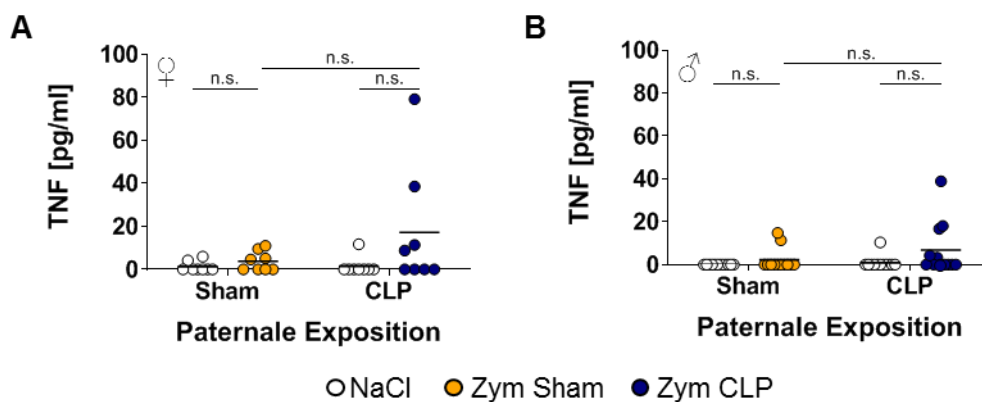


Abbildung 41: TNF-Konzentration von Vollblut nach Stimulation mit Zymosan. Die Zytokinkonzentration im Überstand wurde 24 Stunden nach NaCl (weiß) oder Zymosan-Stimulation (250 µg/ml; orange bzw. blau) mittels ELISA bestimmt. A) Weibliche Nachkommen ($n = 8$ pro Kondition) und B) männliche Nachkommen ($n = 12$ pro Kondition) von Sham (orange) und postseptischen Vätern (blau). Dargestellt ist der Median (schwarze horizontale Linie).

Zur Testung der Funktionalität der systemischen Immunantwort, wurden die Tiere im nächsten Schritt *in vivo* mit LPS konfrontiert.

Um den Erfolg der LPS-Stimulation zu gewährleisten, erfolgte die Gewichtserfassung der Tiere vor der Injektion sowie 24 Stunden *post injectionem* (Abbildung 42). Wie erwartet zeichnet sich in den LPS-injizierten Tieren ein deutlicher Gewichtsverlust ab. Dabei zeigen weibliche Sham-Nachkommen 24 Stunden nach Injektion einen medianen Gewichtsunterschied von 2,8 % in NaCl-Tieren und -10,8 % in LPS-Tieren ($p = 0,0006$) und weibliche CLP-Nachkommen 0,4 % nach NaCl-Gabe und -10,8 % nach LPS-Injektion ($p = 0,1520$) (Abbildung 42A). Der mediane Gewichtsverlust männlicher Sham-Nachkommen liegt bei -0,4 % 24 Stunden nach NaCl-Gabe und bei -9,2 % nach LPS-Injektion ($p = 0,0207$), der männlicher CLP-Nachkommen bei -1,0 % nach NaCl und -11,3 % nach LPS ($p = 0,0019$) (Abbildung 42B).

Einen Unterschied in der Stärke des LPS-induzierten Effekts in Abhängigkeit zum prozentualen Gewichtsverlust zwischen CLP und Sham Nachkommen ist dabei nicht

erkennbar (weibliche Nachkommen: Sham -10,8 %; CLP -10,8 %; $p = 0,6454$; männliche Nachkommen: Sham -9,2 %; CLP -11,3 %; $p = 0,1049$) (Abbildung 42).

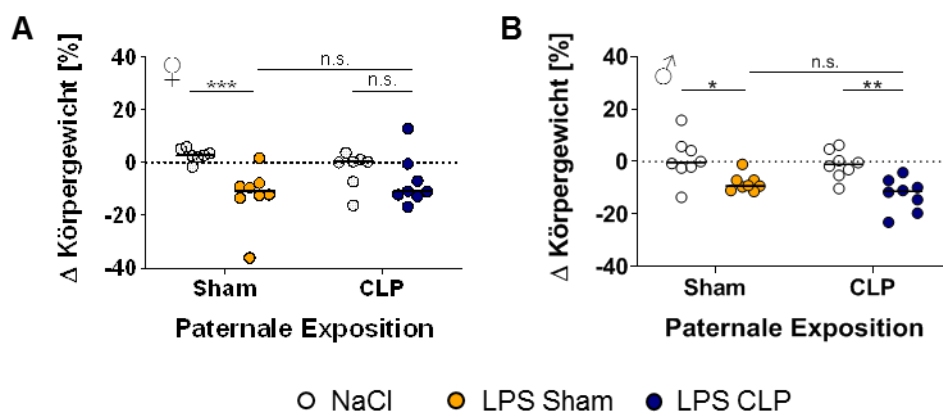


Abbildung 42: Relativer Gewichtsverlust nach intraperitonealer LPS Injektion (1 mg/kg KG).

Weibliche (A) oder männliche (B) Nachkommen von Sham- oder CLP-Vätern wurden vor, sowie 24 Stunden nach Injektion mit NaCl (weiß) oder LPS (orange bzw. blau) gewogen und der prozentuale Gewichtsverlust berechnet. $n = 8$ pro Kondition, mit Ausnahme der weiblichen NaCl Tiere ($n = 7$). Dargestellt ist der Median (schwarze horizontale Linie). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Die Zytokinexpression im Vollblut 24 Stunden nach *in vivo* LPS-Stimulation wurde mittels CBA bestimmt. Wie erwartet induziert LPS auch in den Nachkommen einen signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6, des Monozyten-chemotaktischen Protein-1 (MCP-1), sowie dem antiinflammatorischen Zytokin IL-10 (Abbildung 43). Dabei steigt die mediane TNF-Konzentration im Vollblut LPS-injizierter weiblicher Sham-Nachkommen von 3,7 pg/ml in NaCl-Tieren auf 24,2 pg/ml in LPS-Tieren ($p = 0,0016$), in weiblichen CLP-Nachkommen von 2,5 pg/ml auf 16,1 pg/ml ($p = 0,0121$) (Abbildung 43A). In männlichen Sham-Nachkommen liegt eine TNF-Konzentration von 3,6 pg/ml nach NaCl-Injektion und 51,1 pg/ml nach LPS-Gabe vor ($p = 0,0002$), in männlichen CLP Nachkommen 3,2 pg/ml nach NaCl und 26,8 pg/ml nach LPS ($p = 0,0002$) (Abbildung 43B). Die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 ist 24 Stunden nach LPS Injektion in weiblichen Sham-Tieren von 0,0 pg/ml auf 127,1 pg/ml im Median angestiegen ($p = 0,0003$), in weiblichen CLP-Tieren von 0,0 pg/ml auf 75,3 pg/ml ($p = 0,0107$) (Abbildung 43C). Die IL-6 Expression im Vollblut männlicher Sham-Tiere ist im Median von 0,8 pg/ml auf 738,3 pg/ml erhöht ($p = 0,0002$), die männlicher CLP-Nachkommen von 0,0 pg/ml auf 151,3 pg/ml ($p = 0,0002$) (Abbildung 43D).

MCP-1 ist in weiblichen Sham-Tieren von 43,8 pg/ml auf 2123 pg/ml angestiegen ($p = 0,0003$), in weiblichen CLP-Tieren von 34,6 pg/ml auf 1448 pg/ml ($p = 0,0025$) (Abbildung 43E). Die MCP-1 Expression im Vollblut männlicher Sham-Tiere ist von 44,5 pg/ml auf 3.296 pg/ml

erhöht ($p = 0,0002$), die männlicher CLP-Nachkommen von 39,6 pg/ml auf 2.932 pg/ml ($p = 0,0002$) (Abbildung 43F).

Die IL-10 Konzentration weiblicher Sham-Tieren zeigt einen Anstieg 0,0 pg/ml auf 12,3 pg/ml ($p = 0,0263$), die der weiblichen CLP-Tieren ist mit 0,0 pg/ml unverändert ($p = 0,2000$) (Abbildung 43G). Die IL-10 Konzentration im Vollblut männlicher Sham-Tiere erhöht sich von 0,0 pg/ml auf 61,0 pg/ml ($p = 0,0002$), die männlicher CLP-Nachkommen von 0,0 pg/ml auf 27,4 pg/ml ($p = 0,0070$) (Abbildung 43H).

Interessanterweise zeigt der direkte Vergleich der Zytokinkonzentrationen im Vollblut von Sham- und CLP-Nachkommen 24 Stunden nach LPS-Injektion eine deutliche Reduktion der Zytokinantwort von TNF und IL-6 ausschließlich in männlichen Nachkommen der CLP-Väter. Dabei reduziert sich die TNF-Produktion im Median von 51,1 pg/ml in Sham-Tieren auf 26,8 pg/ml in CLP-Tieren ($p = 0,0407$) (Abbildung 43B) und die IL-6-Konzentration von 738,4 pg/ml auf 151,3 pg/ml ($p = 0,0047$) (Abbildung 43D). Die IL-10-Sekretion ist von 61,0 pg/ml auf 27,4 pg/ml ($p = 0,0062$) reduziert (Abbildung 43H), wohingegen MCP-1 unverändert bleibt (Sham: 3.296 pg/ml; CLP: 2.930 pg/ml ($p = 0,1949$)) (Abbildung 43F). Im Gegensatz dazu ist die Immunantwort der Weibchen nur marginal beeinträchtigt. Lediglich IL-10 ist signifikant von 12,3 pg/ml auf 0,0 pg/ml reduziert ($p = 0,0062$) (Abbildung 43G). Die Konzentrationen der Zytokine TNF (Sham: 24,2 pg/ml; CLP: 16,2 ($p = 0,1049$)) (Abbildung 43A), IL-6 (Sham: 127,1 pg/ml; CLP: 75,3 pg/ml ($p = 0,5526$)) (Abbildung 43C) und MCP1 (Sham: 2.123 pg/ml; CLP: 1.448 pg/ml ($p = 0,2786$)) (Abbildung 43F) sind unverändert zwischen weiblichen Sham und CLP-Nachkommen.

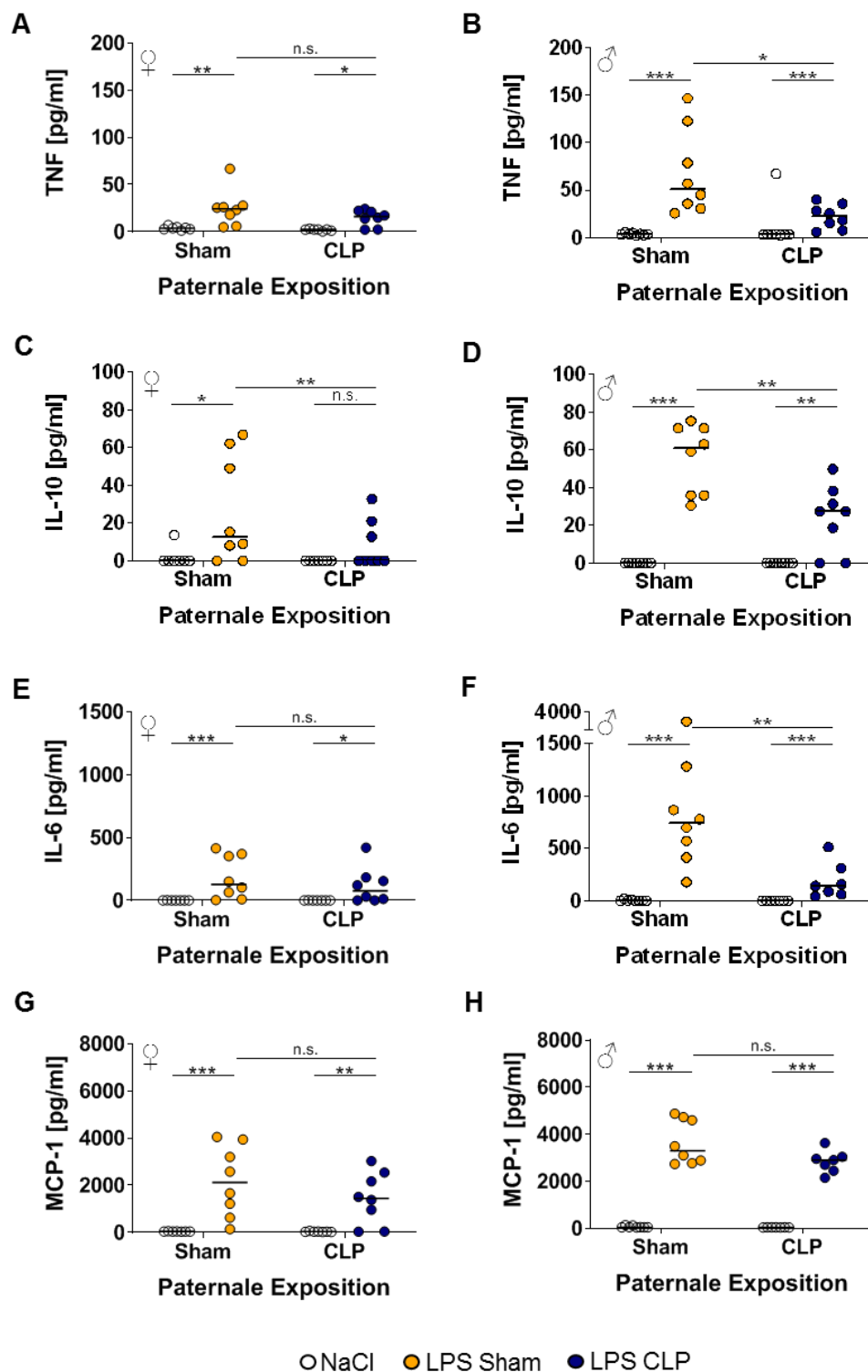


Abbildung 43: Zytokin-Konzentrationen im Vollblut 24 Stunden nach LPS-Stimulation *in vivo*. Weibliche (A, C, E und G) oder männliche (B, D, F und H) Nachkommen von Sham- oder CLP-Vätern wurden intraperitoneal mit NaCl oder LPS injiziert und die Konzentrationen der Zytokine TNF (A und B), IL-6 (C und D), MCP-1 (E und F) und IL-10 (G und H) des Vollblutes 24 Stunden post-injectionem mittels CBA gemessen. n = 8 pro Kondition, mit Ausnahme der weiblichen NaCl Tiere (n = 7). Dargestellt ist der Median (schwarze horizontale Linie). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

3.3.6. Einfluss einer paternalen Sepsis auf die pulmonale Immunfunktion der Nachkommen

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob ein solcher Effekt nicht nur systemisch, sondern auch organspezifisch auftritt. Dazu wurden Alveolarmakrophagen mittels BAL von Sham- und Sepsis Nachkommen gewonnen und *ex vivo* mit LPS und Zymosan stimuliert (Abbildung 44). Die Konfrontation der Alveolarmakrophagen mit LPS zeigt einen Anstieg der TNF-Produktion im Median sowohl in männlichen, als auch weiblichen Nachkommen 24 Stunden nach Stimulation (Sham Weibchen: NaCl: 50,7 pg/ml im Median, LPS: 2.443 pg/ml ($p < 0,0001$); CLP Weibchen: NaCl: 76,2 pg/ml, LPS: 3.400 pg/ml ($p < 0,0001$); Sham Männchen: NaCl: 36,0 pg/ml, LPS: 1.719 pg/ml ($p < 0,0001$); CLP Männchen: NaCl: 53,5 pg/ml, LPS: 1.510 pg/ml ($p < 0,0001$)). Auch die Stimulation mit Zymosan führt zu einer verstärkten TNF-Produktion (Sham Weibchen: NaCl: 50,7 pg/ml, Zymosan: 7.883 pg/ml ($p < 0,0001$); CLP Weibchen: NaCl: 76,2 pg/ml, Zymosan: 7.803 pg/ml ($p = 0,0001$); Sham Männchen: NaCl: 36,0 pg/ml, Zymosan: 6.357 pg/ml ($p < 0,0001$); CLP Männchen: NaCl: 53,5 pg/ml, Zymosan: 4.182 pg/ml ($p < 0,0001$)).

Die TNF-Konzentration im Überstand der Zymosan-stimulierten Proben ist in Nachkommen beider Konditionen gegenüber den LPS stimulierten Proben im Median signifikant erhöht (Sham Weibchen: LPS: 2.443 pg/ml, Zymosan: 7.883 pg/ml ($p = 0,0018$); CLP Weibchen: LPS: 3.400 pg/ml, Zymosan: 7.803 pg/ml ($p = 0,0068$); Sham Männchen: LPS: 1.719 pg/ml, Zymosan: 6.357 pg/ml ($p = 0,0001$); CLP Männchen: LPS: 1.510 pg/ml, Zymosan: 4.182 pg/ml ($p < 0,0001$)).

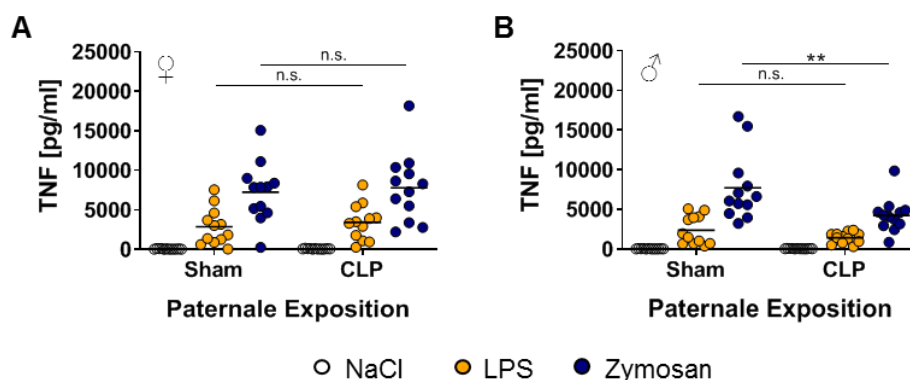


Abbildung 44: TNF-Expression von Alveolarmakrophagen nach LPS-Stimulation. Tiere wurden intraperitoneal mit LPS (1 mg/kg KG) injiziert und die IL-6 Konzentration im Vollblut nach 24 Stunden mittels CBA bestimmt. A) Weibliche Nachkommen ($n_{\text{NaCl}} = 7$, $n_{\text{LPS}} = 8$) und B) männliche Nachkommen ($n = 8$ pro Kondition) von Sham- (orange) und CLP-Vätern (blau). Dargestellt ist der Median (schwarze horizontale Linie). **: $p < 0,01$.

Die TNF-Konzentrationen der Alveolarmakrophagen weiblicher Nachkommen von Sepsis-Vätern sowohl nach LPS-, als auch nach Zymosan Stimulation zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Zytokinexpression im Vergleich zu Nachkommen von Kontrolltieren (LPS: Sham: 2.443 pg/ml, CLP: 3.400 pg/ml ($p = 0,5059$); Zymosan: Sham: 7.883 pg/ml, CLP: 7.803 pg/ml ($p = 0,7857$)) (Abbildung 44A). Auch die TNF-Konzentration der Alveolarmakrophagen der männlichen Nachkommen ist nach LPS-Stimulation unverändert (Sham: 1.719 pg/ml, CLP: 1.510 pg/ml ($p = 0,4037$)). Im Gegensatz dazu zeigt sich nach Zymosan-Stimulation eine signifikante Reduktion der TNF-Produktion in Nachkommen postseptischer Tiere (Sham: 6.357 pg/ml, CLP: 4.182 pg/ml ($p = 0,0083$)) (Abbildung 44B).

Aufgrund der Ergebnisse der Lungenlavage wurden die Expression der entsprechenden Rezeptoren von Lungengewebe männlicher Nachkommen mittels PCR analysiert (Abbildung 45). Die relative Genexpression (RGE) des LPS-Rezeptors Tlr4 ist sowohl in Sham- als auch CLP-Nachkommen unverändert (Sham: $0,138 \pm 0,0180$, CLP: $0,153 \pm 0,0141$ ($p = 0,5054$)) (Abbildung 45A). Auch die beiden Zymosan Rezeptoren Tlr2 (Sham: $0,058 \pm 0,0058$, CLP: $0,063 \pm 0,0081$ ($p = 0,6647$)) und Dectin-1 (Clec7a) (CLP: $0,054 \pm 0,0092$, Sham: $0,045 \pm 0,0052$ ($p = 0,3760$)) zeigen keinen Unterschied in ihrer Genexpression (Abbildung 45B und C).

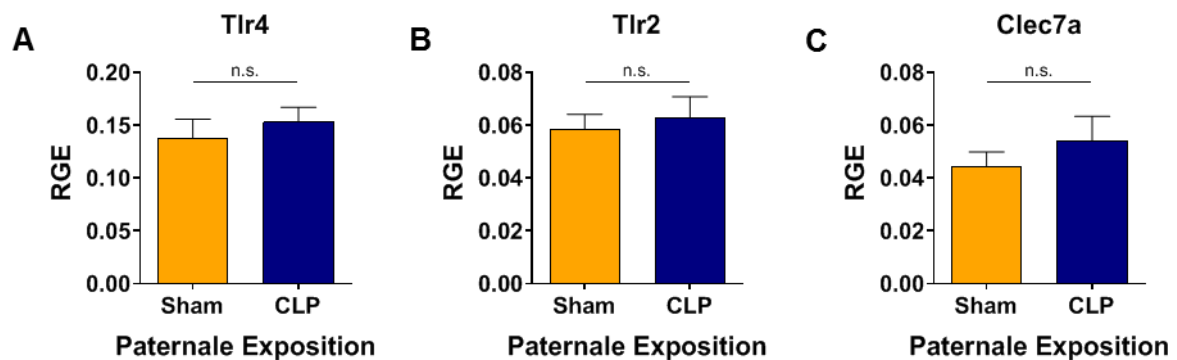


Abbildung 45: Genexpression proinflammatorischer Zytokine im Lungengewebe männlicher Nachkommen. A) Tlr4, B) Tlr2 und C) Clec7a. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. $n = 12$ pro Kondition.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse einen deutlichen Einfluss einer paternalen Sepsis sowohl auf die systemische, als auch auf die organspezifische Immunfunktion der Nachkommen. Dabei ist diese Immundysfunktion exklusiv in männlichen Nachkommen zu beobachten.

4. Diskussion

4.1. Sepsis induziert einen Status der trainierten Immunität in naiven Monozyten des Knochenmarks

Die Sepsis ist ein heterogenes Syndrom, beginnend mit einer überschießenden proinflammatorischen Immunreaktion nach einem bakteriellen, viralen oder fungalen Insult, resultierend in einem Organversagen. Um mögliche Schäden durch diese massive Hyperinflammation einzudämmen, induziert der Organismus gleichzeitig eine antiinflammatorische Gegenreaktion. Diese antiinflammatorische Kondition überwiegt in der späten Phase des Syndroms und führt zu einer Sepsis-induzierten Immunsuppression. Dieser Zustand kann auch noch Jahre nach dem septischen Insult persistieren und ist gekennzeichnet durch die Anfälligkeit der Patienten für sekundäre Infektionen, einhergehend mit einer gesteigerten Mortalitätsrate. Die genauen immunologischen Konsequenzen einer überstandenen Sepsis auf Zellen des angeborenen Immunsystems, besonders auf naive Monozyten, sind nicht bekannt und wurden im Rahmen dieser Arbeit in einem klinisch relevanten Zeitrahmen evaluiert.

Die Untersuchung der postseptischen Konditionen erfolgte sechs und zwölf Wochen nach einer Sepsis-Induktion mittels CLP in männlichen C57/BL6 Mäusen. Die erste Auffälligkeit nach Eröffnen der Tiere war die persistierende Splenomegalie zu beiden Zeitpunkten. Eine solche Splenomegalie entsteht typischerweise durch eine Expansion von Immunzellpopulationen während akuter und chronischer Entzündungsprozesse. Dies impliziert das Vorhandensein persistierender immunologischer Prozesse in der Milz

Die Sepsis ist charakterisiert durch den apoptotischen Zelluntergang der verschiedenen Immunzellpopulationen (B-Zellen, T-Zellen, DCs) (Hotchkiss et al., 2013a). Davon ist auch die Milz, das größte sekundäre Immunorgan im Organismus, betroffen. Um zu untersuchen, welche Immunzellpopulationen genau in den Milzen der postseptischen Tiere verändert sind, erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse von Zellen der adaptiven, sowie der angeborenen Immunantwort.

Die Daten dieser Arbeit demonstrieren eine anhaltende Reduktion der B-Zellen, sowohl sechs als auch zwölf Wochen nach dem septischen Insult. B-Zellen sind unter anderem verantwortlich für die Produktion spezifischer humoraler Antikörper. Somit impliziert die verminderte Frequenz der B-Zellen die Aufrechterhaltung eines immunsuppressiven Status in der Milz postseptischer Mäuse.

Die Population der T-Zellen ist weder nach sechs, noch nach zwölf Wochen in den postseptischen Milzen verändert. Dies deutet auf eine Rückkehr der T-Zell-Frequenzen zur Homöostase hin. Ammer-Herrmenau et al. beschreiben dasselbe Phänomen in einem „Peritoneal Contamination and Infection“ (PCI) Modell. Dort wurden die Frequenzen der T-Zellen der Milz der postseptischen Mäuse bis zu dreieinhalb Monaten nach dem Insult untersucht. Ab Tag 28 konnte kein Unterschied mehr in den T-Zellpopulationen beobachtet werden (Ammer-Herrmenau et al., 2019).

Ähnliche Ergebnisse lieferte die Untersuchung der T-Zell-Subpopulationen der CD4⁺-T-Helfer-Zellen und der CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen. Beide Populationen zeigen keinen Unterschied in ihrer Frequenz zwischen postseptischen- und Kontrolltieren sechs und zwölf Wochen nach Insult. Dieses Phänomen wurde sowohl in einem CLP Modell (Condotta et al., 2013), als auch in einem PCI-Modell (Ammer-Herrmenau et al., 2019) in der Literatur beschrieben. In beiden Sepsis-Modellen sinken die Zellzahlen beider T-Zell-Subtypen an Tag 3 nach Sepsis-Induktion signifikant ab und erreichen nach etwa einer Woche wieder das basale Niveau. Die Funktionalität der Zellen wurde in dieser Arbeit nicht analysiert, jedoch beschreiben Danahy et al. eine erhöhte Tumormast gefördert durch eine reduzierte Einwanderung von CD8⁺-T-Zellen in das Tumorgewebe in einem humanem Melanom-Modell induziert in Mäusen zehn Tage nach CLP (Danahy et al., 2019). Diese Daten unterstützen die Hypothese funktional eingeschränkter T-Lymphozyten im postseptischen Milieu, unabhängig von den Frequenzen der T-Zellen.

Regulatorische T-Zellen sind mit einer Immunsuppression assoziiert und auch an der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz beteiligt (Sun et al., 2010). Cavassani et al. beschreiben eine Erhöhung der regulatorischen Milz-T-Zellen mit höherer repressiver Funktionalität in der postseptischen Umgebung bereits 15 Tage nach CLP bei Mäusen. Diese Expansion ist auf eine durch dendritische Zellen vermittelte Umwandlung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen zurückzuführen (Cavassani et al., 2010). Interessanterweise zeigen die Daten dieser Studie einen Rückgang der regulatorischen T-Zellen in postseptischen Mäusen nach sechs Wochen. Nach zwölf Wochen kann ein erneuter Anstieg der Frequenz regulatorischer T-Zellen in den postseptischen Milzen beobachtet werden. Wie es zu solch einem Effekt kommt, ist unklar. Jedoch beschreiben Hotchkiss et al. ein Sepsis-Modell in dem sich zu hyperinflammatorische und hypoinflammatorische Stadien zyklisch abwechseln (Hotchkiss et al., 2013a). Da es kaum Daten zu dem Immunstatus zu den untersuchten Zeitpunkten gibt, kommt es möglicherweise durch verschiedene anti- und proinflammatorische Interaktionen von Immunzellen zur Ausprägung eines solchen Phänomens.

Neben Zellen der lymphoiden Linie wurden auch die Frequenzen von myeloiden Immunzellen untersucht. Die Frequenzen postseptischer Monozyten in den Milzen waren dabei nach sechs

Wochen tendenziell und nach zwölf Wochen signifikant erhöht. Valdes-Ferrer et al. demonstrierten ebenfalls in einem CLP-Modell das Auftreten einer persistierenden Splenomegalie, sowie erhöhte Monozyten Frequenzen zehn Tage post-CLP. Kontrovers zu den Daten dieser Arbeit beschreibt die Arbeitsgruppe eine Abnahme der Monozytenzellzahl über den zeitlichen Verlauf bis hin zu einer Rückkehr zur Homöostase nach zwölf Wochen (Valdes-Ferrer et al., 2013). Eine mögliche Ursache für diese Ergebnisse könnte die Verwendung unterschiedlicher Mauslinien sein: Valdes-Ferrer et al. nutzten Th2-lastige Balb/c Mäuse, während in dieser Studie Th1-lastige C67BL/6 Mäuse eingesetzt wurden (Watanabe et al., 2004, Trunova et al., 2011). Eine weitere Ursache für diesen Effekt kann auch der Schweregrad des Modells darstellen. Valdes-Ferrer et al. induzierten eine CLP mit einer Mortalität von 50 %, wohingegen die Mortalität des in dieser Arbeit verwendeten CLP-Modells bei 30 – 40 % lag.

Die Frequenzen der Subpopulation der inflammatorischen Monozyten sind dabei erhöht, wohingegen die antiinflammatorische Subpopulation erniedrigt ist. Dies impliziert einen vorwiegend inflammatorischen Status der postseptischen Monozyten der Milz.

Einhergehend mit diesen Ergebnissen sind auch die Frequenzen der Makrophagenpopulation nach sechs Wochen tendenziell und nach zwölf Wochen signifikant erhöht. Ein bedeutsamer Unterschied in den Subpopulationen ist dabei nicht erkennbar. Die Frequenzen dendritischer Zellen in postseptischen Mäusen sind unverändert, was auf eine Rückkehr dieser Zellpopulation zur Homöostase hindeutet.

Das in dieser Arbeit demonstrierte gleichzeitige Auftreten erhöhter Frequenzen von proinflammatorisch geprägten Zellen der myeloiden Linie, aber auch von immunsuppressiven Zuständen der lymphoiden Zellen, impliziert eine kompartimentierte und zellvermittelte Gegenregulation der angeborenen Immunität in der Milz.

Um zu untersuchen, ob ein solcher Effekt nicht nur organspezifisch, sondern auch systemisch nachweisbar ist, erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse zirkulierender Leukozyten im Vollblut. Dabei ergaben sich lediglich marginale Änderungen in der Häufigkeit der untersuchten Populationen der regulatorische T-Zellen und Monozyten. Die regulatorischen T-Zellen zeigen eine tendenzielle Erhöhung in ihrer Frequenz, was in Richtung der in der Literatur beschriebenen vorliegenden Immunsuppression hindeutet. Auch die Monozytenpopulation zeigt einen Trend in Richtung gesteigerter Frequenzen in den postseptischen Tieren. Dabei sind die Subpopulationen der inflammatorischen Monozyten tendenziell verringert, wohingegen die antiinflammatorischen Monozyten marginal erhöht sind. Nach Freisetzung aus dem Knochenmark erfolgt in der Homöostase eine Umwandlung inflammatorischer Monozyten zu alternativen, patrouillierenden Monozyten innerhalb eines Tages (Yona et al., 2013). Möglicherweise induziert eine Sepsis eine schnellere Konversionsrate oder eine längere Halbwertszeit alternativer Monozyten. Die Arbeitsgruppe

von Yona et al. beschreiben in diesem Zusammenhang eine Verlängerung der Halbwertszeit alternativer Monozyten von zwei auf elf Tage in Abwesenheit bzw. Reduktion inflammatorischer Monozyten, was eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse dieser Arbeit darstellt (Yona et al., 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls die Funktionalität der zirkulierenden Blutleukozyten durch eine Stimulation des Vollblutes mit LPS getestet. Die Daten zeigen dabei keine Unterschiede in der Ausschüttung der proinflammatorischen Cytokine TNF und IL-6. Blut ist eine heterogene Körperflüssigkeit, bestehend aus Blutplasma und Blutzellen. Die verschiedenen Immunzelltypen stehen dabei stetig in komplexen Wechselwirkungen. Ein eindeutiger Rückschluss auf die Funktionsfähigkeit eines einzelnen Zelltyps ist somit nicht möglich. Shalova et al. beschrieben jedoch die Rückkehr humaner Blutmonozyten zurück zu einer basalen Genexpression drei Monate nach der Genesung von einer Sepsis (Shalova et al., 2015). Solch ein peripherer Phänotyp kann durchaus auch im Tiermodell auftreten. Dies bedarf allerdings weiterer Analysen.

Alle blutbildenden Zellen des adulten Organismus entstehen während des Prozess der Hämatopoese im Knochenmark. Im Falle einer Infektion oder Inflammation ist das System in der Lage auf den Stimulus zu reagieren und den erhöhten Bedarf an Immunzellen zu decken. Da die Untersuchung des Vollblutes keinerlei Hinweise auf eine Änderung in der systemischen Immunlage der postseptischen Tiere ergab, und die Sepsis als suppressiver Einflussfaktor auf die Hämatopoese beschrieben wird, lag es im Interesse eine Stufe tiefer zu gehen und die hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zu analysieren. Verschiedene Studien beschreiben dabei Sepsis-induzierte Veränderungen in der Myelopoese, die in einer Myelosuppression resultieren (Rodriguez et al., 2009, Zhang et al., 2016). Kontrovers zu diesen Daten zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine gesteigerte Myelopoese in zwölf Wochen postseptischen Mäusen. Dies begründet sich zum einen in dem massiven Anstieg der Frequenzen von Granulozyten-Monozyten-Vorläufern (GMPs), aber zum anderen auch die marginal erhöhten Frequenzen von multipotenten Vorläuferzellen (MPPs), sowie der geringfügige Rückgang der ST-HSC Population deuten darauf hin. Diese im Vergleich zur Literatur divergierenden Ergebnisse lassen sich auf die verschiedenen Zeitpunkte der Datenerhebung zurückzuführen. Die HSPC-Populationen beider Studien, sowohl Rodriguez et al., als auch Zhang et al., wurden bereits 24 Stunden nach dem septischen Insult analysiert. Zu diesem frühen Zeitpunkt können durchaus noch kompensatorische Mechanismen präsent sein, um der initialen Antworten entgegenzuwirken. Im Vergleich zu diesen Studien wurde für die Analyse der HSPCs in der vorliegenden Arbeit ein Zeitraum von zwölf Wochen post-Sepsis gewählt. Die Daten dieser Arbeit demonstrieren somit eine Umstellung von einer Myelosuppression hin zu einer verstärkten Myelopoese über einen längeren Zeitraum. Eine

mögliche Ursache hierfür könnte ein adaptiver Mechanismus nach der Beseitigung des akuten inflammatorischen Tonus des Systems darstellen.

Interessanterweise konnte in einer neueren Studie um die Arbeitsgruppe von Mitroulis et al. ebenfalls eine gesteigerte Myelopoese im Zusammenhang mit dem Auftreten einer trainierten Immunität aufgezeigt werden. Nach Stimulation der Versuchstiere mit dem *Candida albicans* Zellwandkomponent β -Glucan, dem archetypischen Modell der trainierten Immunität, kam es nach 24 Stunden zu einer Erhöhung der MPP-Population und zu einer Reduzierung der ST-HSCs. Dieser Effekt konnte nach 28 Tagen nicht mehr beobachtet werden, jedoch war die Population der GMPs weiterhin signifikant erhöht (Mitroulis et al., 2018). Diese Resultate sind analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Solche Effekte können auch ernährungsbedingt durch eine Veränderung des Darmmikrobioms induziert werden (Christ et al., 2018). In Hinblick auf das in dieser Arbeit eingesetzte polymikrobielle Sepsis-Modell könnte eine gesteigerte Myelopoese im Zusammenhang mit einer trainierten Immunität der Monozyten ebenfalls durch eine veränderte Zusammensetzung der Darmflora induziert werden. Durch den Fäzes, der während der CLP in den Bauchraum gelangt, können z.B. Pilze aus dem gastrointestinalen Raum in den Blutkreislauf gelangen und die beobachteten Effekte auslösen.

Als Hauptcharakteristika der trainierten Immunität gilt die gesteigerte Reaktivität von angeborenen Immunzellen nach einem zweiten Stimulus. Aufgrund der erhöhten Myelopoese in den postseptischen Tieren richtete sich der Fokus für die weiteren Analysen auf naive Monozyten aus dem Knochenmark. Diese wurden isoliert, erhielten einen zweiten Stimulus mit LPS und die Zytokinexpression wurde gemessen. In der Tat kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6 in Knochenmarkmonozyten postseptischer Mäuse nach LPS-Stimulation. Diese funktionalen Ergebnisse implizieren die Induktion eines persistierenden Status der trainierten Immunität durch eine überstandene Sepsis im Knochenmark, analog zu dem in der Literatur beschriebenen β -Glucan (Quintin et al., 2012).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal der trainierten Immunität ist der sogenannte „Warburg Effekt“, auch als aerobe Glykolyse bezeichnet. Dabei kommt es zu einer Verschiebung des respiratorischen Metabolismus zu einer verstärkten Glykolyse bei gleichzeitiger Reduzierung der oxidativen Phosphorylierung (Netea, 2013, Dominguez-Andres and Netea, 2018).

In Übereinstimmung mit dem Effekt der gesteigerten Reaktivität zeigen postseptische Monozyten aus dem Knochenmark eine signifikant erhöhte basale Glykolyse. Eine Änderung in der mitochondrialen Atmung dieser Zellen konnte jedoch nicht gefunden werden. Eine Ursache hierfür ist, dass die Analyse des Zellmetabolismus der Monozyten durchgeführt wurden, bevor ein zweiter Stimulus erfolgte, wohingegen die in metabolischen Studien der trainierten Immunität beschriebenen Monozyten regulär nach dem zweiten Stimulus analysiert wurden. Der zweite Stimulus scheint notwendig zu sein, um eine vollständige Umstellung des

Metabolismus zur aeroben Glykolyse zu induzieren. Nichtsdestotrotz kann hier ein „Priming“ naiver Monozyten zur erhöhten Glykolyse aufgezeigt werden.

Mechanistisch unterliegt dieses Phänomen unter anderem der Hochregulation der Genexpression von an der Glykolyse beteiligter Enzyme. Aber auch Gene die in den mTOR (mammalian target of rapamycin) Signalweg, ein Hauptsignalweg des Glucosemetabolismus, involviert sind, werden in der Literatur als verstärkt exprimiert beschrieben (Cheng et al., 2014a, Arts et al., 2016b, Mitroulis et al., 2018, Bekkering et al., 2018). Zur Untersuchung der Genexpression postseptischer Monozyten aus dem Knochenmark wurde eine genomweite RNA-Seq Analyse durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen unterschiedliche Expressionsmuster von Genen die an metabolischen Prozessen beteiligt sind. Ein Beispiel dafür ist das Gen, das für Ribulosephosphat-3-Epimerase (RPE) kodiert. Dieses ist in den postseptischen Monozyten herunterreguliert. Die RPE ist an der Regulierung des nichtoxidativen Zweigs des Pentose-Phosphat-Weges (PPP) beteiligt. Dabei katalysiert sie das im PPP generierte Ribulose-5-phosphat zu Xylose-5-phosphat und Erythrose-4-phosphat. Xylose-5-phosphat wird anschließend weiter zu Glycerinaldehyd-3-phosphat oder Fructose-6-phosphat katalysiert und kann so wieder in die Glykolyse eingebracht werden. Die Arbeitsgruppe von Arts et al. (Arts et al., 2016b) demonstrierten durch NMR-Experimente mit ¹³C-markierter Glucose, dass der nichtoxidative Zweig des PPP in trainierten Immunzellen inaktiv ist. Dadurch kommt es verstärkt zu einer Umstellung des PPP in Richtung Purinmetabolismus. Der Purinmetabolismus ist in trainierten Immunzellen erhöht, um den gesteigerten Bedarf an Nukleotiden, hervorgerufen durch eine verstärkte Transkription, zu decken (Arts et al., 2016a, Arts et al., 2016b). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist die in dieser Arbeit gezeigte Herabregulation von Rpe.

Ein weiteres Gen, das in postseptischen Knochenmarkmonozyten herabreguliert ist, ist Nme7. Nme7 ist in den Purinmetabolismus involviert und katalysiert dort den Phosphattransfer von Nukleosidtriphosphaten zu Nukleosiddiphosphaten und umgekehrt. Aber auch Gene, die am Purin Katabolismus beteiligt sind, werden unterschiedlich exprimiert. Beispielsweise zeigen die RNA-Seq Ergebnisse eine Hochregulierung der Gene in postseptischen Monozyten des Knochenmarks, die für die Enzyme Guanin-Deaminase (GDA) und Xanthin-Dehydrogenase (XDH) kodieren. Beide Enzyme sind für den Abbau von Guanin oder Hypoxanthin zu Xanthin und weiter zum Urat zuständig. Dies scheint zunächst kontrovers. Berücksichtigt man allerdings, dass in dieser Studie unstimulierte Zellen untersucht wurden, kann daraus geschlossen werden, dass kein akuter Bedarf für eine verstärkte Purinsynthese besteht. Über diese Genexpressionsänderung kann eine Überproduktion, die aus der Inhibierung des nicht-oxidativen PPP-Zweigs resultiert, kompensiert werden. Jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu prüfen, ob postseptische naive Monozyten nach einem

zweiten immunologischen Stimulus tatsächlich vom Purinkatabolismus zum Anabolismus wechseln.

Neben der Glykolyse spielt auch die Glutaminolyse eine bedeutsame Rolle in der Induktion der trainierten Immunität. Während dieses Prozesses wird Glutamin über Glutamat in α -Ketoglutarat umgewandelt, einem anaplerotischem Substrat des Citratzyklus. Das vermehrt produzierte Glutamin geht in den Citratzyklus ein und erhöht dort die Citratzyklusmetabolite Succinat oder Fumarat (Tannahill et al., 2013, Arts et al., 2016b). Beide Metabolite spielen eine wesentliche Rolle in der trainierten Immunität. Fumarat und Succinat fungieren als Antagonisten für Histon- und DNA-Demethylasen. Die Folge sind Modulationen epigenetischer Modifikationen an Genpromotoren proinflammatorischer Zytokine und damit eine damit verbundene Steigerung derer Transkription (Xiao et al., 2012, Arts et al., 2016b). Glutamat wird ebenfalls für die Produktion von AcetylCoA verwendet, einem Substrat von Histonacetyltransferasen. Histonacetyltransferasen sind mit einer Aktivierung von Promotoren in trainierten Monozyten assoziiert (Saeed et al., 2014, Choudhary et al., 2014). Des Weiteren ist Glutamin an der Cholesterol- und Fettsäurensynthese beteiligt. Beide Stoffwechselwege sind in der trainierten Immunität erhöht (Saeed et al., 2014). Eine transkriptionelle Veränderung im direkten Zusammenhang mit der Glutaminolyse konnte in dieser Arbeit nicht aufgezeigt werden. Allerdings ist das Gen für das Enzym Histidin-Deaminase (HAL) in postseptischen Knochenmarkmonozyten hochreguliert. Dieses Enzym ist am Abbau von Histidin über Urocansäure zu Glutamat beteiligt (Luu et al., 2017) und könnte als mögliche Quelle für Glutamat nach einem zweiten Insult dienen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, den die Daten dieser Arbeit im Zusammenhang mit einem Status der trainierten Immunität postseptischer Knochenmarkmonozyten liefern, ist die verstärkte Expression immunregulatorischer Gene. Eines dieser hochregulierten Gene kodiert für das myeloide Differenzierungsprotein 88 (MyD88). MyD88 ist eines der wichtigsten Adapterproteine im Downstream-Signaling der meisten Toll-like-Rezeptoren. MyD88 aktiviert den Transkriptionsfaktor NF κ B und führt zu einer Induktion der Gentranskription proinflammatorischer Zytokine (Andreacos et al., 2004, Warner and Núñez, 2013). Neben MyD88 zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit auch eine Hochregulation der Genexpression der Janus-Kinase 3 (Jak3). Die Jak3 zählt zum „Janus kinase/signal transducer and activator of transcription“ (JAK / STAT) Signalweg, welcher unter anderem im „downstream-signaling“ des IL6-Rezeptors verschiedene zelluläre Reaktionen vermittelt. Daneben ist der JAK/STAT-Signalweg auch in die Hämatopoese und somit auch in die Entwicklung von Immunzellen involviert (Harrison, 2012, Coskun et al., 2013, Villarino et al., 2017). Somit sind die Monozyten durch eine Hochregulierung dieser Gene bereits vor dem zweiten Stimulus in der Lage, nach Erhalt des Stimulus schneller zu reagieren und in einer Verstärkten TNF- und IL-6-Ausschüttung zu führen, wie die Daten dieser Arbeit aufzeigen.

Die in dieser Arbeit demonstrierten Ergebnisse decken sich nicht mit der bisherigen Hypothese einer Immunsuppression postseptischer Immunzellen, einhergehend mit einer gesteigerten Anfälligkeit für sekundäre Infektionen. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten dieses Konzept unter der Verwendung sogenannter „Double-Hit“-Modelle in Tierstudien. Charakteristisch für diese Modelle ist die Kombination einer anfänglichen CLP (oder Pneumonie) gefolgt von einem zweiten Stimulus durch eine Infektion mit Bakterien (z. B. *P. aeruginosa* oder *S. pneumoniae*) oder Viren (Respiratorisches Syncytial-Virus). Allerdings erfolgte die Untersuchung der Tiere nach einem zweiten Stimulus in den meisten Studien nur wenige Stunden oder Tage nach dem Insult (Muenzer et al., 2006, Nascimento et al., 2010, Mukherjee et al., 2012, Roquilly et al., 2017). Einzig Nascimento et al. demonstrierten dabei eine verstärkte Anfälligkeit der Tiere für nosokomiale Infektionen bis zu 30 Tagen nach dem Insult (Nascimento et al., 2010). Die Studie dieser Arbeit liegt damit in Bezug auf den gewählten Zeitrahmen der klinischen Realität deutlich näher. Des Weiteren ist der Fokus einiger dieser Studien lokal auf die Lunge begrenzt. Dabei führt die Induktion einer sekundären Pneumonie zu einer organspezifischen Immuntoleranz, u.a. induziert durch TGF- β und der Anhäufung regulatorischer T-Zellen (Muenzer et al., 2006, Nascimento et al., 2010, Mukherjee et al., 2012, Roquilly et al., 2017). Roquilly et al. zeigen diesen Effekt in ihrem Pneumonie/Pneumonie-Double-Hit-Modell in dendritischen Zellen des Knochenmarks und Makrophagen (Roquilly et al., 2017). In Hinblick auf die Beurteilung persistierender Langzeitfolgen der Sepsis ist es notwendig solche Experimente zu späteren Zeitpunkten zu wiederholen, um zu bewerten, wie lange diese Mechanismen nach dem Insult noch anhalten. Möglicherweise führen diese Prozesse zu einer Dämpfung der trainierten Monozyten im Organ, was mit den Daten dieser Arbeit bezüglich der funktionell unveränderten zirkulierenden Immunzellen des Blutes korreliert.

Wie bereits erwähnt widersprechen die Daten eines trainierten Phänotyps der aktuellen Hypothese einer globalen postseptischen Immunsuppression auf Zellebene, ergänzen jedoch den aktuellen Wissensstand über die langfristigen und komplexen Auswirkungen systemischer Erkrankungen. Diese Studie ist die erste, die die Auswirkungen einer Sepsis auf die Immunfunktion drei Monate nach dem Insult untersucht und entspricht daher einem klinisch relevanten Zeitrahmen nach Entlassung von der Intensivstation. Eine mögliche Hypothese für diesen Effekt ist, dass der Organismus nach einem frühen Status der Toleranz, wie bereits ausführlich nachgewiesen, versucht diesen Zustand zu kompensieren. Durch die Aneignung eines trainierten Phänotyps mit erhöhter Myelopoese und entsprechenden Zelladaptation mündet dies langfristig in einer potenziell günstigen Anpassung der angeborenen Immunität.

4.2. Sepsis führt zu einem genetischen Imprinting der männlichen Keimbahn und induziert Immunsuppression in den Nachkommen

Nachdem die Daten dieser Arbeit einen solch fulminanten Effekt einer überstandenen Sepsis auf die Zellen des Immunsystems demonstrieren, kam die Hypothese auf, dass womöglich auch andere Zellen, wie zum Beispiel Keimzellen, durch einen septischen Insult moduliert werden. Der Fokus sollte dabei auf die männlichen Keimzellen, die Spermien, gerichtet werden.

Neuesten Studien zeigen, dass paternale Lebensgewohnheiten, wie z.B. eine fettreiche, proteinarme oder folatararme Ernährungsform (Carone et al., 2010, Lambrot et al., 2013, de Castro Barbosa et al., 2016), aber auch externe Umweltbedingungen, wie z.B. der Kontakt zu verschiedenen Toxikantien (Beck et al., 2017, Skinner et al., 2018), Einfluss auf das paternale Keimbahnepigenom nehmen und eine damit einhergehende Veränderung des Phänotyps in den Nachkommen induzieren. Die genauen Mechanismen der epigenetischen Vererbung über die männliche Keimbahn sind noch nicht aufgeklärt. Die Beteiligung der Histon-zu-Protamin Transition während der Spermato-genese, sowie die globale Entfernung von DNA-Methylierungen nach der Befruchtung werden dabei postuliert (Heard and Martienssen, 2014).

Um die Hypothese in Bezug auf die Sepsis zu überprüfen, wurden männliche Mäuse einer CLP unterzogen. Sechs Wochen nach dem Insult erfolgte die Erstellung eines Spermio-gramms, indem Zellzahl, Motilität und Morphologie der Zellen beurteilt wurden. Interessanterweise zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine deutliche Zunahme der Spermienanzahl, einhergehend mit einer deutlichen Erhöhung einer aberranten Morphologie der Zellen postseptischer Mäuse. Gleichzeitig ist der prozentuale Anteil immotiler Spermien geringfügig erhöht. Diese Ergebnisse stimmen mit den publizierten Daten von Kajihara et al. überein. Die Arbeitsgruppe induzierte unter Verwendung von bakteriellen LPS eine testikuläre Dysfunktion in Mäusen. In der ersten Woche kam es zu einer drastischen Apoptose der Spermien, einhergehend mit einer reduzierten Motilität. Ab diesem Zeitpunkt zeigte sich eine deutliche Steigerung der Spermienproduktion, sowie der Motilität, die ihren Höhepunkt drei Wochen nach dem Insult erreichte. Sowohl die Zellzahlen, als auch die Anzahl motiler Spermien lagen zu diesem Zeitpunkt deutlich über den Werten der Kontrolltiere.

Nach fünf Wochen war die Spermienzahl weiterhin signifikant erhöht, wohingegen die Motilität der Zellen wieder auf die Werte der Kontrolltiere sank (Kajihara et al., 2006). Aufgrund dieser Daten und der Tatsache, dass in der hier vorliegenden Studie kein Unterschied in der Reproduktivität zwischen CLP und Sham-Mäusen festgestellt werden konnte, kann der

rasante Anstieg der Spermienzahl darauf hindeuten, dass hier ein kompensatorischer Mechanismus vorliegt.

Defekte Spermien werden mit dem Auftreten einer männlichen Infertilität in Verbindung gebracht. Mehrere Studien belegen die Beteiligung epigenetischer Mechanismen, wie die Änderung des DNA-Methylierungsprofils während der Entwicklung der Spermien. So können z.B. altersbedingte Veränderungen der DNA-Methylierung in Genloci auftreten, die mit Krankheiten assoziiert sind und auf die Nachkommen übertragen werden (Jenkins et al., 2014, Santi et al., 2017). Um den Einfluss einer überstandenen Sepsis auf das Spermien-Methylom zu prüfen, erfolgte eine RRBS Analyse. Die Daten dieser Arbeit zeigen tatsächlich genomweite Änderungen von Hypo- und Hypermethylierungen von Cytosinresten. Dies indiziert, dass die DNA-Methylierung ein potentieller Überträger von Sepsis-induzierten veränderten Informationen zwischen den Generationen darstellt. Mechanistisch könnte hier ein „Entfliehen“ methylierter Cytosine der TET-gesteuerten Demethylierung während der Spermatogenese verantwortlich sein (Guibert et al., 2012, Hackett et al., 2013). Des Weiteren wird die Übertragung der durch eine Sepsis erworbenen Veränderungen möglicherweise in den Spermatogonien etabliert und durch die Meiose in das reife Spermienmethylom transferiert. Die Information wird anschließend in die Zygote übertragen und dominiert dort sogar über das maternale Methylom, wie frühere Studien in Zebrafischen belegen (Jiang et al., 2013, Potok et al., 2013). Dieser Mechanismus wird möglicherweise durch die Histone des Chromatingerüsts unterstützt (Murphy et al., 2018). Solche Änderungen im Methylom des frühen Embryos können nun in alle sich entwickelnden Zellen und Gewebe übertragen werden, einschließlich der Zellen des Immunsystems.

Der für diese Studie gewählte Zeitraum von sechs Wochen zwischen dem septischen Insult und der Analyse der Spermien umspannt den Zeitraum eines Zyklus der Spermiogenese (35 Tage) (Oakberg, 1956). Ein möglicher direkter Einfluss der systemischen Inflammation oder immunmodulierenden Mediatoren auf die Spermien kann somit in dieser Studie exkludiert werden.

Neben dem direkten Einfluss eines Insults auf die Spermatogenese können auch Veränderungen im Hodenmilieu die Entwicklung der Spermien beeinflussen. Dabei spielen proinflammatorische Zytokine eine wesentliche Rolle. Diese können auch von nicht-Immunzellen produziert werden, um die Spermatogenese zu stimulieren und aufrechtzuerhalten. Sowohl Sertoli-Zellen als auch die Leydig-Zellen können zu einer verstärkten Sekretion von IL-1 α und IL-6 angeregt werden, z.B. induziert durch eine Stimulation mit LPS. Beide Zytokine beeinflussen direkt die Spermatogenese (Hedger and Meinhardt, 2003, Loveland et al., 2017). Dabei ist eine erhöhte testikuläre IL-6-Konzentration in adipösen Mäusen mit einer eingeschränkten Spermatogenese assoziiert (Huang et al., 2016). In dieser Studie ist die testikuläre Genexpression von Il6 in postseptischen Mäusen

signifikant reduziert, einhergehend mit einer marginal verringerten $Il1\alpha$ Genexpression. Diese reduzierte testikuläre Produktion der beiden Zytokine könnte die in dieser Studie beobachtete verstärkte Spermatogenese erklären und somit mit den erhöhten Zellzahlen im Spermogramm korrelieren. Das proinflammatorische Zytokin TNF wird im Hoden von Spermatogonien produziert und reguliert ebenfalls die Sertoli-Zell-Funktion. Des Weiteren spielt TNF eine bedeutende Rolle in der Regulation der Apoptose von Spermien (Hedger and Meinhardt, 2003, Loveland et al., 2017). Pentikainen et al. zeigen, dass eine verstärkte TNF-Konzentration mit einer reduzierten Apoptose humaner Keimzellen korreliert (Pentikainen et al., 2001). Die marginale Erhöhung der testikulären Tnf Genexpression könnte auf einen ähnlichen Mechanismus hindeuten und somit ebenfalls eine Erklärung für die erhöhte Anzahl an Spermien postseptischer Tiere darstellen.

Die Auswirkungen solcher Sepsis-induzierter Veränderungen in der Keimbahn zeigen sich bereits im frühen postnatalen Stadium der Nachkommen durch eine signifikant gesteigerte postnatale Sterblichkeit im Vergleich zu den Nachkommen der Kontrolltiere. Neben entwicklungsbedingten und genetischen Ursachen könnte auch unterlassene mütterliche Fürsorge zu diesem Ergebnis beitragen. Möglicherweise werden die Säuglinge aufgrund ihres schlechten Gesundheitsstatus von den Müttern abgestoßen oder die Mutter entwickelt ein aggressives Verhalten gegenüber den Säuglingen.

Der weitere Verlauf der Entwicklung nach der Absetzung ist geprägt durch eine deutliche Zunahme einer Gewichtsdivergenz zwischen den Nachkommen von Sepsis-Vätern und Kontroll-Vätern ab dem Zeitpunkt der Pubertät (Tag 8 nach Absetzung). Die Nachkommen der postseptischen Mäuse sind dabei deutlich leichter. Dieses Ergebnis unterstützt die Theorie Sepsis-induzierter entwicklungs-genetischer Veränderungen, die über die männliche Keimbahn übertragen werden. In diesem Zusammenhang zeigen die Daten dieser Arbeit Methylierungsänderungen von Cytosinen in intronischen und Promotor-Regionen entwicklungs-relevanter Gene. Daneben sind auch Cytosine in den Promotorbereichen und Exons von Genen, die in den Metabolismus involviert sind, unterschiedlich methyliert. Die Arbeitsgruppe von Radford et al. demonstrierten in einer neueren Studie den intergenerationalen Einfluss subtiler Änderungen im Spermienmethylom auf die metabolische Funktion der Nachkommen in einem Modell der Mangelernährung während der Schwangerschaft (Radford et al., 2014). Aufgrund einer krankheitsbedingten geringeren Nahrungsaufnahme der CLP-Mäuse litten die Tiere in der akuten Phase der Sepsis vorübergehend an einem beträchtlichen Gewichtsverlust. Dieser Zustand wurde durch den hohen Stoffwechselbedarf des aktivierten Immunsystems verstärkt und kann analog zu den Daten von Radford et al. als eine mögliche Ursache für das niedrigere Gewicht der postseptischen Nachkommen in Betracht gezogen werden.

Neben der Studie von Radford et. al. existieren noch weitere Studien, die über eine Über- oder Mangelernährung der Eltern als genetische Ursache für inter- und transgenerationale vererbte Effekte berichten. Auch in diesen Studien ist das Resultat ein veränderter Stoffwechsel, einhergehend mit einem verringerten Körpergewicht der Nachkommen (Carone et al., 2010, Fullston et al., 2013, Grandjean et al., 2015, Huypens et al., 2016, Cropley et al., 2016).

Alternativ dazu belegen mehrere Studien die generationsübergreifende Vererbung von Umweltstress, wie z.B. Lärm (Morgan and Bale, 2011, Crews et al., 2012, Rodgers et al., 2013). Eine Sepsis, die einem solch enormen Stresszustand ähnelt, kann ebenfalls zu einer übermäßigen Aktivierung der neuroendokrinen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse führen (Lesur et al., 2010, Rodgers et al., 2013) und dadurch die Stressreaktionsschwelle der Nachkommen adaptiv senken. Die Folge wäre eine Erhöhung des basalen Energieverbrauchs und eine dadurch bedingte Verringerung des Körpergewichtes. Neue Erkenntnisse belegen zudem die Bedeutung verschiedener zellulärer Stoffwechselwege als grundlegende Determinanten der Immunzellfunktion bei Sepsis und anderen Erkrankungen (Ganeshan and Chawla, 2014, Cheng et al., 2016).

Der Krankheitsverlauf einer Sepsis ist durch starke immunologische Reaktionen geprägt. Daraus ergab sich die Frage, inwieweit eine paternal durchlebte Sepsis Einfluss auf das Immunsystem der Nachkommen nimmt. Zunächst wurde dazu Vollblut isoliert und entweder mit LPS oder Zymosan stimuliert. Beide Stimulantien haben keinen Effekt auf die TNF-Antwort von Blutleukozyten in den postseptischen Nachkommen. Im nachfolgenden Schritt wurde in den Nachkommen ein inflammatorischer Insult durch die intraperitoneale Gabe von LPS ausgelöst. Interessanterweise zeigen die Daten dieser Stimulation einen Verlust der immunologischen Responsivität in männlichen Nachkommen postseptischer Väter. Dabei ist sowohl die proinflammatorische Zytokinexpression von TNF und IL-6, aber auch die antiinflammatorische Zytokinantwort von IL-10 der Blutleukozyten drastisch reduziert. Diese Ergebnisse implizieren die Beteiligung weiterer systemischer Faktoren, die an der Regulation der Immunantwort der Blutleukozyten involviert sind. Auch können im Falle einer akuten Inflammation Immunzellpopulationen, insbesondere Makrophagen, aus der Milz oder dem Peritoneum rekrutiert werden und an der Regulation der Immunantwort beteiligt sein (Swirski et al., 2009, Wang and Kubes, 2016). Die Untersuchung eines solchen Phänomens war jedoch nicht Gegenstand dieser Studie. Somit können weder funktionelle oder numerische Veränderungen der Immunzellpopulationen in der Bauchhöhle noch im Blutkreislauf als Grund für den beobachteten Phänotyp ausgeschlossen werden.

Interessanterweise ist die Immunantwort nur in den männlichen Nachkommen der Sepsis-Väter vermindert. Weibliche Nachkommen zeigen lediglich in der antiinflammatorischen Antwort eine reduzierte Zytokinausschüttung von IL-10. Dies lässt sich zum einen auf den

bekanntem geschlechtsspezifischen Dimorphismus von Immunantworten zurückführen (Klein and Flanagan, 2016). Zum anderen zeigen beide Geschlechter ein verringertes Körpergewicht. Dies impliziert, dass hier womöglich eine synergistische Wechselwirkung der übertragenen Epimutationen mit dem beschriebenen Dimorphismus vorliegt.

Weitere Studien beschreiben das Auftreten geschlechtsspezifischer Phänotypen in Nachkommen prädispositionierter Väter. Sanchez-Garrido et al. z.B. zeigten einen ausgeprägten Einfluss einer väterlichen Adipositas auf die männlichen Nachkommen, bedingt durch einen hormonellen Synergismus (Sanchez-Garrido et al., 2018). Im Gegensatz dazu demonstrierten Ng et al., dass eine fettreiche Ernährung der Väter zu einer Umprogrammierung der Betazellen der Bauchspeicheldrüse exklusiv in weiblichen Nachkommen führt (Ng et al., 2010). Aufgrund des beobachteten Gewichtsphänotyps der weiblichen Sepsis-Nachkommen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei Anwendung anderer immunologischer Herausforderungen (z. B. Infektions- oder Autoimmunmodelle) auch Änderungen in der Reaktionsfähigkeit und Anfälligkeit auftreten könnten.

Die organspezifischen Daten der Alveolarmakrophagen demonstrieren eine vergleichsweise reduzierte, aber Stimulus-abhängige Immunreaktion auf Zymosan ebenfalls exklusiv in den männlichen Nachkommen postseptischer Mäuse. Diese Beobachtung unterstützt die Theorie der keimbahninduzierten Reprogrammierung auf zellulärer Ebene und impliziert bereits eine Beeinflussung von immunologisch relevanten embryonalen Geweben, wie z.B. der fetalen Leber, während der Entwicklung. Die Mac2-exprimierenden Makrophagen aus der fetalen Leber repräsentieren dabei die Hauptpopulation in den Alveolen erwachsener Mäuse und besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Tan and Krasnow, 2016). So können von vorneherein veränderte Eigenschaften der Makrophagen im adulten Tier aufrechterhalten werden. Alternativ dazu demonstrierten Roquilly et al. die Veränderung der lokalen Mikroumgebung der Lunge nach einer Infektion. Die Folge sind eine durch regulatorische T-Zellen induzierte und TGF- β vermittelte Anergie dendritischer Zellen, aber auch Makrophagen und eine langfristige erhöhte Anfälligkeit für Sekundärinfektionen (Roquilly et al., 2017). Eine intergenerationale Vererbung eines solchen Zustands ist eine mögliche Erklärung für den in dieser Studie ermittelten Phänotyp der Alveolarmakrophagen. Wie dabei jedoch die spezifische Reduktion der proinflammatorischen Antwort auf Zymosan, einem fungalen Zellwandkomponent, jedoch aber nicht auf bakterielles LPS, vermittelt wird, bleibt unklar. Möglicherweise spielt hier auch das Gedächtnis der angeborenen Immunantwort eine Rolle. Kleinnijenhuis et al. demonstrieren, dass eine BCG-Impfung nicht nur eine trainierte Immunität gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* induziert, sondern auch unspezifisch gegen *Candida albicans* und *Staphylococcus aureus* (Kleinnijenhuis et al., 2012). Im Fall dieser Studie würde es sich jedoch um die Etablierung einer Immuntoleranz und nicht einer trainierten Immunität handeln. Ob solche Effekte vererbbar sind, bleibt unklar. Insgesamt deuten diese

Ergebnisse jedoch auf einen prädisponierenden Phänotyp für invasive Pilzinfektionen in den Sepsis-Nachkommen hin.

Um die Frage zu klären, welche Rolle PRRs in der Aufrechterhaltung dieses Phänotyps spielen, erfolgte eine Genexpressionsanalyse der in die LPS- und Zymosan-vermittelten Immunreaktionen involvierten Rezeptoren Tlr4, Tlr2 und Clec7a im Lungengewebe der männlichen Nachkommen. Jedoch konnte hier kein Unterschied ausgemacht werden. Dabei gilt zu berücksichtigen, dass sich Alveolarmakrophagen hauptsächlich im Luftraum der Alveolen befinden und kaum in Lungengewebe selbst (Kopf et al., 2014). Zudem erfolgte hier eine Analyse des gesamten Gewebes und nicht einer spezifischen Zellpopulation. Dadurch können zellspezifische Effekte verschleiert werden.

Die Ergebnisse dieser Studie können letztendlich auf zwei Arten interpretiert werden: Der beobachtete F₁-Phänotyp kann zum einen ein Schutzmechanismus sein, um die Nachkommen vor solch exzessiven inflammatorischen Erfahrungen wie bei den Vätern zu vermeiden, oder ein kompensatorischer maladaptiver Status, der die Nachkommen anfälliger für mikrobielle Erreger macht. Die Daten einer Colitis-Studie von Tschurtschenthaler et al. unterstützt dabei die zweite Theorie. Die Arbeitsgruppe demonstrierte eine erhöhte Anfälligkeit für eine Colitis der Nachkommen von Vätern mit chronischer Colitis, einhergehend mit einem gesteigerten Schweregrad der Erkrankung (Tschurtschenthaler et al., 2016).

4.3. Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Studie demonstriert zum ersten Mal die Induktion einer persistierenden trainierten Immunität durch eine Sepsis sowohl auf zellulärer Ebene in naiven Knochenmarkmonozyten als auch in der hämatopoetischen Stammzellnische. Dies wird gezeigt durch eine gesteigerte Myelopoese, aber auch durch eine erhöhte Responsivität naiver Knochenmarkmonozyten auf einen zweiten Stimulus. Einhergehend mit diesen Daten zeigen naive Knochenmarkmonozyten eine gesteigerte basale Glykolyse, sowie transkriptionelle Änderungen in Genen, involviert in den Kohlenhydratmetabolismus, als auch die gesteigerte Expression von Genen, die eine erhöhte proinflammatorischen Zytokinantwort fördern. Allerdings konnte hier nur ein „Priming“ der Zellen in Richtung trainierte Immunität aufgezeigt werden, die metabolischen und transkriptionellen Analysen der Zellen erfolgten bevor diese einen zweiten Stimulus erhielten. Des Weiteren wurden in dieser Studie die epigenetischen Aspekte, die an der Etablierung und Aufrechterhaltung der trainierten Immunität beteiligt sind, vernachlässigt (Saeed et al., 2014, Cheng et al., 2014b, Yoshida et al., 2015). Hier ist es notwendig die metabolischen, transkriptionellen und epigenetischer Veränderungen in postseptischen naiven Knochenmarkmonozyten nach einem zweiten Stimulus wie LPS noch

zu klären, um zu untersuchen, ob es zur vollen Ausprägung der in der Literatur beschriebenen Effekte im Zusammenhang mit der trainierten Immunität kommt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Tatsache, dass naive Monozyten im Knochenmark trainiert sind, jedoch systemisch ein eher immunsuppressiver Tonus vorherrscht. Um zu klären was mit den Monozyten nach Extravasation aus dem Knochenmark passiert, sind weitere Analysen erforderlich. Die Daten dieser Arbeit unterstreichen somit die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen des postseptischen Immunsystems, um die komplexen molekularen Geschehnisse zu verstehen.

Des Weiteren zeigt diese Studie zum ersten Mal den Einfluss einer Sepsis auf die männliche Keimbahn und die daraus resultierenden Auswirkungen auf den Phänotyp der F₁-Generation. Eine Sepsis beeinträchtigt dabei die Funktion der Spermien und verändert das DNA-Methylom der männlichen Keimzellen, ohne dabei die tatsächliche Fortpflanzungsleistung zu beeinträchtigen. Methodisch wurde in dieser Arbeit jedoch gerade einmal die Spitze des Eisbergs gemessen, da eine RRBS-Analyse lediglich fünf bis zehn Prozent des Cytosingehalts des Genoms aufdeckt und somit möglicherweise noch eine enorme Menge an Informationen verborgen sind. Neben der DNA-Methylierung spielen noch weitere epigenetische Mechanismen, wie Histonmodifikationen oder ncRNA, eine wichtige Rolle in der intergenerationalen Vererbung (Schagdarsurengin et al., 2012). Diese Mechanismen waren nicht Gegenstand dieser Studie. Weitere Analysen sind notwendig, um die Informationen der epigenetischen Veränderungen der männlichen Keimzellen für den nicht sequenzcodierten Informationstransfer zwischen den Generationen zu erweitern. Die Daten zeigen weiterhin eine gesteigerte postnatale Mortalität der postseptischen Nachkommen, sowie eine eingeschränkte Entwicklung der Tiere. Wie die identifizierten Veränderungen während der Embryogenese aufrechterhalten werden und wie dabei die postnatale Entwicklung moduliert wird, bleibt Gegenstand für weitere Untersuchungen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die infektionsbedingte kritische Erkrankung des Vaters die Immunfunktion der männlichen Nachkommen beeinträchtigt und die Tiere anfälliger auf verschiedene Infektionsereignisse reagieren. Diese Ergebnisse erfordern eine Aufklärung, warum dieses Phänomen ausschließlich in den männlichen Nachkommen offensichtlich wird. Um das Konzept der intergenerationalen Vererbung Sepsis-induzierter Veränderungen der Keimbahn auch auf Patienten und damit in ein postklinisches Umfeld zu transferieren, sind weitere Studien erforderlich. Dabei gilt es, Patienten im reproduktiven Alter nach einer überstandenen Sepsis hinsichtlich ihrer Fertilität und der molekularen Änderungen der Spermien zu untersuchen.

Zusammenfassend eröffnen die Daten dieser Arbeit neue Aspekte, um die langfristigen Auswirkungen einer überstandenen Sepsis besser zu verstehen und bieten Grundlagen, um den Belangen postseptischer Patienten näher zu kommen.

5. Zusammenfassung

Die "Sepsis-induzierte Immunsuppression" ist gekennzeichnet durch einen persistierenden antiinflammatorischen Status des Immunsystems postseptischer Patienten. Die Konsequenz ist eine erhöhte Anfälligkeit für das Auftreten sekundärer, häufig opportunistischer Infektionen zusammen mit einer erhöhten Mortalitätsrate dieser Patienten.

Die Mechanismen, die dem immunsuppressiven Phänotyp zugrunde liegen, sind bisher noch weitgehend ungeklärt, aber die Beteiligung epigenetischer Reprogrammierung von Immunzellen oder bereits sogar der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen der Immunzellen wird hypothetisiert. Analog kann sich eine durch verschiedene Stressoren in den Zellen der Keimbahn manifestierte epigenetische Signatur auch auf die Nachkommen übertragen. Die Sepsis, als Immunpathologie, stellt mit ihrem schweren Krankheitsverlauf einen solchen dramatischen Stressfaktor für den Organismus dar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war aufzuklären, auf welchem molekularen Weg sich die Spätfolgen einer Sepsis im Individuum über einen so langen Zeitraum manifestieren und aufzudecken, ob es ein epigenetisches „Erbe“ der Sepsis gibt, welches die Immunfunktion der Nachkommen verändert.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen erstmals, dass eine Sepsis einen Zustand trainierter Immunität auf zellulärer Ebene in naiven Knochenmarkmonozyten induziert. Dies geschieht durch eine Erhöhung der basalen Glykolyse, einhergehend mit einer transkriptionellen Reprogrammierung von Genen, die in den Metabolismus und in die Immunantwort involviert sind. Das Resultat ist die verstärkte Responsivität der Zellen auf einen zweiten Stimulus. Zusätzlich induziert eine Sepsis eine Verschiebung der Hämatopoese in Richtung der myeloiden Linie.

Des Weiteren demonstrieren die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Sepsis Einfluss auf die männliche Keimbahn nimmt und dort zu einer epigenetischen Reprogrammierung des Spermienmethyloms führt. Diese Änderungen werden auf die Nachkommen übertragen und führen dort zu einer erhöhten postnatalen Mortalität, sowie zu einer Beeinträchtigung der Gewichtsentwicklung. Als immunologische Konsequenz zeigen männliche Nachkommen postseptischer Väter eine gestörte systemische und pulmonale Immunreaktion und sind daher anfälliger für bakterielle und fungale Infektionen.

Die Ergebnisse widerlegen zum einen die aktuelle Hypothese einer globalen Immunsuppression auf zellulärer Ebene und eröffnen zum anderen gleichzeitig neue Perspektiven im Bereich der epigenetischen, intergenerationalen Vererbung immunologischer Veränderungen durch eine Sepsis.

Somit unterstreichen die Daten dieser Arbeit die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen der postseptischen Immunreaktionen, um die molekularen Veränderungen besser zu verstehen und möglicherweise in ein therapeutisches Konzept für die klinische Anwendung umzuwandeln.

6. Literaturverzeichnis

- AGILENT. 2019a. *Seahorse XF Mito Stress Test Kit* [Online]. Available: <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/seahorse-xf-consumables/kits-reagents-media/seahorse-xf-cell-mito-stress-test-kit>. [Stand: 01.12.2019]
- AGILENT. 2019b. *Seahorse XF Glycolytic Rate Assay Kit* [Online]. Available: <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/seahorse-xf-consumables/kits-reagents-media/seahorse-xf-glycolytic-rate-assay-kit>. [Stand: 01.12.2019]
- AKALIN, A., KORMAKSSON, M., LI, S., GARRETT-BAKELMAN, F. E., FIGUEROA, M. E., MELNICK, A. & MASON, C. E. 2012. methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol*, 13, R87.
- AMMER-HERRMENA, C., KULKARNI, U., ANDREAS, N., UNGELENK, M., RAVENS, S., HUBNER, C., KATHER, A., KURTH, I., BAUER, M. & KAMRADT, T. 2019. Sepsis induces long-lasting impairments in CD4+ T-cell responses despite rapid numerical recovery of T-lymphocyte populations. *PLoS One*, 14, e0211716.
- ANDERS, S., PYL, P. T. & HUBER, W. 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31, 166-9.
- ANDREAKOS, E., SACRE, S. M., SMITH, C., LUNDBERG, A., KIRIAKIDIS, S., STONEHOUSE, T., MONACO, C., FELDMANN, M. & FOXWELL, B. M. 2004. Distinct pathways of LPS-induced NF- κ B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood*, 103, 2229-2237.
- ANDREWS, S. 2010. *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. [Online]. Available: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> [Accessed]. [Stand: 08.06.2018]
- ANGUS, D. C., LINDE-ZWIRBLE, W. T., LIDICKER, J., CLERMONT, G., CARCILLO, J. & PINSKY, M. R. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29, 1303-10.
- ANWAY, M. D. & SKINNER, M. K. 2008. Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. *Reprod Biomed Online*, 16, 23-5.
- ARTS, R. J., NOVAKOVIC, B., TER HORST, R., CARVALHO, A., BEKKERING, S., LACHMANDAS, E., RODRIGUES, F., SILVESTRE, R., CHENG, S. C., WANG, S. Y., HABIBI, E., GONCALVES, L. G., MESQUITA, I., CUNHA, C., VAN LAARHOVEN, A., VAN DE VEERDONK, F. L., WILLIAMS, D. L., VAN DER MEER, J. W., LOGIE, C., O'NEILL, L. A., DINARELLO, C. A., RIKSEN, N. P., VAN CREVEL, R., CLISH, C., NOTEBAART, R. A., JOOSTEN, L. A., STUNNENBERG, H. G., XAVIER, R. J. & NETEA, M. G. 2016b. Glutaminolysis and Fumarate Accumulation Integrate Immunometabolic and Epigenetic Programs in Trained Immunity. *Cell Metab*, 24, 807-819.
- ARTS, R. J. W., JOOSTEN, L. A. B. & NETEA, M. G. 2016a. Immunometabolic circuits in trained immunity. *Seminars in Immunology*, 28, 425-430.
- BABENKO, O., KOVALCHUK, I. & METZ, G. A. 2015. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. *Neurosci Biobehav Rev*, 48, 70-91.

- BECK, D., SADLER-RIGGLEMAN, I. & SKINNER, M. K. 2017. Generational comparisons (F1 versus F3) of vinclozolin induced epigenetic transgenerational inheritance of sperm differential DNA methylation regions (epimutations) using MeDIP-Seq. *Environ Epigenet*, 3.
- BEKKERING, S., ARTS, R. J. W., NOVAKOVIC, B., KOURTZELIS, I., VAN DER HEIJDEN, C., LI, Y., POPA, C. D., TER HORST, R., VAN TUIJL, J., NETEA-MAIER, R. T., VAN DE VEERDONK, F. L., CHAVAKIS, T., JOOSTEN, L. A. B., VAN DER MEER, J. W. M., STUNNENBERG, H., RIKSEN, N. P. & NETEA, M. G. 2018. Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway. *Cell*, 172, 135-146.e9.
- BIANCHI, M. E. & MANFREDI, A. A. 2014. How macrophages ring the inflammation alarm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 2866-7.
- BISWAS, S. K. & LOPEZ-COLLAZO, E. 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*, 30, 475-87.
- BROWN, G. D. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, 6, 33-43.
- BYGREN, L. O., KAATI, G. & EDVINSSON, S. 2001. Longevity determined by paternal ancestors' nutrition during their slow growth period. *Acta Biotheor*, 49, 53-9.
- CAI, B., CAI, J. P., LUO, Y. L., CHEN, C. & ZHANG, S. 2015. The Specific Roles of JAK/STAT Signaling Pathway in Sepsis. *Inflammation*, 38, 1599-608.
- CARONE, B. R., FAUQUIER, L., HABIB, N., SHEA, J. M., HART, C. E., LI, R., BOCK, C., LI, C., GU, H., ZAMORE, P. D., MEISSNER, A., WENG, Z., HOFMANN, H. A., FRIEDMAN, N. & RANDO, O. J. 2010. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell*, 143, 1084-96.
- CARSON, W. F., CAVASSANI, K. A., DOU, Y. & KUNKEL, S. L. 2011. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics*, 6, 273-83.
- CAVAILLON, J. M. & ADIB-CONQUY, M. 2006. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care*, 10, 233.
- CAVALCANTE, R. G. & SARTOR, M. A. 2017. annotatr: genomic regions in context. *Bioinformatics*, 33, 2381-2383.
- CAVASSANI, K. A., CARSON, W. F. T., MOREIRA, A. P., WEN, H., SCHALLER, M. A., ISHII, M., LINDELL, D. M., DOU, Y., LUKACS, N. W., KESHAMOUNI, V. G., HOGABOAM, C. M. & KUNKEL, S. L. 2010. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood*, 115, 4403-11.
- CHAMPROUX, A., COCQUET, J., HENRY-BERGER, J., DREVET, J. R. & KOCER, A. 2018. A Decade of Exploring the Mammalian Sperm Epigenome: Paternal Epigenetic and Transgenerational Inheritance. *Front Cell Dev Biol*, 6, 50.
- CHENG, S.-C., QUINTIN, J., CRAMER, R. A., SHEPARDSON, K. M., SAEED, S., KUMAR, V., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J., MARTENS, J. H. A., RAO, N. A., AGHAJANIREFAH, A., MANJERI, G. R., LI, Y., IFRIM, D. C., ARTS, R. J. W., VAN DER VEER, B. M. J. W., DEEN, P. M. T., LOGIE, C., O'NEILL, L. A., WILLEMS, P., VAN DE VEERDONK, F. L., VAN DER MEER, J. W. M., NG, A., JOOSTEN, L. A. B., WIJMENGA, C., STUNNENBERG, H. G., XAVIER, R. J. & NETEA, M. G. 2014a. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 345.

- CHENG, S.-C., SCICLUNA, B. P., ARTS, R. J. W., GRESNIGT, M. S., LACHMANDAS, E., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J., KOX, M., MANJERI, G. R., WAGENAARS, J. A. L., CREMER, O. L., LEENTJENS, J., VAN DER MEER, A. J., VAN DE VEERDONK, F. L., BONTEN, M. J., SCHULTZ, M. J., WILLEMS, P. H. G. M., PICKKERS, P., JOOSTEN, L. A. B., VAN DER POLL, T. & NETEA, M. G. 2016. Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nature Immunology*, 17, 406.
- CHENG, S. C., QUINTIN, J., CRAMER, R. A., SHEPARDSON, K. M., SAEED, S., KUMAR, V., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J., MARTENS, J. H., RAO, N. A., AGHAJANIREFAH, A., MANJERI, G. R., LI, Y., IFRIM, D. C., ARTS, R. J., VAN DER VEER, B. M., DEEN, P. M., LOGIE, C., O'NEILL, L. A., WILLEMS, P., VAN DE VEERDONK, F. L., VAN DER MEER, J. W., NG, A., JOOSTEN, L. A., WIJMENGA, C., STUNNENBERG, H. G., XAVIER, R. J. & NETEA, M. G. 2014b. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 345, 1250684.
- CHOUDHARY, C., WEINERT, B. T., NISHIDA, Y., VERDIN, E. & MANN, M. 2014. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 536-50.
- CHRIST, A., GUNTHER, P., LAUTERBACH, M. A. R., DUEWELL, P., BISWAS, D., PELKA, K., SCHOLZ, C. J., OOSTING, M., HAENDLER, K., BASSLER, K., KLEE, K., SCHULTE-SCHREPPING, J., ULAS, T., MOORLAG, S., KUMAR, V., PARK, M. H., JOOSTEN, L. A. B., GROH, L. A., RIKSEN, N. P., ESPEVIK, T., SCHLITZER, A., LI, Y., FITZGERALD, M. L., NETEA, M. G., SCHULTZE, J. L. & LATZ, E. 2018. Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell*, 172, 162-175.e14.
- CONDOTTA, S. A., RAI, D., JAMES, B. R., GRIFFITH, T. S. & BADOVINAC, V. P. 2013. Sustained and Incomplete Recovery of Naive CD8⁺ T Cell Precursors after Sepsis Contributes to Impaired CD8⁺ T Cell Responses to Infection. *The Journal of Immunology*, 190, 1991-2000.
- COSKUN, M., SALEM, M., PEDERSEN, J. & NIELSEN, O. H. 2013. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacological Research*, 76, 1-8.
- CREWS, D., GILLETTE, R., SCARPINO, S. V., MANIKKAM, M., SAVENKOVA, M. I. & SKINNER, M. K. 2012. Epigenetic transgenerational inheritance of altered stress responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 9143-8.
- CROPLEY, J. E., EATON, S. A., AIKEN, A., YOUNG, P. E., GIANNOULATOU, E., HO, J. W. K., BUCKLAND, M. E., KEAM, S. P., HUTVAGNER, G., HUMPHREYS, D. T., LANGLEY, K. G., HENSTRIDGE, D. C., MARTIN, D. I. K., FEBBRAIO, M. A. & SUTER, C. M. 2016. Male-lineage transmission of an acquired metabolic phenotype induced by grand-paternal obesity. *Mol Metab*, 5, 699-708.
- CUI, X., JING, X., WU, X., YAN, M., LI, Q., SHEN, Y. & WANG, Z. 2016. DNA methylation in spermatogenesis and male infertility. *Exp Ther Med*, 12, 1973-1979.
- DANAHY, D. B., KURUP, S. P., WINBORN, C. S., JENSEN, I. J., HARTY, J. T., GRIFFITH, T. S. & BADOVINAC, V. P. 2019. Sepsis-Induced State of Immunoparalysis Is Defined by Diminished CD8 T Cell-Mediated Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology*, 203, 725-735.

- DE CASTRO BARBOSA, T., INGERSLEV, L. R., ALM, P. S., VERSTHEYHE, S., MASSART, J., RASMUSSEN, M., DONKIN, I., SJOGREN, R., MUDRY, J. M., VETTERLI, L., GUPTA, S., KROOK, A., ZIERATH, J. R. & BARRES, R. 2016. High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Mol Metab*, 5, 184-97.
- DE GROOTH, H. J., GEENEN, I. L., GIRBES, A. R., VINCENT, J. L., PARIENTI, J. J. & OUDEMANS-VAN STRAATEN, H. M. 2017. SOFA and mortality endpoints in randomized controlled trials: a systematic review and meta-regression analysis. *Crit Care*, 21, 38.
- DOBIN, A., DAVIS, C. A., SCHLESINGER, F., DRENKOW, J., ZALESKI, C., JHA, S., BATUT, P., CHAISSON, M. & GINGERAS, T. R. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29, 15-21.
- DOMINGUEZ-ANDRES, J. & NETEA, M. G. 2018. Long-term reprogramming of the innate immune system. *J Leukoc Biol*.
- FAIVRE, V., LUKASZEWICZ, A. C. & PAYEN, D. 2016. Downregulation of Blood Monocyte HLA-DR in ICU Patients Is Also Present in Bone Marrow Cells. *PLoS One*, 11, e0164489.
- FENG, J., MEYER, C. A., WANG, Q., LIU, J. S., SHIRLEY LIU, X. & ZHANG, Y. 2012. GFOLD: a generalized fold change for ranking differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 28, 2782-8.
- FLEISCHMANN-STRUZEK, C., MIKOLAJETZ, A., SCHWARZKOPF, D., COHEN, J., HARTOG, C. S., PLETZ, M., GASTMEIER, P. & REINHART, K. 2018. Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany. *Intensive Care Med*, 44, 1826-1835.
- FLEISCHMANN, C., HARTMANN, M., HARTOG, C. S., WELTE, T., HEUBLEIN, S., THOMAS-RUEDDEL, D., DENNLER, U. & REINHART, K. 2015. Epidemiology of Sepsis in Germany: Incidence, Mortality And Associated Costs of Care 2007-2013. *Intensive Care Medicine Experimental*, 3, A50.
- FOSTER, S. L., HARGREAVES, D. C. & MEDZHITOV, R. 2007. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*, 447, 972-8.
- FRANKLIN, T. B., RUSSIG, H., WEISS, I. C., GRAFF, J., LINDER, N., MICHALON, A., VIZI, S. & MANSUY, I. M. 2010. Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biol Psychiatry*, 68, 408-15.
- FULLSTON, T., OHLSSON TEAGUE, E. M., PALMER, N. O., DEBLASIO, M. J., MITCHELL, M., CORBETT, M., PRINT, C. G., OWENS, J. A. & LANE, M. 2013. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *Faseb j*, 27, 4226-43.
- GALLAGHER, K. A., JOSHI, A., CARSON, W. F., SCHALLER, M., ALLEN, R., MUKERJEE, S., KITTAN, N., FELDMAN, E. L., HENKE, P. K., HOGABOAM, C., BURANT, C. F. & KUNKEL, S. L. 2015. Epigenetic changes in bone marrow progenitor cells influence the inflammatory phenotype and alter wound healing in type 2 diabetes. *Diabetes*, 64, 1420-30.
- GANESHAN, K. & CHAWLA, A. 2014. Metabolic regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 32, 609-34.
- GAUJOUX, R. & SEOIGHE, C. 2010. A flexible R package for nonnegative matrix factorization. *BMC Bioinformatics*, 11, 367.

- GIESEN, L. & SINGER, M. 2018. What is Sepsis? *In*: WIERSINGA, W. J. & SEYMOUR, C. W. (eds.) *Handbook of Sepsis*. Springer International Publishing.
- GOLDBERG, L. R. & GOULD, T. J. 2018. Multigenerational and transgenerational effects of paternal exposure to drugs of abuse on behavioral and neural function. *Eur J Neurosci*.
- GONZALEZ, G., URIBE, J. C., ARMSTRONG, B., MCDONOUGH, W. & BERENS, M. E. 2008. GeneRanker: An Online System for Predicting Gene-Disease Associations for Translational Research. *Summit Transl Bioinform*, 2008, 26-30.
- GRANDJEAN, V., FOURRE, S., DE ABREU, D. A., DERIEPPE, M. A., REMY, J. J. & RASSOULZADEGAN, M. 2015. RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. *Sci Rep*, 5, 18193.
- GREENBERG, M. V. C. & BOURC'HIS, D. 2019. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20, 590-607.
- GUIBERT, S., FORNE, T. & WEBER, M. 2012. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res*, 22, 633-41.
- HACKETT, J. A., SENGUPTA, R., ZYLICZ, J. J., MURAKAMI, K., LEE, C., DOWN, T. A. & SURANI, M. A. 2013. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science*, 339, 448-52.
- HACKETT, J. A. & SURANI, M. A. 2013. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368, 20110328.
- HAJKOVA, P. 2011. Epigenetic reprogramming in the germline: towards the ground state of the epigenome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 366, 2266-73.
- HAMILTON, J. P. 2011. Epigenetics: principles and practice. *Dig Dis*, 29, 130-5.
- HARRISON, D. A. 2012. The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4.
- HEARD, E. & MARTIENSSEN, R. A. 2014. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell*, 157, 95-109.
- HEDGER, M. P. & MEINHARDT, A. 2003. Cytokines and the immune-testicular axis. *J Reprod Immunol*, 58, 1-26.
- HORIGUCHI, H., LOFTUS, T. J., HAWKINS, R. B., RAYMOND, S. L., STORTZ, J. A., HOLLEN, M. K., WEISS, B. P., MILLER, E. S., BIHORAC, A., LARSON, S. D., MOHR, A. M., BRAKENRIDGE, S. C., TSUJIMOTO, H., UENO, H., MOORE, F. A., MOLDAWER, L. L. & EFRON, P. A. 2018. Innate Immunity in the Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome and Its Implications for Therapy. *Front Immunol*, 9, 595.
- HOTCHKISS, R. S., MONNERET, G. & PAYEN, D. 2013a. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*, 13, 260-8.
- HOTCHKISS, R. S., MONNERET, G. & PAYEN, D. 2013b. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 13, 862-74.
- HUANG, G., YUAN, M., ZHANG, J., LI, J., GONG, D., LI, Y., ZHANG, J., LIN, P. & HUANG, L. 2016. IL-6 mediates differentiation disorder during spermatogenesis in obesity-associated inflammation by affecting the expression of Zfp637 through the SOCS3/STAT3 pathway. *Scientific reports*, 6, 28012-28012.

- HUYPENS, P., SASS, S., WU, M., DYCKHOFF, D., TSCHOP, M., THEIS, F., MARSCHALL, S., HRABE DE ANGELIS, M. & BECKERS, J. 2016. Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance. *Nat Genet*, 48, 497-9.
- JAN, S. Z., HAMER, G., REPPING, S., DE ROOIJ, D. G., VAN PELT, A. M. & VORMER, T. L. 2012. Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 1838-50.
- JENKINS, T. G., ASTON, K. I., PFLUEGER, C., CAIRNS, B. R. & CARRELL, D. T. 2014. Age-associated sperm DNA methylation alterations: possible implications in offspring disease susceptibility. *PLoS Genet*, 10, e1004458.
- JHA, A. K., HUANG, S. C., SERGUSHICHEV, A., LAMPROPOULOU, V., IVANOVA, Y., LOGINICHEVA, E., CHMIELEWSKI, K., STEWART, K. M., ASHALL, J., EVERTS, B., PEARCE, E. J., DRIGGERS, E. M. & ARTYOMOV, M. N. 2015. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*, 42, 419-30.
- JIANG, L., ZHANG, J., WANG, J. J., WANG, L., ZHANG, L., LI, G., YANG, X., MA, X., SUN, X., CAI, J., ZHANG, J., HUANG, X., YU, M., WANG, X., LIU, F., WU, C. I., HE, C., ZHANG, B., CI, W. & LIU, J. 2013. Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell*, 153, 773-84.
- KAJIHARA, T., OKAGAKI, R. & ISHIHARA, O. 2006. LPS-induced transient testicular dysfunction accompanied by apoptosis of testicular germ cells in mice. *Med Mol Morphol*, 39, 203-8.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11, 373-84.
- KIM, J. H., KIM, S. J., LEE, I. S., LEE, M. S., UEMATSU, S., AKIRA, S. & OH, K. I. 2009. Bacterial endotoxin induces the release of high mobility group box 1 via the IFN-beta signaling pathway. *J Immunol*, 182, 2458-66.
- KLEIN, S. L. & FLANAGAN, K. L. 2016. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*, 16, 626-38.
- KLEINNIJENHUIS, J., QUINTIN, J., PREIJERS, F., JOOSTEN, L. A., IFRIM, D. C., SAEED, S., JACOBS, C., VAN LOENHOUT, J., DE JONG, D., STUNNENBERG, H. G., XAVIER, R. J., VAN DER MEER, J. W., VAN CREVEL, R. & NETEA, M. G. 2012. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 17537-42.
- KLEINNIJENHUIS, J., QUINTIN, J., PREIJERS, F., JOOSTEN, L. A., JACOBS, C., XAVIER, R. J., VAN DER MEER, J. W., VAN CREVEL, R. & NETEA, M. G. 2014. BCG-induced trained immunity in NK cells: Role for non-specific protection to infection. *Clin Immunol*, 155, 213-9.
- KOPF, M., SCHNEIDER, C. & NOBS, S. P. 2014. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nature Immunology*, 16, 36.
- KOPYLOVA, E., NOE, L. & TOUZET, H. 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28, 3211-7.
- KRAWETZ, S. A. 2005. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet*, 6, 633-42.
- KRUEGER, F. & ANDREWS, S. R. 2011. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*, 27, 1571-2.

- LA SALLE, S., OAKES, C. C., NEAGA, O. R., BOURC'HIS, D., BESTOR, T. H. & TRASLER, J. M. 2007. Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. *BMC Dev Biol*, 7, 104.
- LAMBROT, R., XU, C., SAINT-PHAR, S., CHOUNTALOS, G., COHEN, T., PAQUET, M., SUDERMAN, M., HALLETT, M. & KIMMINS, S. 2013. Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat Commun*, 4, 2889.
- LANGMEAD, B. & SALZBERG, S. L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*, 9, 357-9.
- LARSSON, J. & KARLSSON, S. 2005. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene*, 24, 5676-92.
- LAWRENCE, M., HUBER, W., PAGES, H., ABOYOUN, P., CARLSON, M., GENTLEMAN, R., MORGAN, M. T. & CAREY, V. J. 2013. Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS Comput Biol*, 9, e1003118.
- LESUR, O., ROUSSY, J. F., CHAGNON, F., GALLO-PAYET, N., DUMAINE, R., SARRET, P., CHRAIBI, A., CHOUIARD, L. & HOGUE, B. 2010. Proven infection-related sepsis induces a differential stress response early after ICU admission. *Crit Care*, 14, R131.
- LI, H., HANDSAKER, B., WYSOKER, A., FENNEL, T., RUAN, J., HOMER, N., MARTH, G., ABECASIS, G. & DURBIN, R. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078-9.
- LÖFFLER, G. & MÜLLER, M. 2014. Glucose - Schlüsselmolekül des Kohlenhydratstoffwechsels. In: HEINRICH, P. C., MÜLLER, M. & GRAEVE, L. (eds.) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9th ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- LÖFFLER, M. 2014. Purinnukleotide – Biosynthese, Wiederverwertung und Abbau. In: HEINRICH, P. C., MÜLLER, M. & GRAEVE, L. (eds.) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9th ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- LOVE, M. I., HUBER, W. & ANDERS, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 15, 550.
- LOVELAND, K. L., KLEIN, B., PUESCHL, D., INDUMATHY, S., BERGMANN, M., LOVELAND, B. E., HEDGER, M. P. & SCHUPPE, H. C. 2017. Cytokines in Male Fertility and Reproductive Pathologies: Immunoregulation and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8, 307.
- LUU, N., FU, L., FUJIMOTO, K. & SHI, Y.-B. 2017. Direct Regulation of Histidine Ammonia-Lyase 2 Gene by Thyroid Hormone in the Developing Adult Intestinal Stem Cells. *Endocrinology*, 158, 1022-1033.
- LY, L., CHAN, D. & TRASLER, J. M. 2015. Developmental windows of susceptibility for epigenetic inheritance through the male germline. *Semin Cell Dev Biol*, 43, 96-105.
- MANIKKAM, M., TRACEY, R., GUERRERO-BOSAGNA, C. & SKINNER, M. K. 2012. Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. *Reprod Toxicol*, 34, 708-19.
- MANN, M., MEHTA, A., DE BOER, C. G., KOWALCZYK, M. S., LEE, K., HALDEMAN, P., ROGEL, N., KNECHT, A. R., FAROUQ, D., REGEV, A. & BALTIMORE, D. 2018. Heterogeneous Responses of Hematopoietic Stem Cells to Inflammatory Stimuli Are Altered with Age. *Cell Rep*, 25, 2992-3005.e5.
- MCSWIGGIN, H. M. & O'DOHERTY, A. M. 2018. Epigenetic reprogramming during spermatogenesis and male factor infertility. *Reproduction*, 156, R9-r21.

- MEAD, E. A. & SARKAR, D. K. 2014. Fetal alcohol spectrum disorders and their transmission through genetic and epigenetic mechanisms. *Front Genet*, 5, 154.
- MESSERSCHMIDT, D. M., KNOWLES, B. B. & SOLTER, D. 2014. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev*, 28, 812-28.
- MITROULIS, I., RUPPOVA, K., WANG, B., CHEN, L. S., GRZYBEK, M., GRINENKO, T., EUGSTER, A., TROULLINAKI, M., PALLADINI, A., KOURTZELIS, I., CHATZIGEORGIOU, A., SCHLITZER, A., BEYER, M., JOOSTEN, L. A. B., ISERMANN, B., LESCHE, M., PETZOLD, A., SIMONS, K., HENRY, I., DAHL, A., SCHULTZE, J. L., WIELOCKX, B., ZAMBONI, N., MIRTSCHINK, P., COSKUN, U., HAJISHENGALLIS, G., NETEA, M. G. & CHAVAKIS, T. 2018. Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell*, 172, 147-161.e12.
- MORGAN, C. P. & BALE, T. L. 2011. Early prenatal stress epigenetically programs dysmasculinization in second-generation offspring via the paternal lineage. *J Neurosci*, 31, 11748-55.
- MUENZER, J. T., DAVIS, C. G., DUNNE, B. S., UNSINGER, J., DUNNE, W. M. & HOTCHKISS, R. S. 2006. Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant "two-hit" model of sepsis. *Shock*, 26, 565-70.
- MUKHERJEE, S., ALLEN, R. M., LUKACS, N. W., KUNKEL, S. L. & CARSON, W. F. T. 2012. STAT3-mediated IL-17 production by postseptic T cells exacerbates viral immunopathology of the lung. *Shock*, 38, 515-23.
- MURPHY, K. & WEAVER, C. 2018. *Janeway Immunologie*, Berlin, Heidelberg, Springer Spektrum.
- MURPHY, P. J., WU, S. F., JAMES, C. R., WIKE, C. L. & CAIRNS, B. R. 2018. Placeholder Nucleosomes Underlie Germline-to-Embryo DNA Methylation Reprogramming. *Cell*, 172, 993-1006.e13.
- NASCIMENTO, D. C., ALVES-FILHO, J. C., SONEGO, F., FUKADA, S. Y., PEREIRA, M. S., BENJAMIM, C., ZAMBONI, D. S., SILVA, J. S. & CUNHA, F. Q. 2010. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. *Crit Care Med*, 38, 1718-25.
- NETEA, M. G. 2013. Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence. *Eur J Clin Invest*, 43, 881-4.
- NETEA, M. G., JOOSTEN, L. A. B., LATZ, E., MILLS, K. H. G., NATOLI, G., STUNNENBERG, H. G., O'NEILL, L. A. J. & XAVIER, R. J. 2016. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352.
- NETEA, M. G., QUINTIN, J. & VAN DER MEER, J. W. 2011. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe*, 9, 355-61.
- NG, S. F., LIN, R. C., LAYBUTT, D. R., BARRES, R., OWENS, J. A. & MORRIS, M. J. 2010. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature*, 467, 963-6.
- O'NEILL, L. A., KISHTON, R. J. & RATHMELL, J. 2016. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*, 16, 553-65.
- OAKBERG, E. F. 1956. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat*, 99, 507-16.

- OUKO, L. A., SHANTIKUMAR, K., KNEZOVICH, J., HAYCOCK, P., SCHNUGH, D. J. & RAMSAY, M. 2009. Effect of alcohol consumption on CpG methylation in the differentially methylated regions of H19 and IG-DMR in male gametes: implications for fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res*, 33, 1615-27.
- PALSSON-MCDERMOTT, E. M. & O'NEILL, L. A. 2013. The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *Bioessays*, 35, 965-73.
- PARK, B. S., SONG, D. H., KIM, H. M., CHOI, B. S., LEE, H. & LEE, J. O. 2009. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458, 1191-5.
- PATEL, A. A., ZHANG, Y., FULLERTON, J. N., BOELEN, L., RONGVAUX, A., MAINI, A. A., BIGLEY, V., FLAVELL, R. A., GILROY, D. W., ASQUITH, B., MACALLAN, D. & YONA, S. 2017. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med*, 214, 1913-1923.
- PATEL, C. H., LEONE, R. D., HORTON, M. R. & POWELL, J. D. 2019. Targeting metabolism to regulate immune responses in autoimmunity and cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 18, 669-688.
- PEARCE, E. L. & PEARCE, E. J. 2013. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*, 38, 633-43.
- PENTIKAINEN, V., ERKKILA, K., SUOMALAINEN, L., OTALA, M., PENTIKAINEN, M. O., PARVINEN, M. & DUNKEL, L. 2001. TNFalpha down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 4480-8.
- PIETRAS, E. M., REYNAUD, D., KANG, Y. A., CARLIN, D., CALERO-NIETO, F. J., LEAVITT, A. D., STUART, J. M., GOTTGENS, B. & PASSEGUE, E. 2015. Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell*, 17, 35-46.
- PINA, C. & ENVER, T. 2007. Differential contributions of haematopoietic stem cells to foetal and adult haematopoiesis: insights from functional analysis of transcriptional regulators. *Oncogene*, 26, 6750-65.
- POTOK, M. E., NIX, D. A., PARNELL, T. J. & CAIRNS, B. R. 2013. Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern. *Cell*, 153, 759-72.
- PRESCOTT, H. C., OSTERHOLZER, J. J., LANGA, K. M., ANGUS, D. C. & IWASHYNA, T. J. 2016. Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *Bmj*, 353, i2375.
- QUINTIN, J., SAEED, S., MARTENS, J. H. A., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J., IFRIM, D. C., LOGIE, C., JACOBS, L., JANSEN, T., KULLBERG, B.-J., WIJMENGA, C., JOOSTEN, L. A. B., XAVIER, R. J., VAN DER MEER, J. W. M., STUNNENBERG, H. G. & NETEA, M. G. 2012. Candida albicans Infection Affords Protection against Reinfection via Functional Reprogramming of Monocytes. *Cell host & microbe*, 12, 10.1016/j.chom.2012.06.006.
- RADFORD, E. J., ITO, M., SHI, H., CORISH, J. A., YAMAZAWA, K., ISGANAITIS, E., SEISENBERGER, S., HORE, T. A., REIK, W., ERKEK, S., PETERS, A. H., PATTI, M. E. & FERGUSON-SMITH, A. C. 2014. In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science*, 345, 1255903.
- RAMATHAL, C., REIJO PERA, R. A. & CHAVEZ, S. L. 2015. Chapter 6 - Preimplantation Embryo Development and Primordial Germ Cell Lineage Specification. In: PLANT, T. M. & ZELEZNIK, A. J. (eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press.

- RITTIRSCH, D., HUBER-LANG, M. S., FLIERL, M. A. & WARD, P. A. 2009. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*, 4, 31-6.
- RODGERS, A. B., MORGAN, C. P., BRONSON, S. L., REVELLO, S. & BALE, T. L. 2013. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. *J Neurosci*, 33, 9003-12.
- RODRIGUEZ, S., CHORA, A., GOUMNEROV, B., MUMAW, C., GOEBEL, W. S., FERNANDEZ, L., BAYDOUN, H., HOGENESCH, H., DOMBKOWSKI, D. M., KARLEWICZ, C. A., RICE, S., RAHME, L. G. & CARLESSO, N. 2009. Dysfunctional expansion of hematopoietic stem cells and block of myeloid differentiation in lethal sepsis. *Blood*, 114, 4064-4076.
- ROQUILLY, A., MCWILLIAM, H. E. G., JACQUELINE, C., TIAN, Z., CINOTTI, R., RIMBERT, M., WAKIM, L., CAMINSCHI, I., LAHOUD, M. H., BELZ, G. T., KALLIES, A., MINTERN, J. D., ASEHNOUNE, K. & VILLADANGOS, J. A. 2017. Local Modulation of Antigen-Presenting Cell Development after Resolution of Pneumonia Induces Long-Term Susceptibility to Secondary Infections. *Immunity*, 47, 135-147.e5.
- ROSENBLOOM, K. R., ARMSTRONG, J., BARBER, G. P., CASPER, J., CLAWSON, H., DIEKHANS, M., DRESZER, T. R., FUJITA, P. A., GURUVADOO, L., HAEUSSLER, M., HARTE, R. A., HEITNER, S., HICKEY, G., HINRICHS, A. S., HUBLEY, R., KAROLCHIK, D., LEARNED, K., LEE, B. T., LI, C. H., MIGA, K. H., NGUYEN, N., PATEN, B., RANEY, B. J., SMIT, A. F., SPEIR, M. L., ZWEIG, A. S., HAUSSLER, D., KUHN, R. M. & KENT, W. J. 2015. The UCSC Genome Browser database: 2015 update. *Nucleic Acids Res*, 43, D670-81.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-91.
- SAEED, S., QUINTIN, J., KERSTENS, H. H. D., RAO, N. A., AGHAJANIREFAH, A., MATARESE, F., CHENG, S.-C., RATTER, J., BERENTSEN, K., VAN DER ENT, M. A., SHARIFI, N., JANSSEN-MEGENS, E. M., TER HUURNE, M., MANDOLI, A., VAN SCHAIK, T., NG, A., BURDEN, F., DOWNES, K., FRONTINI, M., KUMAR, V., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J., OUWEHAND, W. H., VAN DER MEER, J. W. M., JOOSTEN, L. A. B., WIJMENGA, C., MARTENS, J. H. A., XAVIER, R. J., LOGIE, C., NETEA, M. G. & STUNNENBERG, H. G. 2014. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, 345.
- SANCHEZ-GARRIDO, M. A., RUIZ-PINO, F., VELASCO, I., BARROSO, A., FERNANDOIS, D., HERAS, V., MANFREDI-LOZANO, M., VAZQUEZ, M. J., CASTELLANO, J. M., ROA, J., PINILLA, L. & TENA-SEMPERE, M. 2018. Intergenerational Influence of Paternal Obesity on Metabolic and Reproductive Health Parameters of the Offspring: Male-Preferential Impact and Involvement of Kiss1-Mediated Pathways. *Endocrinology*, 159, 1005-1018.
- SANTI, D., DE VINCENTIS, S., MAGNANI, E. & SPAGGIARI, G. 2017. Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study. *Andrology*, 5, 695-703.
- SCHAGDARSURENGIN, U., PARADOWSKA, A. & STEGER, K. 2012. Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nat Rev Urol*, 9, 609-19.
- SCHAGDARSURENGIN, U. & STEGER, K. 2016. Epigenetics in male reproduction: effect of paternal diet on sperm quality and offspring health. *Nat Rev Urol*, 13, 584-95.
- SCHAGDARSURENGIN, U., WESTERN, P., STEGER, K. & MEINHARDT, A. 2016. Developmental origins of male subfertility: role of infection, inflammation, and environmental factors. *Semin Immunopathol*, 38, 765-781.

- SCHÜTT, C. & BRÖKER, B. 2009. *Grundwissen Immunologie*, Springer Akademischer Verlag.
- SEELEY, J. J. & GHOSH, S. 2017. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol*, 101, 107-119.
- SEITA, J. & WEISSMAN, I. L. 2010. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2, 640-53.
- SEYMOUR, C. W., LIU, V. X., IWASHYNA, T. J., BRUNKHORST, F. M., REA, T. D., SCHERAG, A., RUBENFELD, G., KAHN, J. M., SHANKAR-HARI, M., SINGER, M., DEUTSCHMAN, C. S., ESCOBAR, G. J. & ANGUS, D. C. 2016. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*, 315, 762-74.
- SHALOVA, I. N., LIM, J. Y., CHITTEZHATH, M., ZINKERNAGEL, A. S., BEASLEY, F., HERNANDEZ-JIMENEZ, E., TOLEDANO, V., CUBILLOS-ZAPATA, C., RAPISARDA, A., CHEN, J., DUAN, K., YANG, H., POIDINGER, M., MELILLO, G., NIZET, V., ARNALICH, F., LOPEZ-COLLAZO, E. & BISWAS, S. K. 2015. Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1alpha. *Immunity*, 42, 484-98.
- SHAPIRO, R., BRAVERMAN, B., LOUIS, J. B. & SERVIS, R. E. 1973. Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. *J Biol Chem*, 248, 4060-4.
- SIKLENKA, K., ERKEK, S., GODMANN, M., LAMBROT, R., MCGRAW, S., LAFLEUR, C., COHEN, T., XIA, J., SUDERMAN, M., HALLETT, M., TRASLER, J., PETERS, A. H. & KIMMINS, S. 2015. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science*, 350, aab2006.
- SINGER, M., DEUTSCHMAN, C. S., SEYMOUR, C. W., SHANKAR-HARI, M., ANNANE, D., BAUER, M., BELLOMO, R., BERNARD, G. R., CHICHE, J.-D., COOPERSMITH, C. M., HOTCHKISS, R. S., LEVY, M. M., MARSHALL, J. C., MARTIN, G. S., OPAL, S. M., RUBENFELD, G. D., VAN DER POLL, T., VINCENT, J.-L. & ANGUS, D. C. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315, 801-810.
- SKINNER, M. K., BEN MAAMAR, M., SADLER-RIGGLEMAN, I., BECK, D., NILSSON, E., MCBIRNEY, M., KLUKOVICH, R., XIE, Y., TANG, C. & YAN, W. 2018. Alterations in sperm DNA methylation, non-coding RNA and histone retention associate with DDT-induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Epigenetics Chromatin*, 11, 8.
- SOUBRY, A., GUO, L., HUANG, Z., HOYO, C., ROMANUS, S., PRICE, T. & MURPHY, S. K. 2016. Obesity-related DNA methylation at imprinted genes in human sperm: Results from the TIEGER study. *Clin Epigenetics*, 8, 51.
- STEWART, K. R., VESELOVSKA, L. & KELSEY, G. 2016. Establishment and functions of DNA methylation in the germline. *Epigenomics*, 8, 1399-1413.
- STUPPIA, L., FRANZAGO, M., BALLERINI, P., GATTA, V. & ANTONUCCI, I. 2015. Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clin Epigenetics*, 7, 120.
- SUN, M., YANG, P., DU, L., ZHOU, H., REN, X., LIN, X. & KIJLSTRA, A. 2010. Increased Regulatory T Cells in Spleen during Experimental Autoimmune Uveoretinitis. *Ocul Immunol Inflamm*, 18, 38-43.
- SWIRSKI, F. K., NAHRENDORF, M., ETZRODT, M., WILDGRUBER, M., CORTEZ-RETAMOZO, V., PANIZZI, P., FIGUEIREDO, J. L., KOHLER, R. H., CHUDNOVSKIY, A., WATERMAN, P., AIKAWA, E., MEMPEL, T. R., LIBBY, P., WEISSLEDER, R. &

- PITTET, M. J. 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, 325, 612-6.
- TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140, 805-20.
- TAN, S. Y. & KRASNOW, M. A. 2016. Developmental origin of lung macrophage diversity. *Development*, 143, 1318-27.
- TANIGUCHI, T. & TAKAOKA, A. 2001. A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 378-86.
- TANNAHILL, G. M., CURTIS, A. M., ADAMIK, J., PALSSON-MCDERMOTT, E. M., MCGETTRICK, A. F., GOEL, G., FREZZA, C., BERNARD, N. J., KELLY, B., FOLEY, N. H., ZHENG, L., GARDET, A., TONG, Z., JANY, S. S., CORR, S. C., HANEKLAUS, M., CAFFREY, B. E., PIERCE, K., WALMSLEY, S., BEASLEY, F. C., CUMMINS, E., NIZET, V., WHYTE, M., TAYLOR, C. T., LIN, H., MASTERS, S. L., GOTTLIEB, E., KELLY, V. P., CLISH, C., AURON, P. E., XAVIER, R. J. & O'NEILL, L. A. 2013. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature*, 496, 238-42.
- THAPA, B. & LEE, K. 2019. Metabolic influence on macrophage polarization and pathogenesis. *BMB Rep*, 52, 360-372.
- TOSHIMORI, K. & EDDY, E. M. 2015. Chapter 3 - The Spermatozoon. In: PLANT, T. M. & ZELEZNIK, A. J. (eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press.
- TRUMPP, A., ESSERS, M. & WILSON, A. 2010. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*, 10, 201-9.
- TRUNOVA, G. V., MAKAROVA, O. V., DIATROPTOV, M. E., BOGDANOVA, I. M., MIKCHAILOVA, L. P. & ABDULAEVA, S. O. 2011. Morphofunctional Characteristic of the Immune System in BALB/c and C57Bl/6 Mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 151, 99-102.
- TSCHURTSCHENTHALER, M., KACHROO, P., HEINSEN, F. A., ADOLPH, T. E., RUHLEMANN, M. C., KLUGHAMMER, J., OFFNER, F. A., AMMERPOHL, O., KRUEGER, F., SMALLWOOD, S., SZYMCZAK, S., KASER, A. & FRANKE, A. 2016. Paternal chronic colitis causes epigenetic inheritance of susceptibility to colitis. *Sci Rep*, 6, 31640.
- UHLE, F., LICHTENSTERN, C., BRENNER, T. & WEIGAND, M. A. 2015. Sepsis und Multiorganversagen – Pathophysiologie der Sepsis. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 50, 114-122.
- UHLE, F., LICHTENSTERN, C. & WEIGAND, M. A. 2016. Pathophysiologie. In: WERDAN, K., MÜLLER-WERDAN, U., SCHUSTER, H.-P. & BRUNKHORST, F. M. (eds.) *Sepsis und MODS*. 5th ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- VALDES-FERRER, S. I., ROSAS-BALLINA, M., OLOFSSON, P. S., LU, B., DANCHO, M. E., OCHANI, M., LI, J. H., SCHEINERMAN, J. A., KATZ, D. A., LEVINE, Y. A., HUDSON, L. K., YANG, H., PAVLOV, V. A., ROTH, J., BLANC, L., ANTOINE, D. J., CHAVAN, S. S., ANDERSSON, U., DIAMOND, B. & TRACEY, K. J. 2013. HMGB1 mediates splenomegaly and expansion of splenic CD11b+ Ly-6C(high) inflammatory monocytes in murine sepsis survivors. *J Intern Med*, 274, 381-90.
- VAN ENGELEN, T. S. R., WIERSINGA, W. J. & VAN DER POLL, T. 2018. Pathogenesis of Sepsis. In: WIERSINGA, W. J. & SEYMOUR, C. W. (eds.) *Handbook of Sepsis*. Springer International Publishing.

- VASSOLER, F. M. & SADRI-VAKILI, G. 2014. Mechanisms of transgenerational inheritance of addictive-like behaviors. *Neuroscience*, 264, 198-206.
- VAZQUEZ, A., LIU, J., ZHOU, Y. & OLTVAI, Z. N. 2010. Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: The Warburg effect revisited. *BMC Systems Biology*, 4, 58.
- VERGADI, E., VAPORIDI, K. & TSATSANIS, C. 2018. Regulation of Endotoxin Tolerance and Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome by Non-coding RNAs. *Frontiers in Immunology*, 9.
- VILLARINO, A. V., KANNO, Y. & O'SHEA, J. J. 2017. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nature Immunology*, 18, 374.
- VINCENT, J. L., DE MENDONCA, A., CANTRAINED, F., MORENO, R., TAKALA, J., SUTER, P. M., SPRUNG, C. L., COLARDYN, F. & BLECHER, S. 1998. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med*, 26, 1793-800.
- WANG, J. & KUBES, P. 2016. A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. *Cell*, 165, 668-78.
- WARBURG, O. 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124, 269-70.
- WARNER, N. & NÚÑEZ, G. 2013. MyD88: A Critical Adaptor Protein in Innate Immunity Signal Transduction. *The Journal of Immunology*, 190, 3-4.
- WATANABE, H., NUMATA, K., ITO, T., TAKAGI, K. & MATSUKAWA, A. 2004. INNATE IMMUNE RESPONSE IN TH1- AND TH2-DOMINANT MOUSE STRAINS. *Shock*, 22, 460-466.
- WEI, Y., YANG, C. R., WEI, Y. P., ZHAO, Z. A., HOU, Y., SCHATTEN, H. & SUN, Q. Y. 2014. Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 1873-8.
- WEIS, S., DICKMANN, P., PLETZ, M. W., COLDEWEY, S. M., GERLACH, H. & BAUER, M. 2017. Sepsis 2017: Eine neue Definition führt zu neuen Konzepten. *Dtsch Arztebl International*, 114, 1424-.
- WEITERER, S., UHLE, F., SIEGLER, B. H., LICHTENSTERN, C., BARTKUHN, M. & WEIGAND, M. A. 2015a. [Epigenetic regulation in sepsis : current state of knowledge]. *Anaesthesist*, 64, 42-55.
- WEITERER, S., UHLE, F., SIEGLER, B. H., LICHTENSTERN, C., BARTKUHN, M. & WEIGAND, M. A. 2015b. Epigenetische Regulation in der Sepsis. *Der Anaesthesist*, 64, 42-55.
- WHO 2010. *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen*, Switzerland, World Health Organization.
- XIAO, M., YANG, H., XU, W., MA, S., LIN, H., ZHU, H., LIU, L., LIU, Y., YANG, C., XU, Y., ZHAO, S., YE, D., XIONG, Y. & GUAN, K. L. 2012. Inhibition of alpha-KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev*, 26, 1326-38.
- YIN, J., REN, W., HUANG, X., DENG, J., LI, T. & YIN, Y. 2018. Potential Mechanisms Connecting Purine Metabolism and Cancer Therapy. *Front Immunol*, 9, 1697.
- YIN, T., COOK, D. & LAWRENCE, M. 2012. ggbio: an R package for extending the grammar of graphics for genomic data. *Genome Biol*, 13, R77.

- YONA, S., KIM, K.-W., WOLF, Y., MILDNER, A., VAROL, D., BREKER, M., STRAUSS-AYALI, D., VIUKOV, S., GUILLIAMS, M., MISHARIN, A., HUME, DAVID A., PERLMAN, H., MALISSEN, B., ZELZER, E. & JUNG, S. 2013. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*, 38, 79-91.
- YOSHIDA, K., MAEKAWA, T., ZHU, Y., RENARD-GUILLET, C., CHATTON, B., INOUE, K., UCHIYAMA, T., ISHIBASHI, K., YAMADA, T., OHNO, N., SHIRAHIGE, K., OKADA-HATAKEYAMA, M. & ISHII, S. 2015. The transcription factor ATF7 mediates lipopolysaccharide-induced epigenetic changes in macrophages involved in innate immunological memory. *Nat Immunol*, 16, 1034-43.
- ZHANG, H., RODRIGUEZ, S., WANG, L., WANG, S., SEREZANI, H., KAPUR, R., CARDOSO, ANGELO A. & CARLESSO, N. 2016. Sepsis Induces Hematopoietic Stem Cell Exhaustion and Myelosuppression through Distinct Contributions of TRIF and MYD88. *Stem Cell Reports*, 6, 940-956.

7. Eigene Veröffentlichungen

7.1. Veröffentlichungen dieser Arbeit

Publikationen (peer-reviewed)

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Aufsätzen vorab publiziert:

1. **Bomans, K.**, Schenz, J., Sztwiernia. I., Schaack, D., Weigand, M.A., & Uhle, F. (2018). Sepsis Induces a Long-Lasting State of Trained Immunity in Bone Marrow Monocytes. *Front Immunol*, 9(2685). doi:10.3389/fimmu.2018.02685.
2. **Bomans, K.**, Schenz, J., Tamulyte, S., Schaack, D., Weigand, M. A., & Uhle, F. (2018). Paternal sepsis induces alterations of the sperm methylome and dampens offspring immune responses-an animal study. *Clin Epigenetics*, 10, 89. doi:10.1186/s13148-018-0522-z

Publikation 1 basiert auf den Ergebnissen aus den Dissertationskapitel 3.2. Auch die Diskussion zur Induktion einer „trained Immunity“ in naiven Knochenmarkmonozyten (Kapitel 4.1.) wurde in dieser Publikation inhaltlich abgebildet. Mein Eigenanteil an der Publikation erstreckt sich auf die Planung und Durchführung der Tierexperimente und anschließende Analysen, die Auswertung der Daten und das Schreiben des gesamten Manuskriptentwurfs. Publikation 2 beinhaltet die Ergebnisse der Dissertationskapitel 3.3., sowie die inhaltliche Darstellung der Diskussion zum Thema intergenerationale Vererbung durch Sepsis (Kapitel 4.2.). Mein Eigenanteil an der Publikation umfasst die Planung und Erhebung der tierexperimentellen Daten, die Auswertung der Daten und das Schreiben des Material- und Methodenteils des Manuskriptentwurfs.

Vorträge

Bomans, K. (2019). Post-sepsis and beyond – the intergenerational burden of sepsis. 9th Sepsis Update, Weimar, Germany. 11.09. – 13.09.2019.

Abstracts und Poster

Bomans, K., Schenz, J., Sztwiertnia, I., Schaack, D., Weigand, M.A., & Uhle, F. (2018). Sepsis Induces a Long-Lasting State of Trained Immunity in Bone Marrow Monocytes. 5th European Congress of Immunology (ECI), Amsterdam, Netherlands. 02.09. – 05.09.2018.

Bomans, K., Schenz, J., Tamulyte, S., Schaack, D., Weigand, M.A., & Uhle, F. (2018). Paternal sepsis induces alterations of the sperm methylome and dampens immune responses of male offspring. 8th Clinical Epigenetics International Meeting (CLEPSO), Düsseldorf, Germany. 08.03. – 09.03.2018.

Bomans, K., Schaack, D., Weigand, M.A., & Uhle, F. (2017). Sepsis induces long-term changes in the transcriptome and epigenome of naïve bone marrow monocytes. 8th Sepsis Update, Weimar, Germany. 06.09. – 08.09.2017.

Bomans, K., Schaack, D., Weigand, M.A., & Uhle, F. (2017). Transcriptomic and epigenetic consequences of sepsis. 13th DGfI Spring School on Immunology, Ettal, Germany. 05.03. – 10.03.2017.

7.2. Weitere eigene Veröffentlichungen

Publikationen (peer-reviewed)

Dexheimer, V., Gabler, J., **Bomans, K.**, Sims, T., Omlor, G., & Richter, W. (2016). Differential expression of TGF-beta superfamily members and role of Smad1/5/9-signalling in chondral versus endochondral chondrocyte differentiation. *Sci Rep*, 6, 36655. doi:10.1038/srep36655

Brenner, C., **Bomans, K.**, Habicht, J., Simon, M. M., & Wallich, R. (2013). Mapping the ligand-binding region of *Borrelia hermsii* fibronectin-binding protein. *PLoS One*, 8(5), e63437. doi:10.1371/journal.pone.0063437

Vorträge

Bomans, K., Rebholz, A., Ruff, S.M., & Kluger, P. (2012). Cell-material interactions of titanium implants in the human skin - status report. DiaLife Meeting 2012, Berlin, Germany. 07.12.2012

Abstracts und Poster

Sztiwertnia, I., Schenz, J., **Bomans, K.**, Weigand, M.A., & Uhle, F. (2019). Sevofluran verändert das Immunmilieu des Tumors im murinen Melanommodell. Deutscher Anästhesiecongress (DAC) 2019, Leipzig, Germany. 09.05. – 11.05.2019.

Fischer, J., Dexheimer, V., Gabler, J., **Bomans, K.**, Omlor, G., Sims, T. & Richter, W.. (2017). Chondral versus endochondral chondrocyte differentiation: Differential expression of TGF-beta superfamily members and role of Smad1/5/9-signalling. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) 2017, Berlin, Germany. 24.10. – 27.10.2017.

8. Lebenslauf

PERSONALIEN

Name und Vorname:	Katharina Bomans
Geburtsdatum:	30.08.1984
Geburtsort:	Pforzheim
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	Ledig

SCHULISCHER WERDEGANG

1991 - 1995	Haidachschule Pforzheim
1995 - 2001	Konrad-Adenauer-Realschule Pforzheim
2001 - 2004	Johanna-Wittum-Schule Pforzheim
23.06.2004	Abitur

AUSBILDUNG

2004	Beginn der Ausbildung zur Pharmazeutisch-technischen Assistentin (PTA) am Institut Dr. Flad Stuttgart
29.03.2007	Staatlich geprüfte Pharmazeutisch-technische Assistentin

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

SS 2009	Beginn des Bachelor-Studiums der Biotechnologie an der Hochschule Esslingen
22.02.2013	Bachelor of Science (B.Sc.)/Ingenieur
SS 2013	Beginn des Master-Studiums der Biotechnologie an der Hochschule Mannheim
30.12.2014	Master of Science (M.Sc.)

BERUFLICHER WERDEGANG

2007

PTA bei Sternapotheke Sindelfingen

2007 - 2009

PTA bei Franz-Joseph-Gall Apotheke

Tiefenbronn

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Markus A. Weigand danken, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Klinik für Anästhesiologie in der Sektion „Inflammation und Sepsis“ an einem so herausfordernden und spannenden Thema durchführen zu dürfen.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Florian Uhle für die außerordentliche Betreuung meiner Arbeit aussprechen. Seine immerwährende Hilfsbereitschaft und Unterstützung, die vielen förderlichen Ratschläge sowie die jederzeit geöffnete Tür haben mich stets ermutigt und motiviert. Sein Engagement und die Ideengebung zu dieser Thematik haben wesentlich zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit beigetragen. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Zusätzlich danke ich dem ganzen Team der Sektion „Inflammation und Sepsis“, darunter Ute Krauser, Sabine Stegmaier, Birgit Prior, Judith Schenz, Sandra Tamulyte und Isabella Szwiertnia für die kameradschaftliche Atmosphäre und die unermüdliche praktische und mentale Unterstützung. Ohne euch wäre diese Arbeit in dieser Art und Umfang nicht möglich gewesen.

Dominik Schaack danke ich ganz herzlich für die bioinformatische Auswertung meiner Daten und seine Geduld, mir das Fachgebiet der Bioinformatik näher zu bringen.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an Ilona Krämer und das gesamte Team des KEB am IBF Heidelberg für die gute Zusammenarbeit, die liebevolle Verpflegung unserer Mäuse und die hervorragende Hilfsbereitschaft in allen Belangen rund um die Maus.

Tief verbunden und unendlich dankbar bin ich meinem Freund Philipp Glose, für sein Verständnis, seine unendliche Geduld und die motivierende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Mein ganz besonderer Dank jedoch gilt meinen Eltern, Gerhardt und Barbara Bomans, ohne deren unermüdliche Unterstützung mein bisheriger Lebensweg nicht möglich gewesen wäre.

10. Eidesstattliche Versicherung

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema „Individuelle und generationsübergreifende immunologische Spätfolgen einer überstandenen Sepsis“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift