

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Kinderchirurgie

Prof. Dr. med. Konrad Reinshagen

**Einfluss der TLR4-Rezeptor-Aktivität auf die Shiga-Toxin 2
vermittelte NETose in vitro und in vivo**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors in Medizin an der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg

vorgelegt von:

Lisa-Marie Haase
aus Schwedt/Oder

Hamburg 2024

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:
13.01.2025

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:
Prof. Dr. Tobias Huber

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter:
Prof. Dr. Konrad Reinshagen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	7
2.. Einleitung.....	8
2.1. Das Hämolytisch-Urämische Syndrom.....	8
2.1.1. <i>Definition</i>	8
2.1.2. <i>Klinik</i>	8
2.1.3. <i>Epidemiologische Daten</i>	9
2.1.4. <i>Komplikationen</i>	10
2.1.5. <i>Folgeschäden</i>	11
2.1.6. <i>Therapie</i>	12
2.2. Pathophysiologie des Hämolytisch-Urämischen Syndroms.....	12
2.2.1. <i>E. coli O157:H7 und Shiga-Toxin</i>	12
2.2.2. <i>Von der Inokulation des EHEC zum Hämolytisch-Urämischen Syndrom</i>	13
2.2.3. <i>Aktivierung zellulärer Signalkaskaden durch Shiga-Toxin</i>	16
2.3. „Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs).....	16
2.4. Stellenwert der NETose beim Hämolytisch-Urämischen Syndrom.....	18
2.5. Der Toll-Like-Rezeptor 4-Signalweg.....	19
2.6. Interaktion von TAK242 mit dem TLR4-Signalweg.....	23
3. Material und Methoden.....	24
3.1. Pathogene.....	24
3.2. In vitro.....	24
3.2.1. <i>Isolation humaner neutrophiler Granulozyten aus Vollblut</i>	24
3.2.2. <i>Behandlung der Zellen</i>	24
3.2.3. <i>Nachweis von cf-DNA mittels Kinetik-Fluoreszenzmessung</i>	25
3.2.4. <i>Nachweis humaner neutrophiler Elastase</i>	25
3.2.5. <i>Durchflusszytometrie von Annexin V und Propidium Iodid</i>	25
3.2.6. <i>qPCR für IRF3 und IRF5</i>	26
3.2.7. <i>Immunofluoreszenz neutrophiler Granulozyten für MPO, H3cit und DNA</i>	26

3.3. In vivo-Versuche.....	28
3.3.1. Beschreibung des HUS-Mausmodells.....	28
3.3.2. Bestimmung der murinen <i>cf</i> -DNA.....	28
3.3.3. Bestimmung der murinen neutrophilen Elastase.....	29
3.3.4. Bestimmung der murinen Myeloperoxidase.....	29
3.4. Statistische Auswertung	29
4. Ergebnisse.....	30
4.1. In vitro-Versuche.....	30
4.1.1. Bestimmung von <i>cf</i> -DNA im Zeitverlauf.....	30
4.1.2. Durchflusszytometrie von Annexin V und Propidium Iodid.....	32
4.1.3. Bestimmung der humanen neutrophilen Elastase.....	33
4.1.4. Messung des zellulären Calcium-Einstroms durch Fluo8.....	35
4.1.5. Immunofluoreszenz neutrophiler Granulozyten für MPO, H3cit und DNA.....	37
4.1.6. qPCR für IRF3 und IRF5.....	40
4.2. In vivo-Versuche.....	42
4.2.1. Bestimmung der <i>cf</i> -DNA im Blutplasma.....	42
4.2.2. Bestimmung der neutrophilen Elastase im Blutplasma.....	43
4.2.3. Bestimmung der Myeloperoxidase im Blutplasma.....	44
4.2.4. Vergleich des Überlebens von Wildtyp und TLR4-Knockout.....	44
5. Diskussion.....	46
5.1. In vitro-Versuche.....	46
5.1.1. <i>cf</i> -DNA.....	46
5.1.2. qPCR von IRF3 und IRF5.....	47
5.1.3. Neutrophile Elastase.....	47
5.1.4. Calcium-Einstrom.....	48
5.1.5. Immunofluoreszenz von MPO, H3cit und DNA.....	48
5.2. In vivo-Versuche.....	48
5.2.1. Limitationen des in vivo-Versuchs.....	49
5.2.2. NETose durch Shiga-Toxin 2 und TLR4-Rezeptor.....	50

6. Zusammenfassung.....	51
7. Summary.....	52
8. Anhang.....	53
9. Literaturverzeichnis.....	67
10. Danksagung.....	77
11. Lebenslauf.....	78
12. Eidesstattliche Versicherung.....	79

Abkürzungsverzeichnis

A/E lesions	Attach and efface lesions
ADAMTS13	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13
cf-DNA	Cell-free DNA
EHEC	Enterohämorrhagischer Escherichia coli
Esp	Escherichia coli secreted proteins
GB3C-Rezeptor	Globotriaosylceramide-Rezeptor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
H3cit	Citrullinated histone H3
HUS	Hämolytisch Urämisches Syndrom
IL-8	Interleukin 8
IRF3/IRF5	interferon regulatory transcription factor 3/5
KO	Knockout
LDH	Lactathydrogenase
LEE	Locus of enterocyte effacement
LPS	Lipopolysaccharide
MAC	Membrane attack complex
MCP1	Monocyte chemotactic protein
MD2	Myeloid Differentiation Factor 2
MPO	Myeloperoxidase
MyD-88	Myeloid differentiation factor 88
NE	Neutrophile Elastase
NETs	Neutrophile extracellular traps (dt.: Neutrophile extrazelluläre Fallen)
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
PAD4	Peptidyl-Arginin-Deiminase-4
STEC	Shigatoxin bildende Escherichia coli/Shigatoxin producing Escherichia coli
Stx	Shiga-Toxin
Tir	Translokierter Intimin-Rezeptor

TLR	Toll-like-Rezeptor
TLRC	Toll-like receptor complex
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
vWF	von-Willebrand-Faktor

1. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist im ersten Schritt der Nachweis der NETose nach Stimulation neutrophiler Granulozyten mit Shiga-Toxin 2 *in vitro*. Im zweiten Schritt soll der Einfluss des TLR4-Rezeptorhemmers TAK242 auf die NETose eruiert werden. In einer Studie von Khan et al. 2017 konnte bewiesen werden, dass sich die durch LPS induzierte NETose durch TAK242 reduziert. Nun soll nun überprüft werden, ob dies auch nach Stimulation durch Shiga-Toxin 2 eintritt.

Aufgrund der limitierten Aussagekraft der *in vitro* Versuche erfolgt im zweiten Schritt die vergleichende Bestimmung der NET-Parameter in einem HUS-Mausmodell zwischen Wildtyp und einem TLR4-Knockout. Verglichen werden soll auch eine eventuell bestehende Differenz in der Schwere der Beeinträchtigung oder Mortalität im Versuch. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Beurteilung der Frage, ob die Inaktivität des Toll-like-Rezeptor-4 zu einer geringeren Krankheitsaktivität führt.

Um diese Ziele zu erreichen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Bestimmung der etablierten NETose Nachweise cf-DNA, neutrophile Elastase, Calcium-Einstrom und Immunofluoreszenz von Myeloperoxidase, H3cit sowie cf-DNA bei frisch isolierten neutrophilen Granulozyten freiwilliger Spender nach Exposition gegenüber Shiga-Toxin 2
2. Vergleich dieser Parameter nach Inkubation mit TAK242
3. Bestimmung der Aktivität des TLR4-Signalwegs durch IRF3 und IRF5 mittels qPCR nach Inkubation mit Shiga-Toxin 2 und TAK242
3. FACS von Annexin V und Propidium Iodid (PI) zum Ausschluss der cf-DNA Genese aus apoptotischen oder nekrotischen Prozessen
4. Bestimmung der NETose-Parameter neutrophile Elastase, Myeloperoxidase und cf-DNA im Blutplasma von Mäusen des Typs C57/B16 sowie TLR4-Knockouts desselben genetischen Hintergrunds
5. Vergleich der Belastungssituation und Mortalität bei C57/B16 versus TLR4-Knockout

2. Einleitung

2.1. Das Hämolytisch-Urämische Syndrom

2.1.1. Definition

Das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) wurde erstmalig 1955 von Gasser et al. beschrieben (Gasser, Gautier et al. 1955). Es ist durch eine Trias von hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und einer akuten Nierenfunktionseinschränkung charakterisiert. Pathophysiologisch handelt es sich um eine thrombotische Mikroangiopathie (Fakhouri, Zuber et al. 2017), die mehrheitlich im Anschluss an eine Infektion mit enterohämorrhagischem Escherichia coli (EHEC) oder seltener Shigella dysenteriae Typ 1 auftritt. Sie wird im Wesentlichen durch deren Shiga-Toxin (Stx) verursacht (Jeong, Park et al. 2018).

Bei 10% der Patienten tritt die oben genannte Symptomtrias jedoch durch eine Fehlregulation des Komplementsystems auf und wird dann als atypisch klassifiziert (Fakhouri, Zuber et al. 2017). In dieser Arbeit wird im Folgenden das mit EHEC assoziierte HUS im pädiatrischen Patientenkollektiv betrachtet.

2.1.2. Klinik

Nach Ingestion von EHEC entwickeln Patienten nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 3-7 Tagen zunächst Bauchschmerzen (Bell, Goldoft et al. 1994). Bei 95 % treten im weiteren Verlauf blutige Diarrhoen auf (Ostroff 1989), die meist Anlass zur erstmaligen ärztlichen Konsultation sind. Beim häufigsten mit HUS assoziierten EHEC-Serotyp O157:H7 entwickeln circa 15 % der Erkrankten 5-13 Tage nach Symptombeginn die typische Trias des HUS (Chandler, Jelacic et al. 2002, Tarr, Gordon et al. 2005). Zu den Begleitsymptomen zählen Fieber (30 %) sowie Erbrechen und Übelkeit (50 %) (Scheiring, Andreoli et al. 2008).

Die ursächlichen Mechanismen für die Entwicklung eines HUS nach EHEC-Infektion bei lediglich einem Teil der Infizierten ist nicht abschließend geklärt. Als prädisponierende Faktoren werden jedoch in der Literatur diskutiert:

- Patientenalter < 5 Jahren
- weibliches Geschlecht
- Antimotilitätsmedikation
- blutige Diarrhoe
- Fieber

- Erbrechen
- Leukozytose
- Antibiotikaeinsatz¹

(Scheiring, Andreoli et al. 2008)

¹ *widersprüchliche Datenlage, siehe 2.1.6 Therapie*

Laborchemisch zeigt sich eine hämolytische Anämie mit erniedrigtem Hämoglobin sowie erhöhter Laktatdehydrogenase. Ursache dieser Anämie ist eine mechanische Schädigung der Erythrozyten durch Mikrothrombosierungen, insbesondere in der Niere. Analog dazu entwickelt sich eine Thrombozytopenie bei erhöhtem Verbrauch durch Koagulation. Im Rahmen des akuten Nierenversagens treten neben erhöhten Harnstoff- und Kreatininwerten sekundäre Elektrolytverschiebungen auf. Symptomatisch äußert sich dies durch eine Oligurie bis Anurie. Bei Urinuntersuchungen sind Hämaturie, Proteinurie und Hämoglobinurie als Ausdruck der renalen Beteiligung typisch (Scheiring, Andreoli et al. 2008).

Ein Nachweis des Shiga-Toxins ist bei zwei Drittel der Patienten durch die Anfertigung einer Stuhlkultur möglich. Außerdem kann die Bestätigung der Diagnose mittels PCR erfolgen. Ein serologischer Nachweis durch IgM-Antikörper gegen EHEC kann versucht werden, wenn mittels Stuhlkultur oder PCR kein Erregernachweis gelingt (Mody, Luna-Gierke et al. 2012, Müller 2016).

2.1.3. Epidemiologische Daten

Ein HUS tritt nach Aufnahme von EHEC keinesfalls zwingend auf. Laut Hochrechnungen ist weltweit von über 2,8 Millionen Erkrankungen bei Kindern und Erwachsenen durch EHEC auszugehen, davon entwickeln 3.890 der Betroffenen ein HUS. 1.630 der Patienten zählen dabei zur Altersgruppe der 0-4-Jährigen und 720 zu den 5-15-Jährigen (Majowicz, Scallan et al. 2014). Hauptsächlich betroffen ist die Altersgruppe der unter 5-Jährigen. Hier beträgt die Inzidenz in Deutschland 1,17/100.000. Mit zunehmendem Alter sinkt sie bei Patienten unter 15 Jahren auf 0,71/100.000 (Gerber, Karch et al. 2002).

Die global größte Inzidenz tritt aufgrund rezidivierender EHEC-Endemien in Lateinamerika auf und liegt bei 10-17/100.000 Kindern unter 5 Jahren (Rivas, Chinen et al. 2014). Aufgrund dessen gilt das hämolytisch urämische Syndrom als häufigste

Ursache für ein akutes Nierenversagen bei Kindern unter 5 Jahren (Nathanson, Kwon et al. 2010).

Hauptreservoir des EHEC sind Rinder, bei denen sie häufig als Teil der kommensalen Darmflora nachweisbar sind (Armstrong, Hollingsworth et al. 1996, Naylor, Gally et al. 2005). Als Hauptinfektionswege gelten daher unzureichend gegartes Rindfleisch oder kontaminiertes und nicht gewaschenes, rohes Gemüse. Selten beschrieben ist auch eine fäkal-orale Übertragung von Mensch zu Mensch oder eine Ansteckung durch den Kontakt zu Rindern in Viehbetrieben (Armstrong, Hollingsworth et al. 1996).

Der beim HUS erstmals nachgewiesene und häufigste Serotyp ist O157:H7. Dieser ist wahrscheinlich weltweit für 2.000 Neuerkrankungen jährlich verantwortlich. Non-O157:H7 Typen gewinnen jedoch zunehmend an Bedeutung (Majowicz, Scallan et al. 2014, Joseph, Cointe et al. 2020).

2.1.4. Komplikationen

Als typische Komplikationen des HUS gelten extrarenale Manifestationen der thrombotischen Mikroangiopathie. Häufigste Lokalisation und zugleich assoziiert mit einer schlechteren Prognose und ausgeprägter renalen Schädigung ist die Beteiligung des zentralen Nervensystems (Khalid and Andreoli 2018). Diese tritt bei 29 % der Patienten in der Akutphase auf (Rosales, Hofer et al. 2012). Das Spektrum der neurologischen Symptomatik reicht hierbei von Krampfanfällen und pyramidalen sowie extrapyramidalen Bewegungsstörungen bis zu Bewusstseinsstörungen. Bei nur 50 % dieser Patienten ist die vollständige Rückbildung der neurologischen Beeinträchtigung zu erwarten (Nathanson, Kwon et al. 2010).

Des Weiteren entwickelt sich in der Akutphase häufig ein arterieller Hypertonus (bis zu 36 %) (Loos, Ahlenstiel et al. 2012), bedingt durch ein hohes zirkulierendes Volumen sowie Elektrolytverschiebungen aufgrund der akuten Nierenschädigung.

Seltener kommt es zu einer Pankreatitis, die durch erhöhte Amylase und Lipase auffällt. Bei einem geringen Prozentsatz bilden sich dabei Nekrosen im Pankreas. Als Folge ist jedoch eine endokrine oder exokrine Beeinträchtigung bis zur Entstehung eines Insulin-abhängigen nicht-autoimmunen Diabetes möglich (Andreoli and Bergstein 1982). In Untersuchungen trat passager in der akuten Phase bei 3,2-6,6 % der erkrankten Kinder eine Glucoseintoleranz mit Hyperglykämie auf, die zum Teil eine Therapie mit Insulin notwendig machte (Robson, Leung et al. 1995, Suri, Clark et al. 2005). Zu weiteren

möglichen abdominellen Komplikationen zählen Darmischämien oder -nekrosen (Saltzman, Chavers et al. 1998).

Selten beobachtet werden kardiovaskuläre Komplikationen im Sinne einer Herzinsuffizienz, eines Perikardergusses, einer eingeschränkten Myokardfunktion oder einer linksventrikulären Herzmuskelhypertrophie. In Einzelfällen können okuläre Komplikationen auftreten. Berichtet wurde von einer retinalen Blutung sowie ischämischen Läsionen entlang des Nervus opticus (Geraissate, Yamamoto et al. 2014, Loudon, Dorresteijn et al. 2014).

Unter adäquater medizinischer Behandlung verlaufen 1-5 % der Erkrankungen letal (Vaisbich 2014). Risikofaktoren für das Eintreten des Todes in der Klinik bei Kindern sind:

- Leukozyten > 41.900 Zellen/ml
- Leukozyten 25.400-41.900 Zellen/ml und Hämatokrit > 19,6 %
- Leukozyten > 25.400 Zellen/ml und kürzlich stattgehabte respiratorische Infektion

(Mody, Gu et al. 2015)

2.1.5. Folgeschäden

Nach dem Ende der akuten Erkrankung leiden 30 % der HUS-Patienten unter Folgeschäden. Es wurden folgende Risikofaktoren für deren Auftreten beschrieben:

- Leukozyten > 20.000 Zellen/ml
- Plasmaaustausch in akuter Phase
- Dialysedauer
- Hypertonus in der akuten Phase
- Hämoglobin > 5,6 mmol/l

(Rosales, Hofer et al. 2012)

Als Ausdruck einer ausgeprägten renalen Beeinträchtigung entwickeln 12 % der Patienten im Verlauf eine chronische Niereninsuffizienz im Endstadium (Garg, Suri et al. 2003). Zu weiteren häufigen Folgeschäden gehören eine Proteinurie (18 %), arterielle Hypertonie (9 %), reduzierte GFR (7 %) und eine persistierende neurologische Symptomatik (4 %). Patienten, die im ersten Jahr keine Folgeschäden aufwiesen,

entwickelten diese zum Teil im weiteren Verlauf. Daher sind lange Nachuntersuchungen notwendig (Rosales, Hofer et al. 2012).

2.1.6. Therapie

Eine spezifische Behandlung des HUS steht bislang nicht zur Verfügung, sodass supportive Maßnahmen den Grundstein der Therapie bilden (Müller 2016).

Der gezielte Einsatz von Antibiotika ist in der Literatur umstritten, da es Hinweise dafür gibt, dass dieser das Risiko für die Entwicklung eines HUS nach EHEC-Infektion signifikant erhöht. So war in einer Studie der Anteil in der Gruppe der antibiotisch behandelten Kinder dreimal höher (Wong, Mooney et al. 2012). Da dem widersprechend ebenfalls Studien vorliegen, die keinen oder einen protektiven Effekt nachweisen, ist das Risiko-Nutzen-Verhältnis weiterhin unklar (Agger, Scheutz et al. 2015).

Außerdem gibt es keine Evidenz für den Einsatz von Immunglobulinen oder Plasmainfusionen. In der Vergangenheit erfolgten vereinzelt Plasmapherese und die Gabe des Komplementinhibitors Eculizumab als probatorischer Behandlungsversuch. Auch für diese Therapie gibt es jedoch weiterhin keine Evidenz (Menne, Nitschke et al. 2012, Dinh, Anathasayanan et al. 2015, Müller 2016).

2.2. Pathophysiologie des Hämolytisch-Urämischen Syndroms

2.2.1. *E. coli* O157:H7 und Shiga-Toxin

Die nähere Klassifizierung eines *Escherichia coli* erfolgt über O- und H-Serogruppen. O-Antigene sind Kohlenhydrate und Bestandteil des Lipopolysaccharids gramnegativer Bakterien auf der Zelloberfläche. Bei dem H-Antigen handelt es sich um ein Protein der Flagellen (Wolf 1997).

Die nötige Bakterienlast für eine Infektion mit dem häufigsten HUS-assoziierten EHEC O157:H7 ist außerordentlich niedrig. Gastroenteritiden und HUS-Erkrankungen wurden bereits beim Verzehr von < 700 Bakterien beobachtet (Tuttle, Gomez et al. 1999).

Das Shiga-Toxin ist der größte pathogene Faktor des EHEC und kommt je nach Unterform in verschiedenen Varianten vor. Shiga-Toxin 2 (Stx 2) ist dabei die Form, die im Wesentlichen das Hämolytisch-Urämische Syndrom verursacht (Ogura, Mondal et al. 2015).

2.2.2. Von der Inokulation des EHEC zum Hämolytisch-Urämischen Syndrom

Nach der Ingestion des EHEC erfolgt die Bindung des einzelnen Bakteriums an A/E Läsionen (= „attach and efface lesions“) im menschlichen Kolon (Moon, Whipp et al. 1983). Diese Bindungsstelle ist im „locus of enterocyte effacement“ (LEE) des Bakteriums kodiert (McDaniel and Kaper 1997). Außerhalb des LEE (non-LEE) befindet sich die genetische Information für 17 weitere Effektoren, Insertionselemente und Prophagen. Diese non-LEE Effektoren sind notwendig, um die oben genannten A/E Läsionen in der menschlichen Darmmukosa zu verursachen (Cepeda-Molero, Berger et al. 2017).

Das LEE enthält außerdem Informationen für das Adhäsin Intimin, Chaperone, das Typ-3-Sekretionssystem des EHEC (T3SS, EspA, EspB, EspD), für 6 Effektormoleküle sowie den translokierten Intimin-Rezeptor (Tir) (Gaytan, Martinez-Santos et al. 2016). Viele dieser LEE-Effektorproteine, ausgenommen EspZ, vermitteln Cytotoxizität, die Reorganisation des Zytoskeletts und bedingen Elektrolytverschiebungen, die die charakteristische Diarrhoe verursachen (Guttman and Finlay 2008, Wong, Pearson et al. 2011). EspZ reguliert die zytotoxische Wirkung der Effektorproteine und verhindert so den sofortigen Zelltod (Berger, Crepin et al. 2012).

Nach der Anheftung kommt es, am ehesten durch Intimin und Tir vermittelt, zu einer Bindung an die apikale Plasmamembran des Enterozyten. Dadurch akkumuliert F-Aktin an dieser Stelle und die Mikrovilli des Enterozyten werden zerstört (Lai, Rosenshine et al. 2013). Es bilden sich sogenannte „pedestal-like-structures“ (Frankel and Phillips 2008). Das Shiga-Toxin gelangt infolgedessen durch perizellulären oder transzellulären Transport ins Blut (Malyukova, Murray et al. 2009). Erleichtert wird dies dadurch, dass die Blutgefäße des Kolons durch die A/E Läsionen bereits geschädigt sind (Savage, Campellone et al. 2007).

Das Shiga-Toxin des EHEC hat eine AB₅-Struktur mit einer enzymatischen A-Untereinheit und fünf B-Untereinheiten, die die Anhaftungsstelle bilden (Fraser, Fujinaga et al. 2004).

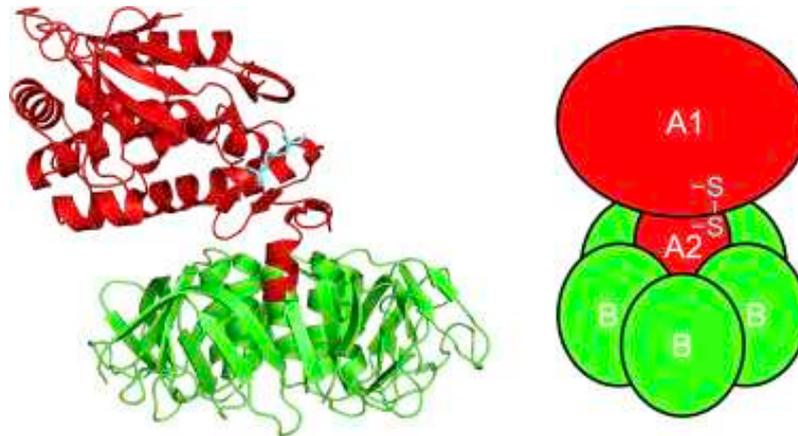


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Struktur des Shiga-Toxins (Sandvig 2015)

Als Bindungsstelle der B-Untereinheiten gilt beim Menschen vorrangig der Globotriaosylceramid-Rezeptor (Gb3-Rezeptor). In besonders großer Dichte ist dieser auf den glomerulären Endothelzellen exprimiert, wodurch die Nieren vorrangig geschädigt werden (Boyd and Lingwood 1989, Rutjes, Binnington et al. 2002, Okuda, Tokuda et al. 2006).

Der Komplex aus Shiga-Toxin 2 und dem Gb3-Rezeptor wird nach der Bindung endozytotisch aufgenommen und retrograd über den Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum transportiert (Sandvig, Garred et al. 1992). Dort wird die A-Untereinheit proteolytisch prozessiert, sodass ein A1-Fragment mit N-Glucosidaseaktivität entsteht. Dieses A1-Fragment gelangt in das Zytosol der Endothelzelle und spaltet ein Adenin von der 28s-rRNA, die für die 60-S-Untereinheit der eukaryotischen 80-S-Ribosomen codiert, ab. Durch Inhibition der Bildung neuer Ribosomen kann in der Zelle anschließend keine Transkription und somit keine Proteinbiosynthese stattfinden (Endo, Tsurugi et al. 1988, Saxena, O'Brien et al. 1989).

In *in vitro* Versuchen wurde beobachtet, dass Lipopolysaccharid, als weiterer pathogener Cofaktor des EHEC, die Wirkung von Shiga-Toxin auf die Proteinbiosynthese verstärken kann (Louise and Obrig 1992). Auch gibt es im Primatenmodell Hinweise, dass LPS die Konzentration von GB3-Rezeptoren erhöht und so die Sensitivität gegenüber Shiga-Toxin steigert (Clayton, Pysher et al. 2005). Zusätzlich kann es durch Freisetzung prothrombotisch wirkender Chemokine und Adhäsionsmoleküle sowie durch Aktivierung des Komplementsystems die Entstehung von Thrombosen begünstigen (Matussek, Lauber et al. 2003, Zoja, Buelli et al. 2017).

Zu den möglichen pathohistologischen Merkmalen des HUS zählt die intraglomeruläre Thrombose (*Abbildung 3a*) sowie die Infiltration neutrophiler Granulozyten in den Glomerulus (*Abbildung 3b*) (Inward, Howie et al. 1997). Außerdem möglich ist eine Verdickung der Gefäßwände, ein Endothel-Zell-Ödem, die Ablösung der Basalmembran sowie Ansammlung von Trümmern im subendothelialen Raum (Vaisbich 2014).

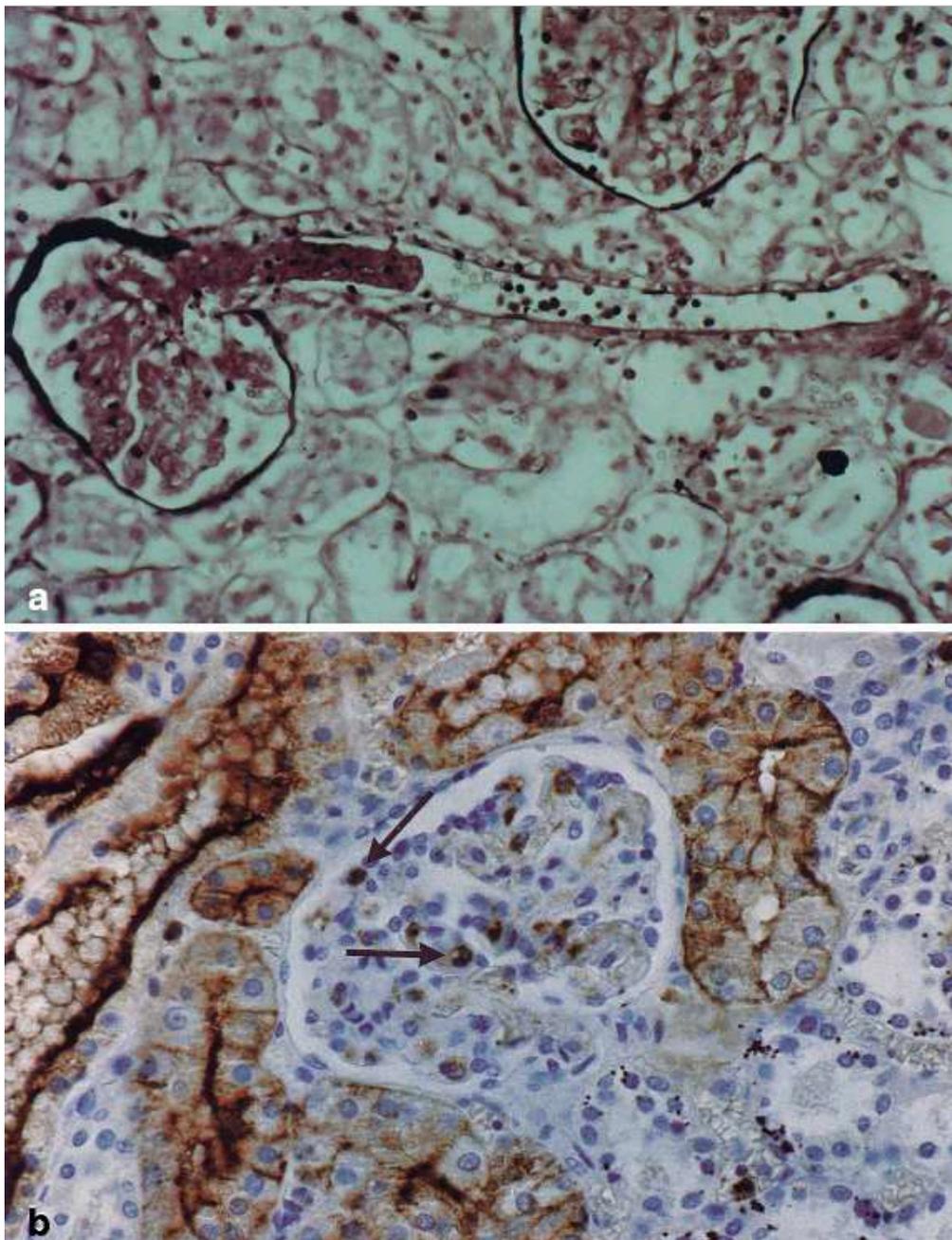


Abbildung 2: humane Niere beim HUS, a) 60-fache Vergrößerung mit Periodic Acid-Silber-Färbung b) 100-fache Vergrößerung mit Immunoperoxidase-Färbung für CD15 (Inward, Howie et al. 1997)

2.2.3. Aktivierung zellulärer Signalkaskaden durch Shiga-Toxin

Die Aktivierung verschiedener Signalwege durch Shiga-Toxin wurde beschrieben. EHEC kann durch einen alternativen Weg direkt das Komplementsystem stimulieren. Durch Spaltung entsteht vermehrt der Komplementfaktor C5a, der wiederum neutrophile Granulozyten aktiviert. Außerdem entsteht ein antibakteriell wirkender „membrane attack complex“ (MAC.) Parallel wirkt C5a aber auch auf andere Zellen des Körpers und verursacht so beispielsweise die intravasale Hämolyse von Erythrozyten. Dadurch sinkt die Konzentration von Stickstoffmonoxid im Blut und durch die Verminderung dessen vasodilatatorischer Wirkung verengen sich die Blutgefäße. Dieser Prozess fördert die Blutgerinnung, was wiederum das Komplementsystem stärker aktiviert. Auch der MAC und C5a wirken auf Thrombozyten proaggregatorisch. Endothelzellen setzen bei einer Schädigung durch Shiga-Toxin den prokoagulatorisch wirkenden „Tissue Factor“ (TF) frei. So verursacht die Aktivierung zahlreicher thrombotisch wirkender Signalwege Thrombosen im mikrovaskulären System, insbesondere der Niere. Dies führt zu einer Gewebsschädigung und infolgedessen zu einer Einschränkung der Nierenfunktion (Jokiranta 2017). Durch diese Schädigung des Gewebes wird zusätzlich der von-Willebrand-Faktor (vWF) frei (Nolasco, Turner et al. 2005).

Shiga-Toxin aktiviert außerdem den NFκB-Signalweg, der in der Freisetzung von Chemokinen und MCP-1 aus Monozyten mündet. Diese fördern die Aggregation von Leukozyten (van Setten, Monnens et al. 1996, Zoja, Angioletti et al. 2002).

Auch der Toll-like-Receptor 4 (TLR4) kann Shiga-Toxin 2 binden. Infolgedessen kommt es zu einer Ausschüttung von Zytokinen, ebenso wie bei der Stimulation mit LPS (Brigotti, Carnicelli et al. 2013).

2.3. „Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs)

„Neutrophil extracellular traps“ (NETs) sind Teil der angeborenen Immunantwort gegen extrazelluläre Erreger und entstehen aus neutrophilen Granulozyten in einem Prozess namens NETose. Dabei bildet sich ein Komplex aus Histonen, dekondensierter DNA und antibakteriell wirkenden Proteinen, wie der neutrophilen Elastase (NE) oder Myeloperoxidase (MPO). Aktiviert wird die NETose durch eine Vielzahl an Pathogenen (Brinkmann, Reichard et al. 2004) und kann als neue Form des Zelltods bezeichnet werden (Fuchs, Abed et al. 2007).

Der Großteil der DNA neutrophiler Granulozyten im nicht aktivierten Zustand liegt als Heterochromatin im Nukleus vor (Wang, Li et al. 2009). Die Trigger der NETose binden

an Rezeptoren der Zelloberfläche. Ein Beispiel hierfür ist der TLR4-Rezeptor. Diese Bindung induziert im Anschluss eine Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Dies aktiviert wiederum die Proteinkinase C (PKC), was zur Aktivierung der NADPH-Oxidase auf Zellmembranen und Lysosomen führt. Es wird Superoxid generiert, das mit Wasser und Chlorid zu Hypochlorit reagiert. Diese Reaktion aktiviert PAD4, das in den Zellkern transloziert, wo es die Hypercitrullination von Histon 3 (H3cit) und 4 verursacht. H3cit ist ein grundlegender struktureller Bestandteil der NETs (Law and Gray 2017, Wang, Li et al. 2009).

Die neutrophile Elastase und Myeloperoxidase sind Enzyme, die in Granula neutrophiler Granulozyten intrazellulär gespeichert werden. Molekular könnte die Freisetzung durch Reactive Oxygen Species (ROS) initiiert werden. Nach der Freisetzung beider Enzyme transloziert NE zuerst in den Zellkern. Dort schwächt es zusätzlich die Histone und fördert die Dekondensation des Chromatin. Bei der Bindung von MPO an diese Strukturen im Verlauf wird die Dekondensation weiter verstärkt. Diese synergistische Wirkung könnte der Grund für die Freisetzung der NETs sein (Papayannopoulos, Metzler et al. 2010). Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung, dass MPO-defiziente Menschen keine NETs generieren können (Metzler, Fuchs et al. 2011). Auch Patienten mit einer Beeinträchtigung der NADPH-Oxidase, die kein ROS generieren können, formen keine NETs (Fuchs, Abed et al. 2007).

Beide Enzyme verfügen außerdem über antibakterielle Eigenschaften und unterstützen so die Erregerabwehr. Bei NE-KO Mäusen wurde ein verringertes Überleben nach Infektion durch *E. coli* beobachtet (Belaouaj, Kim et al. 2000). Analoge Ergebnisse erbrachten Versuche mit MPO-KO Tieren in einem Sepsismodell. Die Autoren vermuten als Ursache eine antibakteriell wirkende Reaktion von Wasserstoffperoxid und Chlorid zu hypochloriger Säure (Gaut, Yeh et al. 2001).

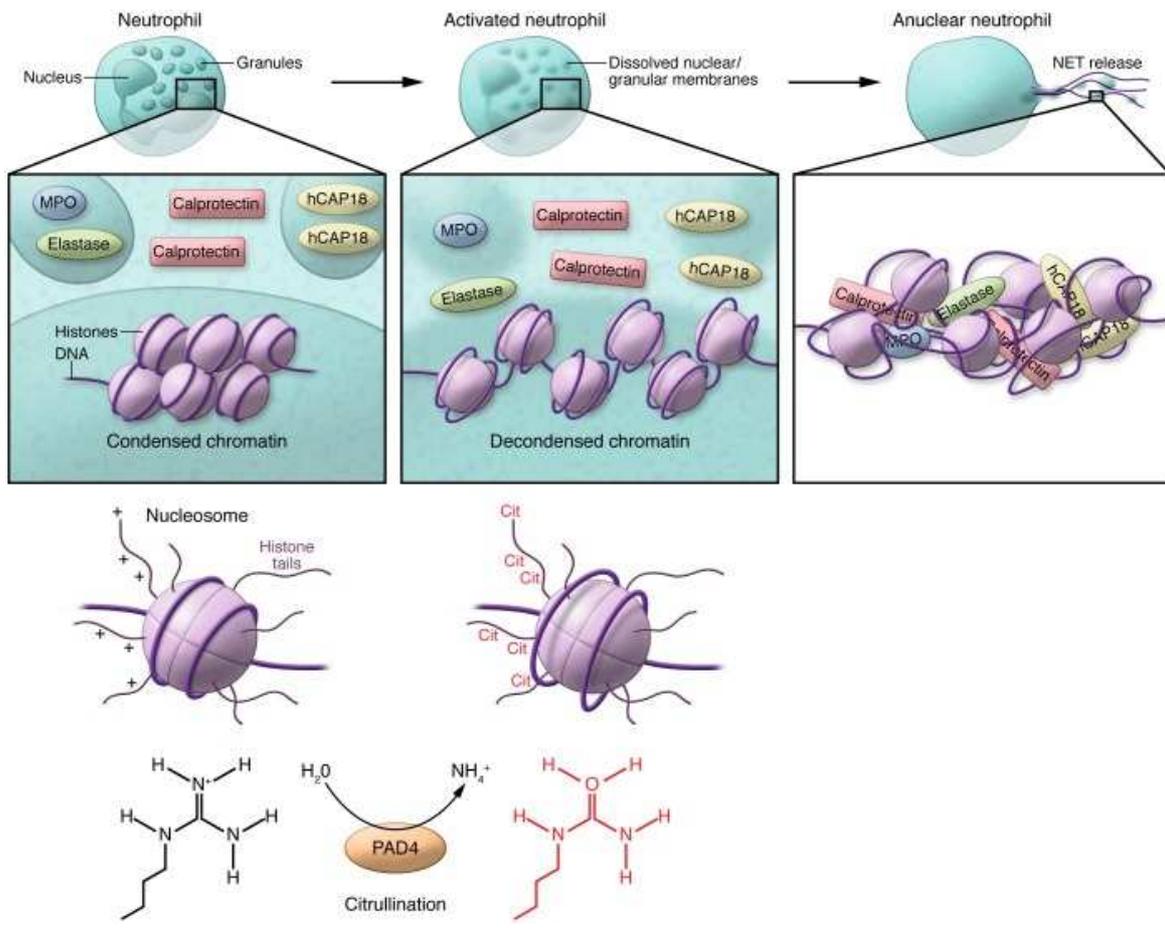


Abbildung 3: Graphische Darstellung der NETose (Sorensen and Borregaard 2016)

Die Beteiligung von NETs konnte schon bei zahlreichen Krankheitsbildern nachgewiesen werden, darunter die Sepsis, Thrombosen, Wundheilungsstörungen (Fadini, Menegazzo et al. 2016), Krebserkrankungen sowie autoimmunologischen Erkrankungen (Papayannopoulos 2018).

2.4. Stellenwert der NETose beim Hämolytisch-Urämischen Syndrom

Durch vermehrte NETose und verminderten Abbau durch körpereigene DNasen ist die Konzentration von NETs im Blut von HUS-Patienten signifikant höher als im Blut Gesunder (Ramos, Mejias et al. 2016, Leffler, Prohaszka et al. 2017). Als Ursache der verminderten DNase-Aktivität, die bei über 50 % der Patienten festgestellt wurde, lässt sich eine Hemmung des Enzyms durch Aktin und ATP aus geschädigtem Gewebe vermuten (Leffler, Prohaszka et al. 2017).

Auch zeigt sich eine erhöhte Bereitschaft neutrophiler Granulozyten zur NETose *ex vivo*. Die Ursache dafür könnte eine stattgefunden Stimulation dieser *in vivo*, unter anderem

durch Shiga Toxin und Integrine, sein. *In vitro* konnte bereits nachgewiesen werden, dass Shiga-Toxin 2 NETose initiieren kann (Ramos, Mejias et al. 2016).

NETs selbst können die Entstehung von Thromben fördern, indem sie ein Grundgerüst für die Anlagerung von Thrombozyten durch Interaktion mit Fibrinogen bilden (Fuchs, Brill et al. 2010). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es bei der Aktivierung der neutrophilen Elastase zur Freisetzung des prothrombotisch wirkenden „Tissue Factors“ kommt (Massberg, Grahl et al. 2010). *In vitro* und *in vivo*-Versuche zeigten außerdem, dass NETs Komplexe mit Fibrin eingehen und so Thromben stabilisieren können (Fuchs, Brill et al. 2010). Somit verfügen sowohl das Shiga-Toxin 2, wie in Absatz 2.2.3. beschrieben, als auch NETs über prothrombotische Eigenschaften, die in Zusammenhang mit der thrombotischen Mikroangiopathie beim HUS stehen könnten.

2.5. Der Toll-Like-Rezeptor 4-Signalweg

Erstmals wurde das Toll-like-Gen 1985 in *Drosophila* beschrieben (Anderson, Jurgens et al. 1985). Seitdem konnten beim Menschen zehn verschiedene Toll-like Rezeptoren identifiziert werden (Matsunaga, Tsuchimori et al. 2011).

Diese Rezeptoren sind keimbahncodiert und werden von den Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert. Eine Aktivierung erfolgt durch spezifische Strukturen auf Pathogenen, genannt „Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs). Als Folge dieser Interaktion kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen und Aktivierung weiterer Zellen des angeborenen Immunsystems auf das entsprechende Pathogen (Lu, Yeh et al. 2008).

Ein Rezeptor dieser Gruppe ist der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4). Der bekannteste Aktivator ist Lipopolysaccharid, welches als Baustein der äußeren Membran gramnegativer Bakterien dient. Um die Interaktion von LPS mit dem TLR4-Rezeptor zu vermitteln sind verschiedene Adaptormoleküle notwendig. Der „Myeloid Differentiation Factor 2“ (MD2) ist ein lösliches Protein, welches LPS binden kann. Ebenso bindet das „LPS-binding-Protein“ (LBP) LPS und erleichtert die Assoziation mit CD14. Diese glycosylphosphatidylinositol-verankerte Domäne wiederum ermöglicht die Bindung von LPS zum TLR4/MD-2 Rezeptor Komplex (Lu, Yeh et al. 2008).

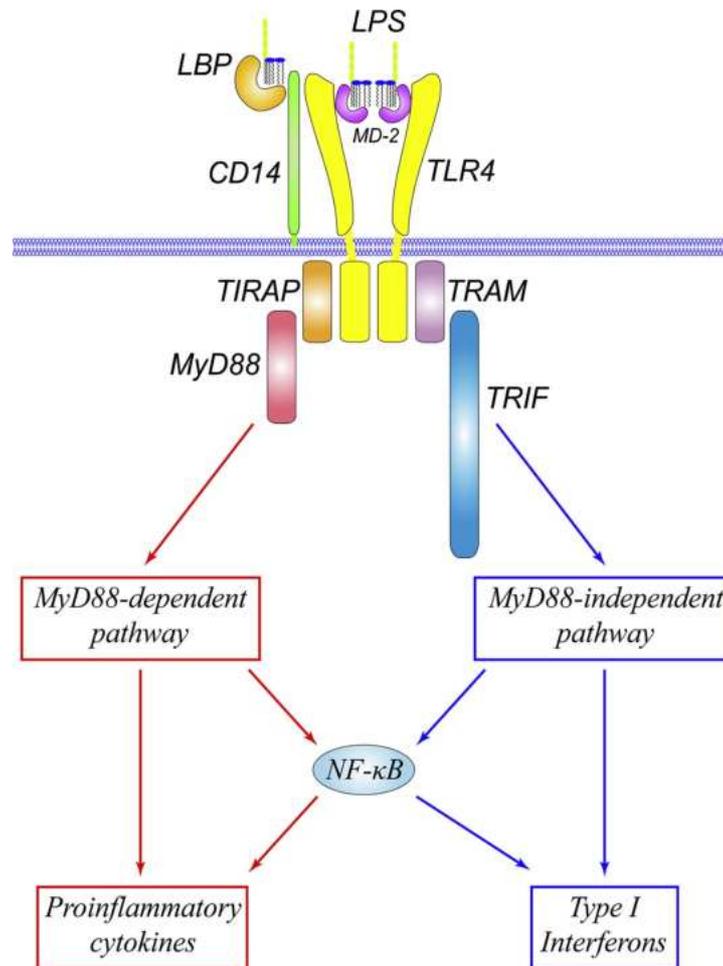


Abbildung 4: Übersicht über die beteiligten Moleküle bei Bindung von LPS an den TLR4-Rezeptor (Lu, Yeh et al. 2008)

Nach der Erkennung eines bekannten Bindungspartners wie zum Beispiel LPS (Abbildung 4), erfolgt eine Oligomerisation und Stimulation der weiteren Adaptormoleküle, wie „Toll-interleukin-1 receptor“ (TIR) Domänen. Diese bestehen aus 3 Untereinheiten, die jeweils die verschiedenen Interaktionen zwischen Proteinen und TLR ermöglichen. Zu den TIR-Domänen enthaltenen Adaptorproteinen des TLR4-Rezeptors zählen „myeloid differentiation primary response gene 88“ (MyD88), „TIR domain-containing adaptor protein“ (TIRAP), „TIR domain-containing adaptor inducing IFN-beta“ (TRIF), „TRIF-related adaptor molecule“ (TRAM) und „sterile alpha and HEAT-Armadillo motifs-containing protein“ (SARM). Die weitere Signaltransduktion teilt sich in einen MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen, TRIF-abhängigen Weg (Lu, Yeh et al. 2008).

MyD88 enthält eine „death domain“, die mit anderen „death domain“ enthaltenen Adaptormolekülen interagieren kann. So folgt einer Aktivierung von MyD88 die Rekrutierung der „IL-1 receptor-associated kinase-4“ (IRAK-4), die sowohl eine „death-

domain“ als auch „kinase-domain“ enthält. Nach Aktivierung einer weiteren Kinase „Interleukin-1 associated kinase 1“ (IRAK-1) erfolgt die Aktivierung des Adaptormoleküls „TNF receptor-associated factor 6“ (TRAF 6), der wiederum die „transforming growth factor-beta-activated kinase 1“ (TAK 1) aktiviert. Es erfolgt die Ausschüttung weiter downstream gelegener Moleküle „I κ B kinase“ (IKK), die wiederum in der Sekretion von Transkriptionsfaktoren wie NF κ B münden (Lu, Yeh et al. 2008). Durch „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) Signalwege erfolgt die Ausschüttung des Transkriptionsfaktors „activator-protein-1“ (AP-1). IRF5 spielt als Transkriptionsfaktor ebenfalls eine gesonderte Rolle, da er wohl in direktem Kontakt mit MyD88 steht. Eine genaue Signalkaskade ist bisher unbekannt. Diese drei Transkriptionsfaktoren als Endstrecke des MyD88-abhängigen Wegs münden schließlich in der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (Lu, Yeh et al. 2008).

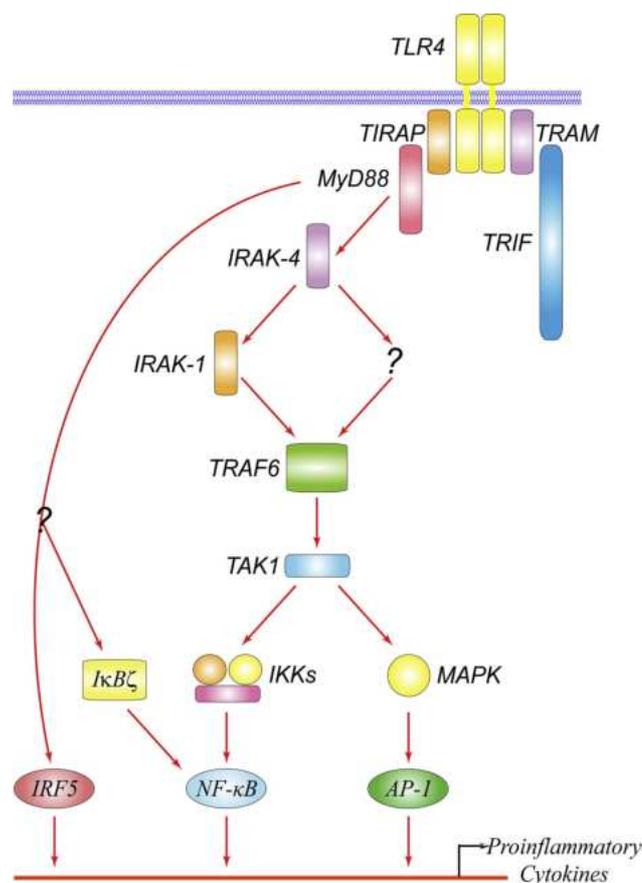


Abbildung 5: MyD88-abhängige Signalkaskade des TLR4 (Lu, Yeh et al. 2008)

Äquivalent zum MyD88 ist im MyD88-unabhängigen Signalweg das „TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β “ (TRIF). Dessen c-terminale Region vermittelt die Interaktion mit dem „serin/threonin kinase receptor-interacting protein 1“ (RIP1). Dies führt wiederum zur Aktivierung von MAPK und IKK-Signalwegen, wie auch beim MyD88-abhängigen Signalweg, mit konsekutiver Ausschüttung von den Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B. Des Weiteren vermittelt TRIF die Interaktion mit dem „TNF receptor-associated factor 3“ (TRAF3), welcher durch den „TRAF family member-associated NF κ B activator“ (TANK), die „TANK binding kinase 1“ (TBK1) und IKKi die Translokation des Transkriptionsfaktors IRF3 bedingt. Dadurch vermittelt wird wiederum die Translokation von Genen, unter anderem Typ 1-Interferonen (Lu, Yeh et al. 2008).

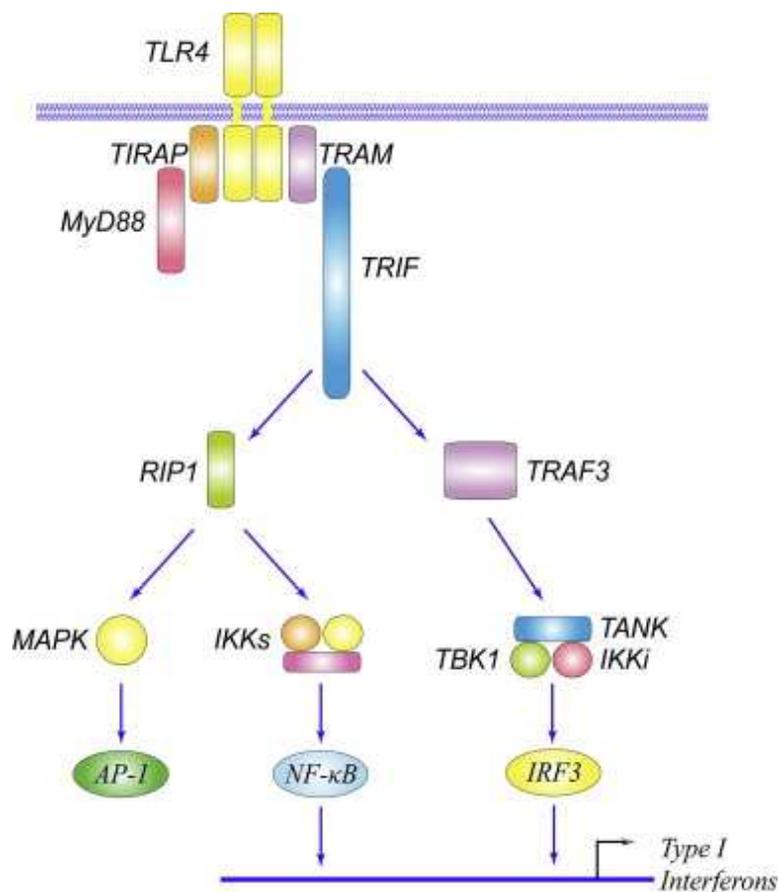


Abbildung 6: MyD88-unabhängige Signalkaskade des TLR4 (Lu, Yeh et al. 2008)

2.6. Interaktion von TAK242 mit dem TLR4-Signalweg

TAK242 wirkt als ein spezifischer Inhibitor des TLR4-Signalwegs durch Bindung an die intrazelluläre Domäne Cys747. Der genaue Wirkmechanismus ist nicht sicher beschrieben. Vermutet wird eine Hemmung der Protein-Protein-Interaktionen zwischen TLR4 und seinen Adaptormolekülen. Die Inhibierung der Interaktion von TLR4 mit „Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein“ (TIRAP) oder „interferon- beta- related adaptor protein“ (TRAM) durch TAK242 wurde beschrieben. Eine Bindung an die anderen bekannten Toll-like-Rezeptoren konnte ausgeschlossen werden (Matsunaga, Tsuchimori et al. 2011).

Entwickelt wurde TAK242 als mögliche Therapieoption bei Sepsis. Nach erfolgreicher Phase I Studie wurde die große multizentrische Studie vorzeitig abgebrochen. Eine Senkung der freien Zytokinlevel oder ein Überlebensvorteil konnten nicht nachgewiesen werden (Kuzmich, Sivak et al. 2017). Seither gab es viele Studien zum Einsatz von TAK242 bei anderen Krankheitsbildern. In Tierstudien zeigte sich nach Hemmung des TLR4-Rezeptors durch TAK242 eine Verminderung von hypoxisch-ischämischen Hirnschädigungen (Jiang, Xu et al. 2020), fibrotischen Erkrankungen wie der systemischen Sklerose (Bhattacharyya, Wang et al. 2018) oder beim akuten Nierenversagen durch Rhabdomyolyse (Huang, Zhou et al. 2017).

Der Einfluss des TLR4-Rezeptors auf die NETose durch LPS wurde bereits untersucht. Hier zeigte sich nach vorheriger Hemmung durch TAK242 die Freisetzung von cf-DNA signifikant verringert, was einen Zusammenhang zwischen dem TLR4 und der NETose schafft (Khan, Farahvash et al. 2017).

Der TLR4-Rezeptor wurde außerdem nachweisbar mit Krankheitsbildern assoziiert, bei denen NETs eine Rolle spielen. Ein Beispiel hierfür ist die nekrotische Enterokolitis. Hier korreliert die NETose mit der TLR4-Expression und dies wiederum mit dem Überleben von Mäusen im Mausmodell dieser Erkrankung (Vincent, Klinke et al. 2018).

3. Material und Methoden

Eine ausführliche Auflistung aller verwendeten Geräte und Materialien ist im Anhang unter IV (S.58) dargestellt. Der Versuchsaufbau wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (PV5921).

3.1. Pathogene

Das sowohl für die *in vitro*- als auch *in vivo*-Versuche verwendete Shiga-Toxin 2 wurde durch List Laboratories (USA) rekombinant nach der Sequenz des E.coli 0157:H7 produziert.

Das in den *in vitro*-Versuchen als Positivkontrolle verwendete Lipopolysaccharid (LPS) (Merck, Darmstadt, Deutschland) stammt vom E.coli 055:B5.

3.2. In vitro-Versuche

3.2.1. Isolation humaner neutrophiler Granulozyten aus Vollblut

Nach Einwilligung wurde freiwilligen Probanden Blut über Safety-Multifly-Kanülen (Sarstedt, Deutschland) abgenommen und in EDTA-Monovetten 7,5ml (Sarstedt, Deutschland) mit einem EDTA-Anteil von 1,6mg/ml Blut konserviert.

Die neutrophilen Granulozyten wurden direkt anschließend aus dem Vollblut mittels MACSxpress Neutrophil Isolation Kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) isoliert. Eine Lyse der Erythrozyten erfolgte durch Zugabe von 0,7M Kaliumchlorid. Die gewonnenen Zellen wurden anschließend für die Versuche in RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, USA) mit 1% BSA (Sigma-Aldrich, USA) überführt. Die Zählung der Zellen erfolgte durch Anfärbung mit Trypanblau (Sigma-Aldrich, USA).

Die Reinheit der Isolation nach dieser Methode und diesem Protokoll wurde bereits durch Schulz et al. untersucht und mit > 95 % angegeben (Schulz, Pagerols Raluy et al. 2020).

3.2.2. Behandlung der Zellen

Als Inhibitor des TLR4-Signalwegs wurde TAK242 (Merck, Darmstadt, Deutschland) in den Konzentrationen 500 nM und 5 nM verdünnt in RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, USA) mit 1% BSA (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Entsprechende Hintergrundkontrollen erfolgten mit der entsprechenden Konzentration DMSO. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂.

Anschließend wurden als potentielle Stimulatoren der NETose LPS (10 µg/ml) sowie Shiga-Toxin 2 (List Laboratories, USA) in den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 0,1 ng/ml und 0,01 ng/ml zugesetzt. Calcium wurde in einer Konzentration von 0,5 mM dem Medium zugesetzt.

3.2.3. Nachweis von cf-DNA mittels Kinetik-Fluoreszenzmessung

Nach der Isolation der neutrophilen Granulozyten wurden 1×10^5 Zellen pro Well auf einer 96-Well Platte (Corning Inc., USA) ausgesät. Anschließend wurden die Zellen für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Behandlung erfolgte wie unter 3.2.2. beschrieben.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 2,5 µM Sytox orange (Thermo Fisher Scientific, USA). Eine Hintergrundkontrolle erfolgte mit DMSO-versetztem Medium.

Die Fluoreszenz wurde sofort über einen Zeitraum von 6 Stunden alle 30 Minuten in einem FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, USA) bei 37 °C mit einer Exzitation von 544 nm und einer Emission von 590 nm (Cutoff 570 nm) gemessen.

3.2.4. Nachweis humaner neutrophiler Elastase

Auf einer schwarzen 96-Well Platte wurden $0,8 \times 10^5$ Zellen pro Well ausgesät und wie in 3.2.2. beschrieben behandelt. Anschließend wurden 250 µM MeOSuc-AAPV-pNA (Cayman Chemicals, USA) hinzugegeben. Die Absorption wurde bei 405 nm für 8 Stunden bei 37 °C mit einem FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, USA) gemessen.

3.2.5. Durchflusszytometrie von Annexin V und Propidium Iodid

Neutrophile Granulozyten wurden isoliert und anschließend in einer 12-well Platte ausgesät und wie in 3.2.2. beschrieben behandelt. Nach 8 Stunden erfolgte die Färbung mit Annexin V (BD Pharmigen, San Diego, California, USA) und Propidium Iodid (PI) (BD Pharmigen, San Diego, California, USA) verdünnt im Annexin V Binding Buffer (BD Pharmigen, San Diego, California, USA).

Das FACS erfolgte am FACSCANTO II (BD Bioscience, USA) und wurde anschließend mittels FACSDiva v8.0.2 Software (BD Bioscience, USA) analysiert.

3.2.6. qPCR für IRF3 und IRF5

Neutrophile Granulozyten wurden isoliert, in einer 6-Well Platte ausgesät und wie in 3.2.2. beschrieben behandelt. Die Zellen wurden anschließend mit 0,1 ng/ml Shiga-Toxin 2 für 3 Stunden stimuliert.

Die RNA wurde mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert. Die RNA-Menge wurde anschließend mittels Epoch Microplate Spektrophotometer (BioTek Instruments, USA) gemessen. Durch das Maxima First Strand Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) wurde die entsprechende doppelsträngige DNA (dsDNA) synthetisiert. Die qPCR wurde durch die Rotor Gene Q (Qiagen, Deutschland) mit dem Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Deutschland) ausgeführt.

Zur Quantifizierung wurden die Messwerte an GAPDH angepasst. Die Recherche der Primersequenzen erfolgte durch die Harvard Primer Bank (Harvard Medical School, USA). Im Anschluss erfolgte eine Sequenzierung des erzeugten Genprodukts per Sanger-Sequenzierung über die Firma MicroSynth (Balgach, Schweiz).

Folgende Primersequenzen wurden verwendet:

Gen	Fw-Sequenz (5'-3'):	Rv-Sequenz (5'-3'):
<i>IRF3</i>	AGAGGCTCGTGATGGTCAAG	AGGTCCACAGTATTCTCCA GG
<i>IRF5</i>	GGGCTTCAATGGGTCAACG	GCCTTCGGTGTATTTCCCTG
<i>GAPDH</i>	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTC ATGG

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über die verwendeten Primersequenzen für die qPCR

Die Berechnung der Mengen des entstandenen Genprodukts erfolgte nach QIAGEN bei unterschiedlichen qPCR-Effizienzen nach entsprechender Testung.

3.2.7. Immunofluoreszenz neutrophiler Granulozyten für MPO, H3cit und DNA

2×10^5 frisch isolierte neutrophile Granulozyten wurden auf Coverslips in einer 12-Well Platte ausgesät und wie in 3.2.2. beschrieben behandelt. Die Konservierung erfolgte mittels 99 % Methanol bei -20 °C. Vor Färbung mittels Primärantikörper erfolgte ein Block mit BSA 1 % in PBS für 1 Stunde.

Die Antikörper wurden mit 0,5 % BSA (Sigma-Aldrich, USA) in PBS (Thermo Fisher Scientific, USA), versetzt mit 250 µl Detergenz tween (Serva Electrophoreses GmbH, Deutschland), verdünnt.

	Bezeichnung Antikörper	Bezeichnung Isokontrolle	Konzentration
<i>MPO</i>	Anti-Myeloperoxidase- Antibody, mouse monoclonal (ab25989, abcam , UK)	Mouse IgG1 Antibody (X0931, Agilent Dako, USA)	20 µg/ml
<i>H3cit</i>	Recombinant Anti- Histone H3 Antibody, rabbit monoclonal (ab219406, abcam, UK,)	Recombinant Rabbit IgG monoclonal Isotype control (ab172730, abcam, UK)	10 µg/ml

Tabelle 2: Tabellarische Übersicht über die Primärantikörper

Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht.

	Bezeichnung Antikörper	Fluochrom	Konzentration
MPO	Goat anti-Mouse IgG (ab6785, abcam, UK)	FITC	2 µg/ml
H3cit	Donkey anti-Rabbit IgG (711-165-152, Jackson ImmunoResearch, USA)	Cy3	7,5 µg/ml

Tabelle 3: Tabellarische Übersicht über die Sekundärantikörper

Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte lichtgeschützt für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die DNA wurde mit DAPI 0,1 µg/ml (Carl Roth GmbH, Deutschland) für 10 Minuten gefärbt. Zum Eindeckeln der Präparate wurde Fluoromount G (Southern Biotech, USA) genutzt.

Die Auswertung erfolgte am Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss AG, Deutschland).

3.3. In vivo-Versuche

3.3.1. Beschreibung des HUS-Mausmodells

Der folgende Versuchsaufbau wurde von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Stadt Hamburg genehmigt (N113/2019) und erfüllt die Anforderungen des deutschen Tierschutzgesetzes. Die Tiere wurden innerhalb der Forschungstierhaltung der Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter Standardbedingungen (Temperatur 20-24 °C, relative Feuchtigkeit 50-60 %, 12h Licht/Tag) gehalten und erhielten Wasser und Nahrung ad libitum. Zusätzlich erfolgte eine Analgesie mittels Tramadol 300 mg über das Trinkwasser.

Nach einer Adaptationszeit an die Versuchsbedingungen von 2 Wochen wurde 12 Wochen alten Mäusen 350 ng/kg Stx 2 (List Laboratories, USA) intraperitoneal injiziert. In diesem Mausmodell zeigten sich ähnlich wie beim Menschen ein Nierenversagen und eine Dehydration. In der verwendeten Konzentration traten auch neurologische Symptome wie Paralyse, Lethargie, Muskelzittern, Gangveränderungen und Krampfanfälle auf (Mohawk and O'Brien 2011, Jeong, Park et al. 2018). Die Kontrollgruppe erhielt das entsprechende Volumen 0,9 % NaCl (B. Braun, Melsungen, Deutschland). Eingesetzt wurden 14 weibliche und 26 männliche Mus Musculus der Linie C57/Bl6 (Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Deutschland) und 10 weibliche und 15 männliche TLR4-KO-Mäuse desselben genetischen Hintergrunds (Jackson Laboratories, USA). Ab Injektion erfolgte die Beurteilung mittels Scoring und Murine Sepsis Score dreimal täglich (siehe Anhang II und III, S.54-56).

Nach 24, 48 und 72 Stunden oder bei stark reduziertem Allgemeinzustand wurden die Versuchstiere euthanasiert. Das Blut wurde mittels retrobulbärer Blutentnahme in EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Deutschland) entnommen und anschließend bei 4300 rpm für 10 Minuten bei 20 °C zentrifugiert.

3.3.2. Bestimmung der murinen cf-DNA

Um cf-DNA zu detektieren wurden 2 µM Sytox Orange genutzt. Die Probenverdünnung erfolgte mittels 0,1 % BSA in PBS (Thermo Fisher Scientific, USA) und die Fluoreszenz wurde in einem FlexStation3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, USA) in den Einstellungen Ex/Em 544/590 (Cutoff: 570) gemessen.

3.3.3. Bestimmung der murinen neutrophilen Elastase

Die Menge an neutrophiler Elastase im Blutplasma wurde mittels Mouse Elastase ELISA Kit PicoKine (Boster Bio, Pleasanton, California, USA) nach Herstellerangaben in einer FlexStation3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, USA) gemessen.

3.3.4. Bestimmung der murinen Myeloperoxidase

Zur Messung von Myeloperoxidase im Blutplasma wurde das MPO-ELISA-Kit von Hycult Biotech (USA) genutzt. Die Messung erfolgte in einer FlexStation3 Multi-Mode Microplate Reader entsprechend den Herstellerangaben (Molecular Devices, USA).

3.4. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels Graph Pad Prism 8. Um die statistische Signifikanz zu beurteilen, wurde ein Multiple T-test mit der Holm-Sidak-Methode genutzt. Für qPCR und in-vivo Versuche wurde die Signifikanz mittels Two-tailed T-Test ermittelt.

Ein $p < 0,05$ wurde hierbei als statistisch signifikant definiert. Für die graphische Darstellung der Signifikanz gilt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4. Ergebnisse

4.1. In vitro-Versuche

Eine Beurteilung der direkten Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Shiga-Toxin 2 hinsichtlich der NETose ermöglichten die *in vitro*-Versuche. Durch Behandlung der isolierten Zellen mit TAK242 konnte die Rolle dieses TLR4-Rezeptorhemmers ohne Beeinflussung durch andere Bestandteile des Immunsystems oder bisher unbekannte pathophysiologische Vorgänge untersucht werden.

4.1.1. Bestimmung von cf-DNA im Zeitverlauf

Im ersten Schritt erfolgte eine Reproduktion der Ergebnisse von Khan et al. 2017 mit LPS, einem gut beschriebenen NET-Induktor und Aktivator des TLR4-Signalwegs.

Bei Inkubation mit 10 µg/ml LPS war die cf-DNA nach 330 und 360 Minuten signifikant erhöht.

Es zeigte sich für die in dieser Arbeit verwendeten TAK242-Konzentrationen 500 nM und 5 nM eine statistisch signifikante Suppression der frei werdenden cf-DNA, was den Grundstein zur Untersuchung des Einflusses von TAK242 auf weitere NETose-Parameter bildet.

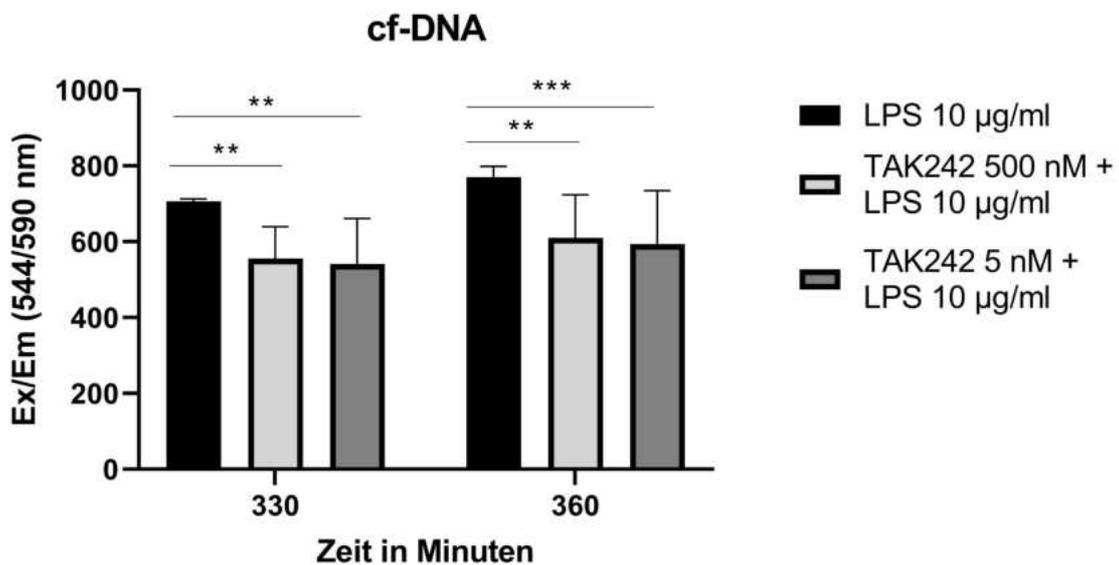


Abbildung 7: cf-DNA nach Stimulation mit LPS bei vorausgegangener Inkubation der neutrophilen Granulozyten mit TAK242

Darauffolgend wurde die Freisetzung von cf-DNA bei Stimulation neutrophiler Granulozyten mit Shiga-Toxin 2 in drei verschiedenen Konzentrationen untersucht. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Menge cf-DNA 330 und 360 Minuten nach einer Behandlung mit 0,1 ng/ml Shiga-Toxin. Bei den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 0,01 ng/ml ließ sich ebenfalls eine Erhöhung nachweisen, diese war jedoch nicht statistisch signifikant.

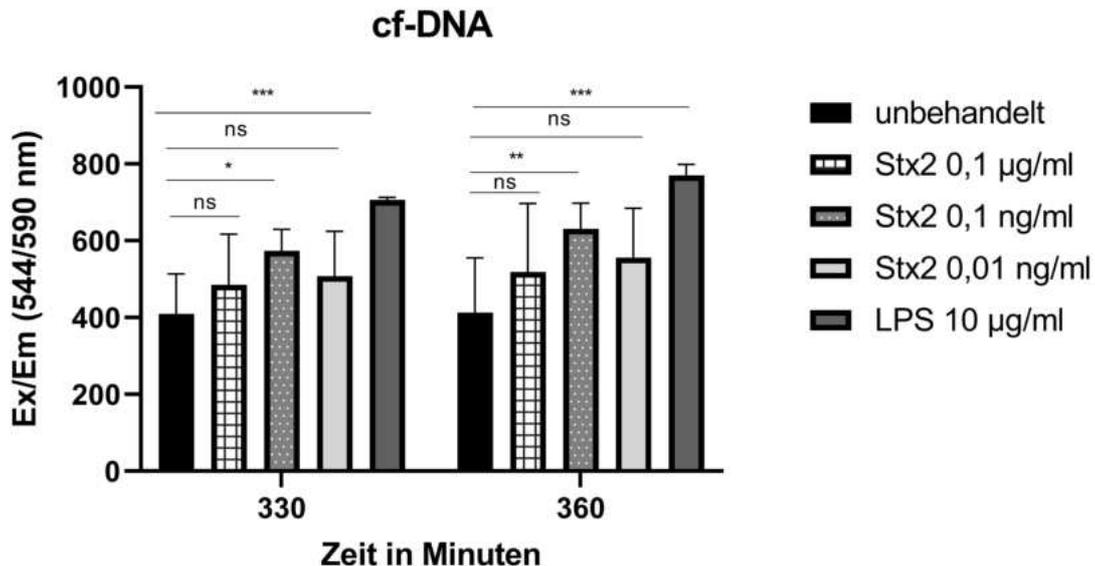


Abbildung 8: Übersicht über cf-DNA nach Stimulation mit Shiga-Toxin 2 und LPS

Um nach entsprechendem Nachweis der cf-DNA-Freisetzung durch Shiga-Toxin die Auswirkung einer Behandlung mit TAK242 zu evaluieren, wurden die Zellen nun vor Stimulation für 1 Stunde mit dem TLR4-Inhibitor inkubiert.

Bei Verwendung von 500 nM TAK242 war eine signifikant verringerte Freisetzung von cf-DNA nach 330 und 360 Minuten messbar, entsprechend den Ergebnissen nach Stimulation mit LPS. In der niedrigeren Konzentration 5 nM war ebenfalls eine leichte Verminderung graphisch darstellbar. Diese war jedoch nicht statistisch signifikant.

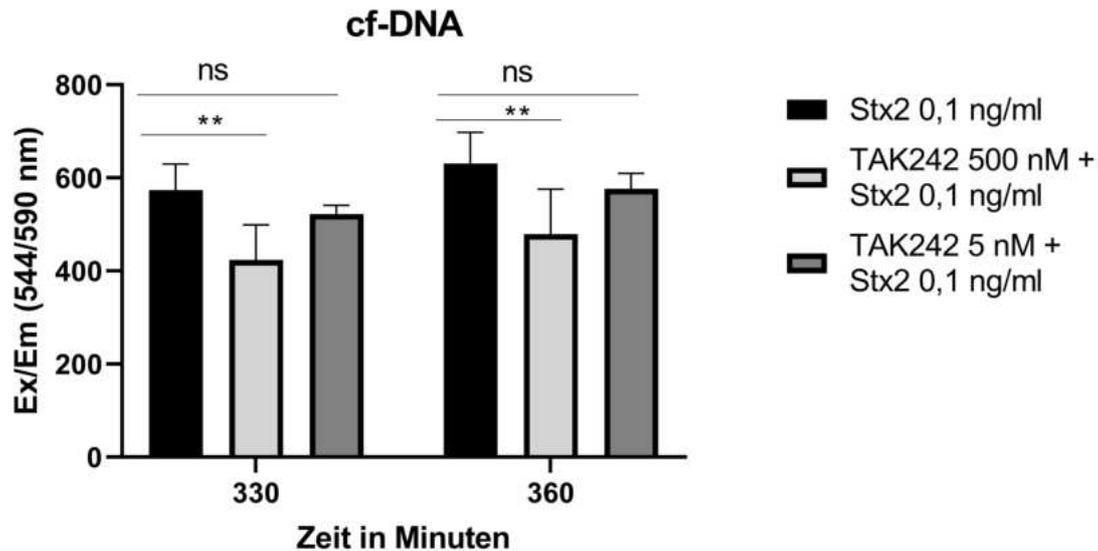


Abbildung 9: Übersicht über cf-DNA nach Stimulation mit 0,1 ng/ml Shiga-Toxin 2 und vorheriger Inkubation für TAK242 500 nM und 5 nM

4.1.2. Durchflusszytometrie von Annexin V und Propidium Iodid

Zum Ausschluss einer Apoptose oder Nekrose der neutrophilen Granulozyten als Ursprung der cf-DNA wurde eine durchflusszytometrische Bestimmung der Marker Annexin V und Propidium Iodid (PI) ausgeführt. Eine Inkubation erfolgte für 6 Stunden, da zu diesem Zeitpunkt die höchste Menge cf-DNA gemessen wurde.

Nach dieser Zeitspanne ließ sich kein vermehrtes Signal für beide Marker darstellen.

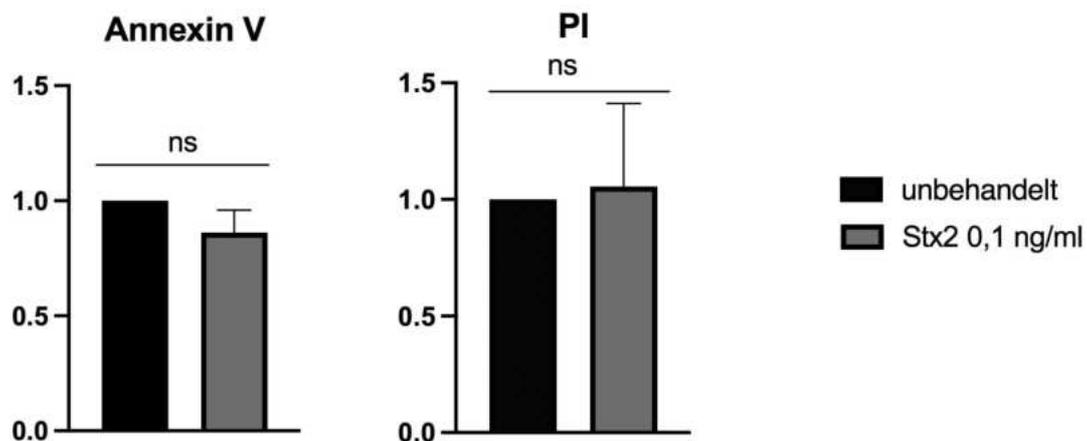


Abbildung 10: normalisierte Darstellung der durchflusszytometrischen Bestimmung von Annexin V und Propidium Iodid (PI)

4.1.3. Bestimmung der humanen neutrophilen Elastase

Als weiterer NET-Marker wurde die neutrophile Elastase durch die Umsetzung ihres spezifischen Substrates MeOSuc-AAPV-pNA (Cayman Chemical, USA) über 7 Stunden gemessen. Nach Umsetzung des Substrats zeigt dieses ein Signal ohne weitere Dynamik. Bei Bestimmung der Standardabweichung von 3 Versuchen zeigt sich ein kurvenförmiger Verlauf mit einem *Punctum Maximum* nach 2 Stunden. Dies war bei einer großen Standardabweichung auch normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle nicht statistisch signifikant.

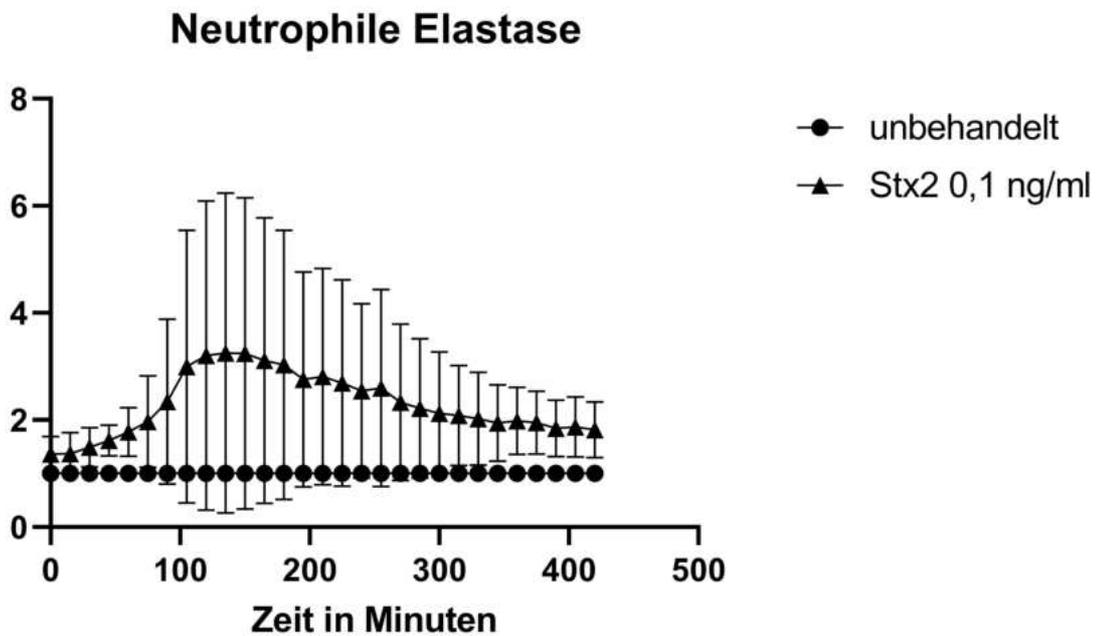


Abbildung 11: normalisierte Darstellung der neutrophilen Elastase (NE) nach Stimulation mit Shiga-Toxin 2 0,1 ng/ml

Im Folgenden ist der Vergleich der drei verwendeten Konzentrationen Shiga-Toxin 2 zum Maximum der Kurve (2 Stunden) und zum Endpunkt der Messung nach 7 Stunden exemplarisch dargestellt. Es zeigt sich wie bei der Bestimmung der cf-DNA die höchste Menge an NE in der Konzentration 0,1 ng/ml. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

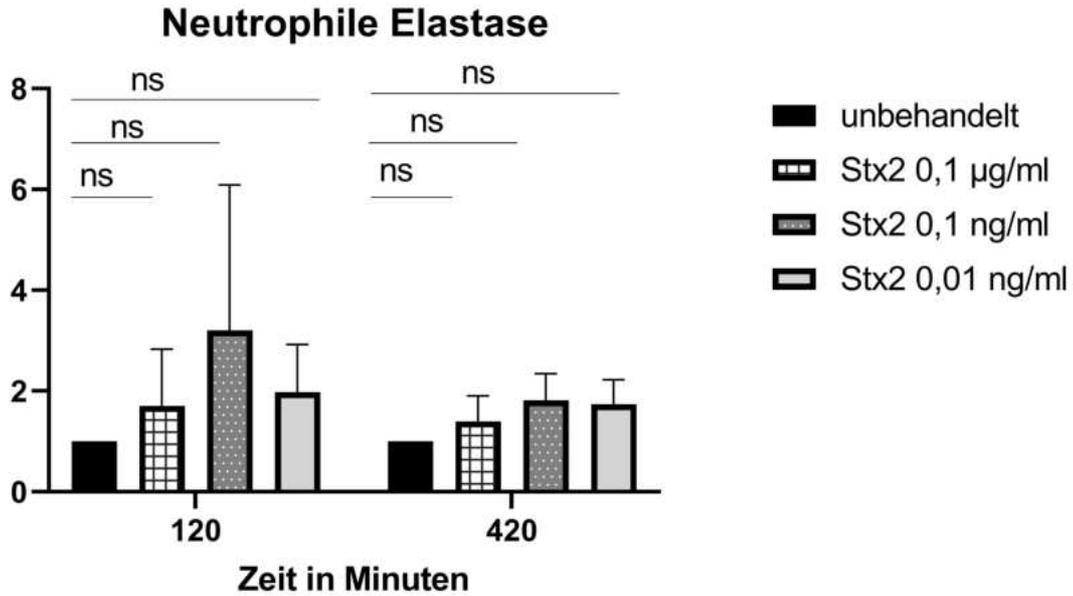


Abbildung 12: normalisierte Darstellung der neutrophilen Elastase (NE) nach Stimulation mit Shiga-Toxin 2 0,1 µg/ml, 0,1 ng/ml und 0,01 ng/ml

Bei vorangegangener Inkubation mit TAK242 zeigt sich tendenziell eine Verminderung der neutrophilen Elastase, die jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant ist.

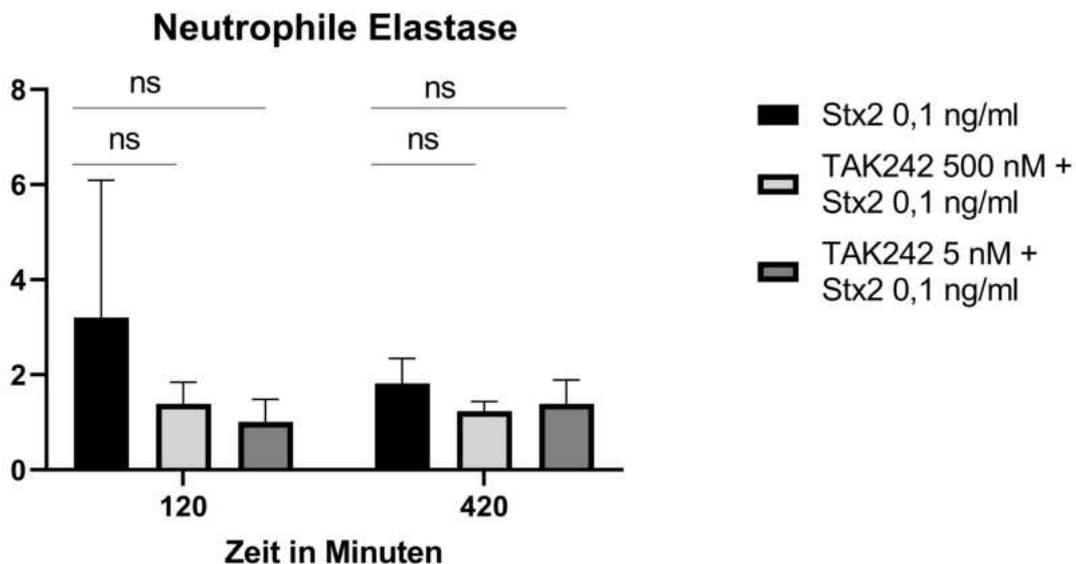


Abbildung 13: normalisierte Darstellung der neutrophilen Elastase bei Stimulation mit Shiga-Toxin 2 nach vorrangegangener Hemmung durch TAK242

4.1.4. Messung des zellulären Calcium-Einstroms durch Fluo8

Der Einstrom von Calcium-Ionen in neutrophile Granulozyten nach Stimulation mit Shiga-Toxin 2 wurde durch Fluoreszenz von Fluo8 gemessen. In der graphischen Darstellung zeigte sich ein höherer Einstrom an Calcium-Ionen in allen drei Konzentrationen Shiga-Toxin. Am höchsten war dieser bei der mittleren Konzentration von 0,1 ng/ml, am niedrigsten bei der kleinsten Konzentration 0,01 ng/ml.

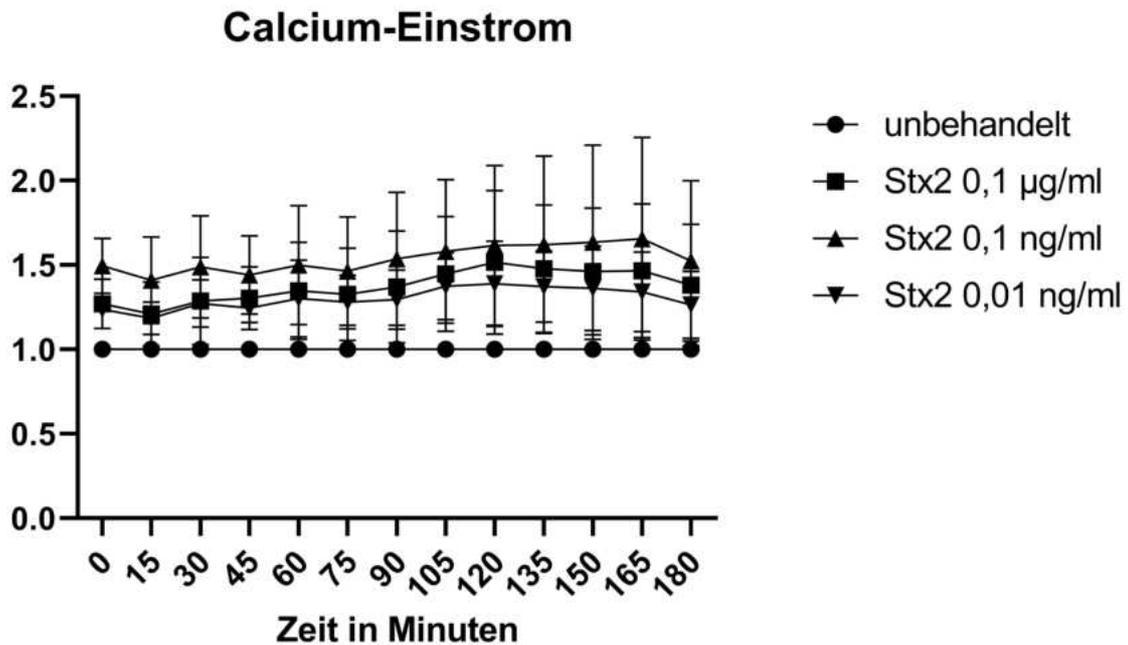


Abbildung 14: normalisierte Darstellung des Calcium-Einstroms im Zeitverlauf nach Stimulation durch Shiga-Toxin 2 0,1 µg/ml, 0,1 ng/ml und 0,01 ng/ml

Es zeigte sich jedoch nur punktuell an zwei verschiedenen Zeitpunkten nach 120 und 165 Minuten eine statistische Signifikanz. Nach 2 Stunden ließ sich bei der geringsten und höchsten Konzentration eine signifikante Erhöhung nachweisen, bei der mittleren Konzentration nach 165 Minuten.

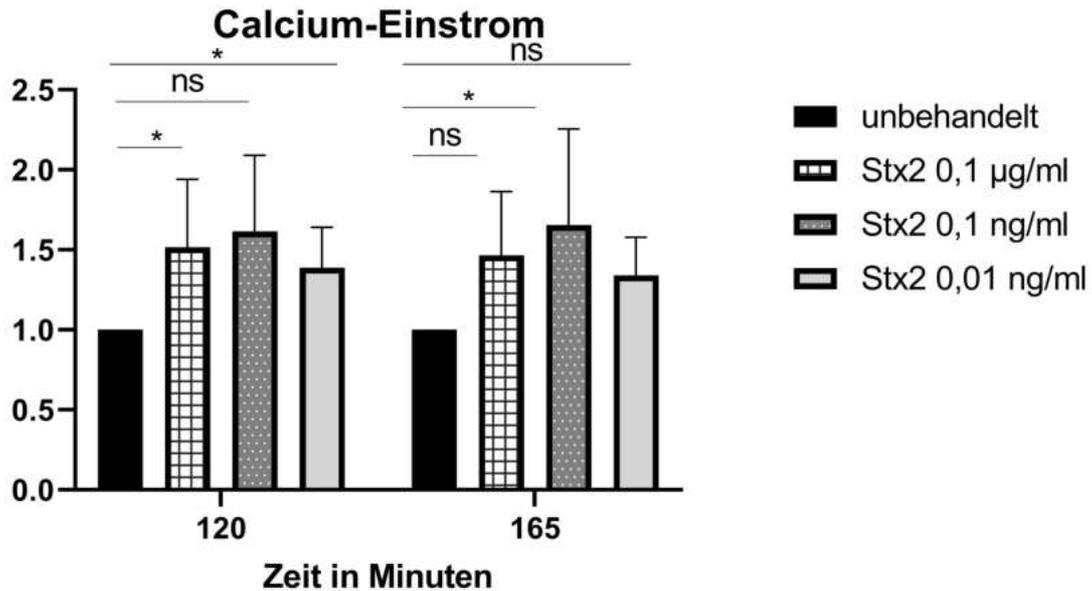


Abbildung 15: normalisierte Darstellung des Calcium-Einstroms nach 120 und 165 Minuten nach Stimulation durch Shiga-Toxin 2 0,1 µg/ml, 0,1 ng/ml und 0,01 ng/ml

Bei vorheriger Behandlung durch TAK242 zeigte sich der Calciumeinstrom zwar tendenziell vermindert. Diese Minderung war jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.

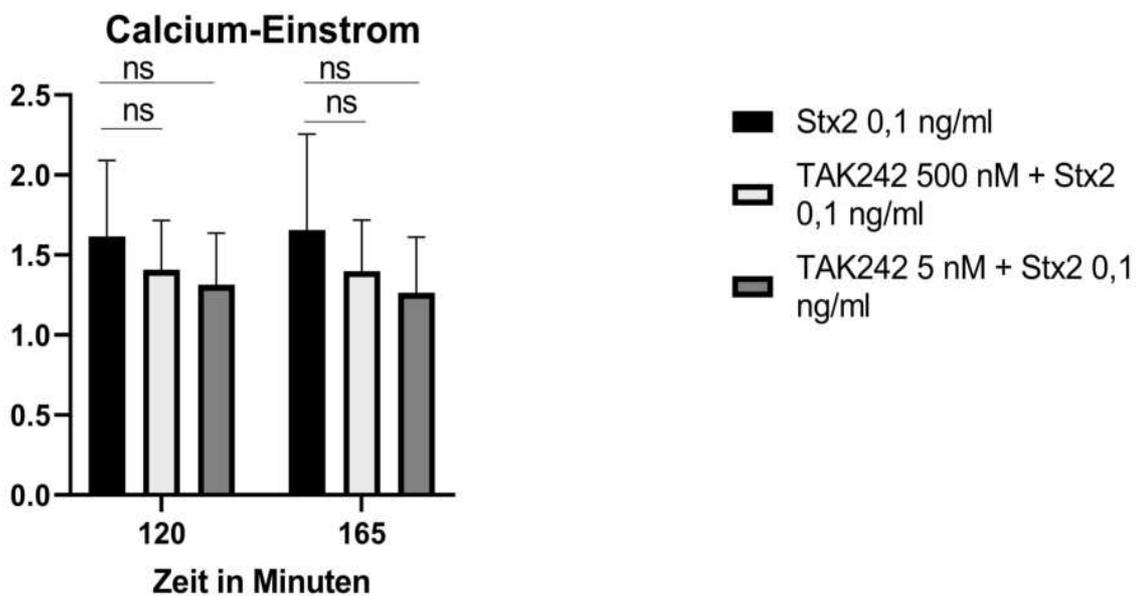
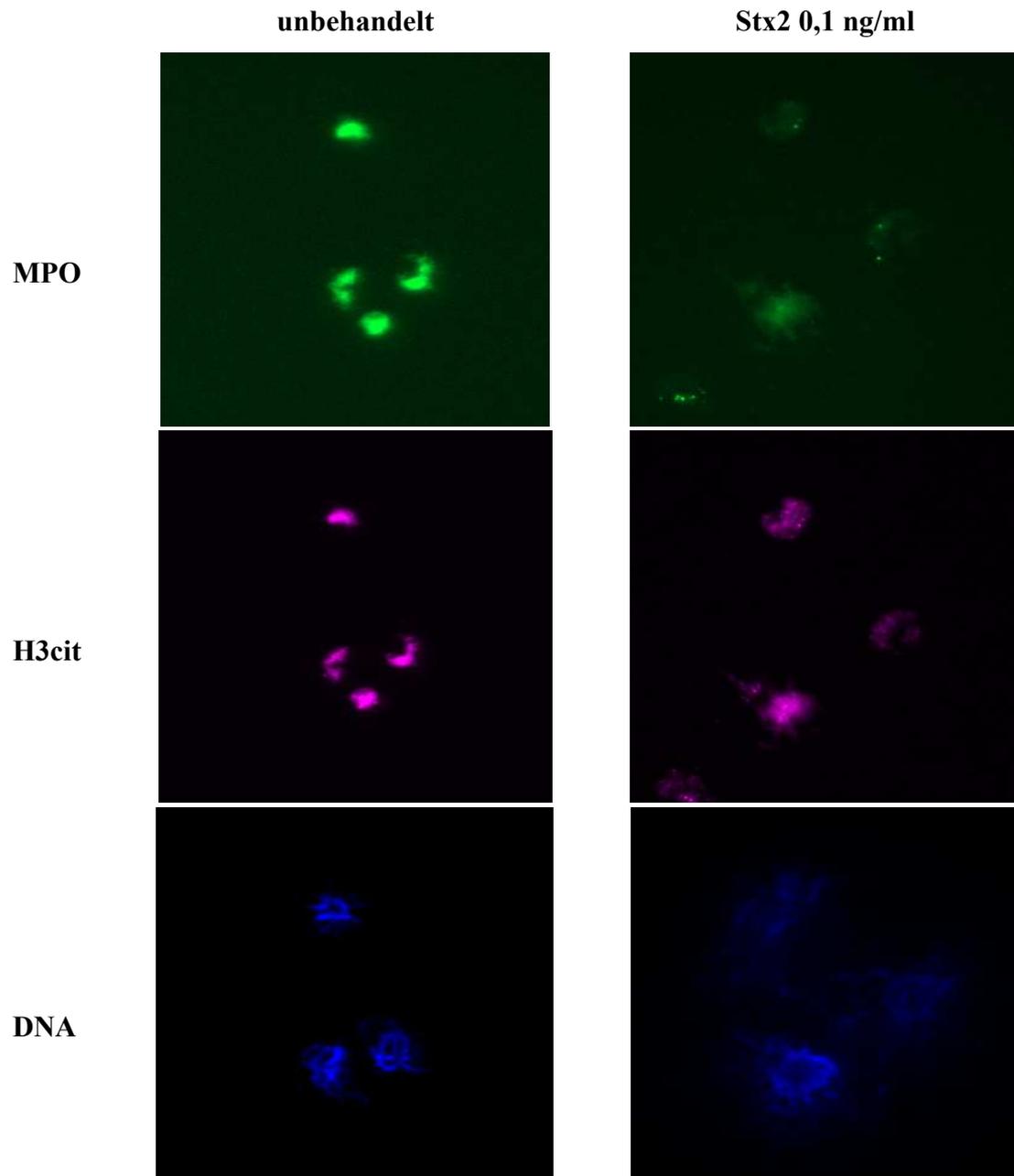


Abbildung 16: normalisierte Darstellung des Calcium-Influx nach 120 und 165 Minuten nach Stimulation mit Shiga-Toxin 0,1 ng/ml nach vorheriger Behandlung mit TAK24

4.1.5. Immunofluoreszenz neutrophiler Granulozyten für MPO, H3cit und DNA

Nach Inkubation der isolierten Neutrophilen mit Shiga-Toxin 2 zeigen sich in der Immunofluoreszenz netzartige Ausläufer, die zusammen mit dem Nachweis von H3cit und MPO in diesen Strukturen NETs darstellen. In der Kontrollgruppe zeigten sich beide Proteine nur intrazellulär, sodass in Kombination mit fehlenden DNA-Ausläufern ein Nachweis von NETs nicht gelang.



Merge

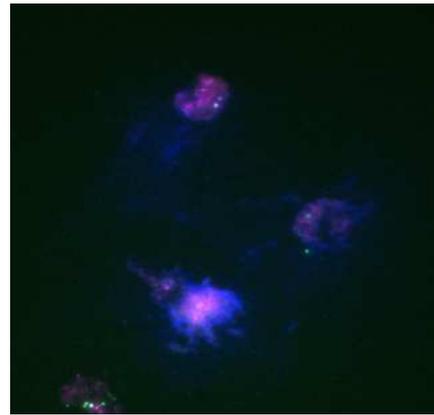
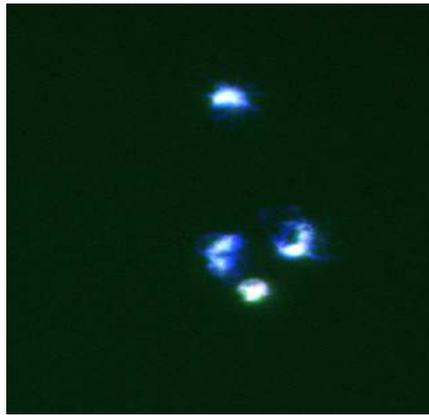
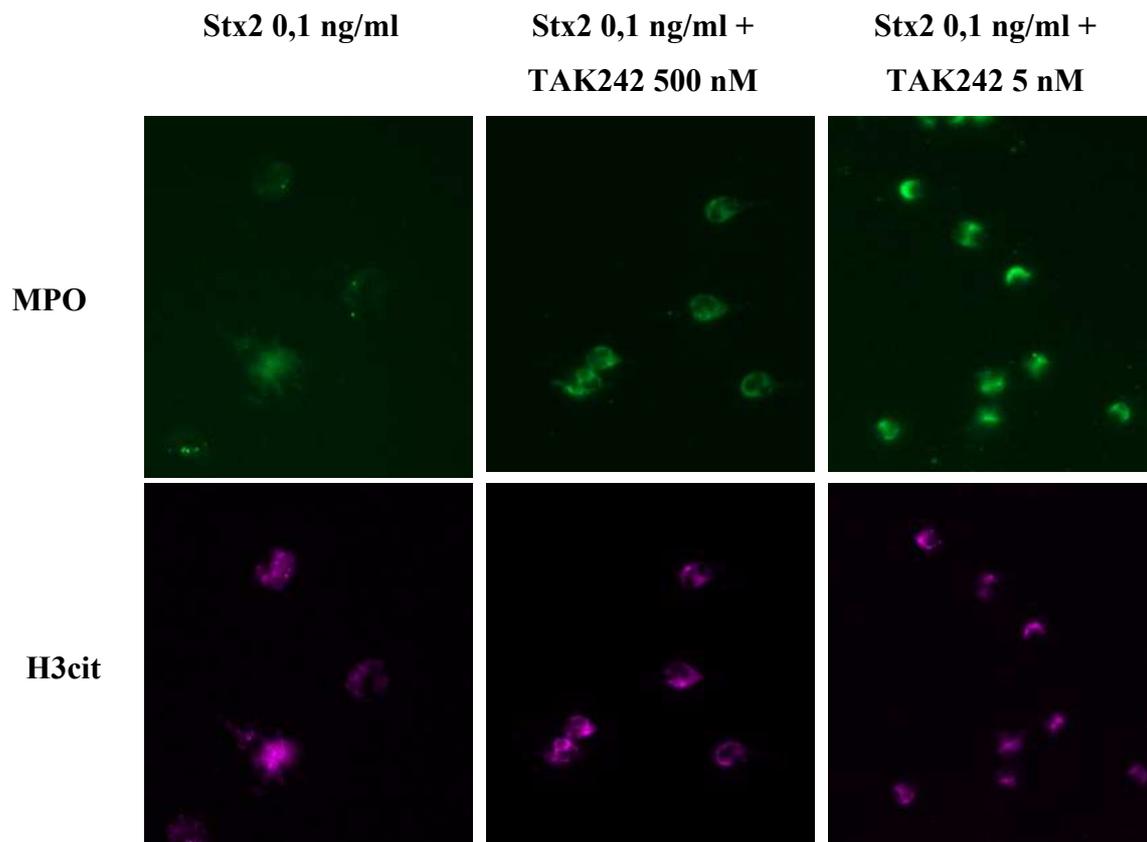


Tabelle 6: Vergleich der Immunofluoreszenzen hinsichtlich Myeloperoxidase, H3cit und DNA unstimuliert und stimuliert mit 0,1 ng/ml Shiga-Toxin 2

Bei Stimulation nach vorheriger Inkubation mit 500 nM oder 5 nM TAK242 zeigen sich deutlich weniger Ausläufer mit reduzierter Menge an MPO und H3cit, wodurch von einer geringeren NETose auszugehen ist.



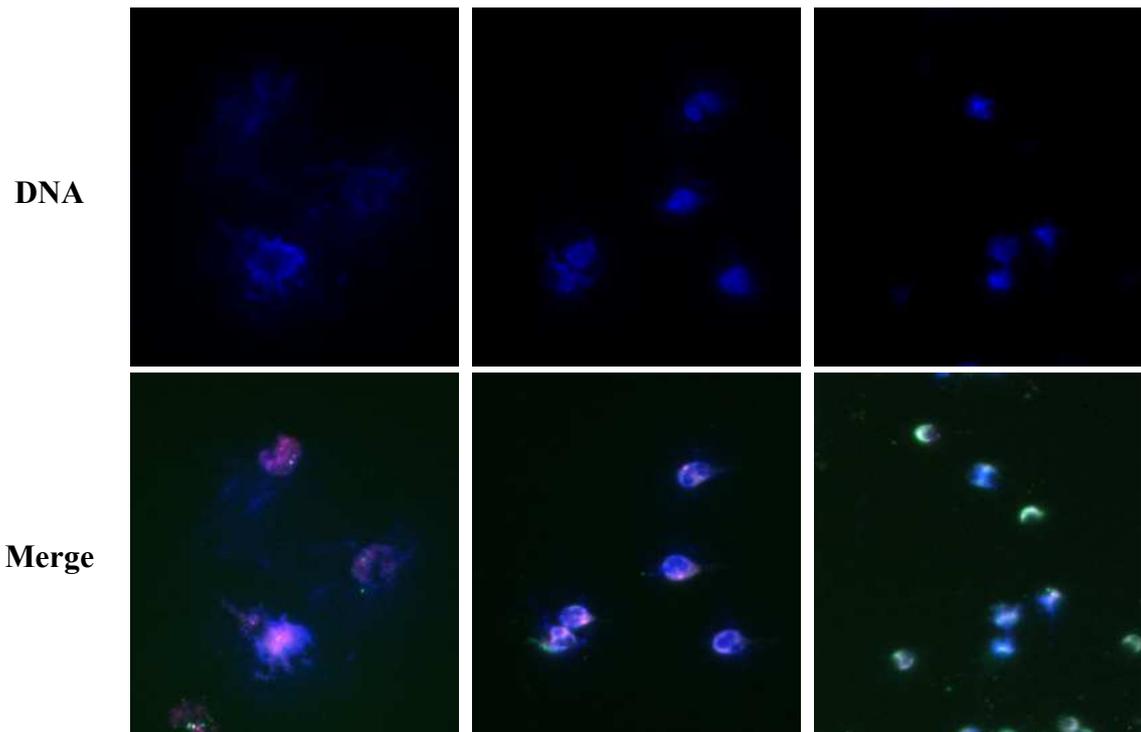


Tabelle 7: Vergleich der Immunofluoreszenzen hinsichtlich Myeloperoxidase, H3cit und DNA stimuliert mit 0,1 ng/ml Shiga-Toxin 2 sowie nach Inkubation mit TAK242 in den Konzentrationen 500nM und 5nM vor der Stimulation

4.1.6. qPCR für IRF3 und IRF5

Um die Aktivität des TLR4-Signalwegs zu ermitteln, wurde die Genexpression von IRF3 und IRF5 untersucht. Da TAK242 in DMSO gelöst ist, erfolgte konzentrationsabhängig eine Hintergrundkontrolle mit DMSO. Für die niedrige Konzentration dieser Kontrolle zeigte sich für IRF3 eine Signifikanz der Shiga-Toxin 2 behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten Neutrophilen. Eine Vorbehandlung mit TAK242 in den Konzentrationen 500 nM und 5 nM vor der Stimulation mit Shiga-Toxin 2 führte zu keiner statistisch signifikanten Reduktion.

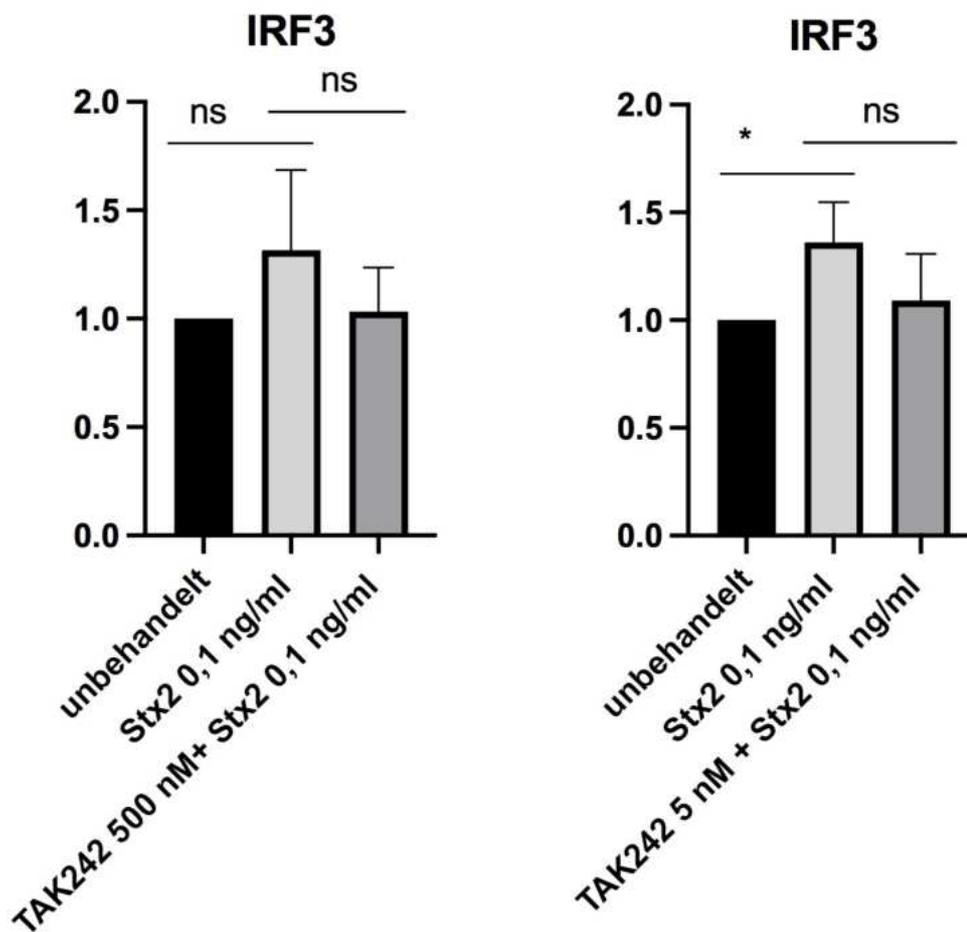


Abbildung 17: Normalisierte Darstellung der Expression von IRF3 durch qPCR

In der qPCR zeigte sich keine signifikante Veränderung für IRF5 nach Behandlung mit Shiga-Toxin 2 und dementsprechend keine signifikante Hemmung nach vorheriger Inkubation mit TAK242.

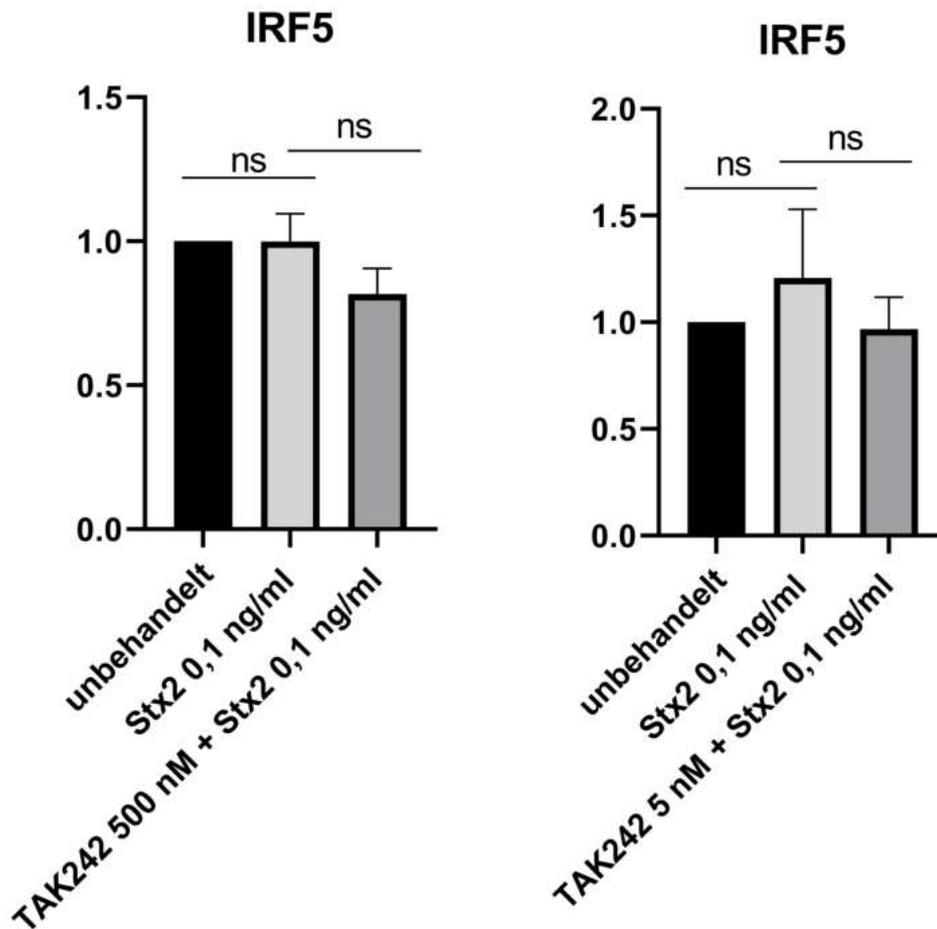


Abbildung 18: Normalisierte Darstellung der Expression von IRF5 durch qPCR

4.2. In vivo Ergebnisse

Zielsetzung der Untersuchungen war im ersten Schritt ein Nachweis der NETose im HUS-Mausmodell. Anschließend soll eruiert werden, ob in der Gruppe der TLR4-KO gegenüber den Wildtypen (C57/Bl6) die NETose verringert und der Allgemeinzustand der Tiere verbessert ist.

Als Parameter der NETose wurden im Blutplasma der euthanasierten Tiere nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden cf-DNA, neutrophile Elastase (NE) und Myeloperoxidase (MPO) bestimmt.

4.2.1. Bestimmung der cf-DNA im Blutplasma

Im Mausmodell zeigte sich 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion von Shiga-Toxin 2 eine statistisch signifikante vermehrte Menge an cf-DNA im Blutplasma. Dies ließ sich sowohl bei Tieren des Wildtyps als auch bei den TLR4-defizienten Mäusen gleichermaßen nachweisen.

Mäuse mit TLR4-KO zeigten auch in der Kontrollgruppe eine höhere Menge an cf-DNA im Blut.

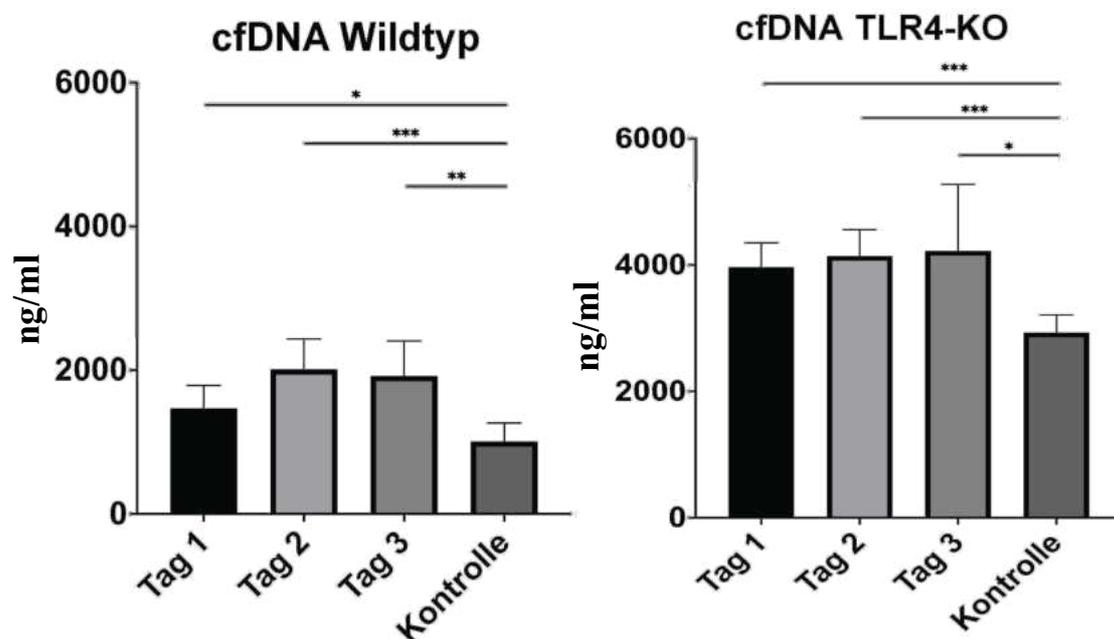


Abbildung 19: cf-DNA nach Injektion von Shiga-Toxin 2 gegenüber einer Kontrollgruppe mit 0,9% NaCl beim Wildtyp und TLR4-KO

4.2.2. Bestimmung der neutrophilen Elastase im Plasma

Anders als bei der cf-DNA zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und TLR4-Knockout. Bei Tieren mit funktionfähigem TLR4-Rezeptor war nach 48 und 72 Stunden eine vermehrte Menge neutrophiler Elastase im Plasma nachweisbar. Bei nicht funktionstüchtigem TLR4-Rezeptor hingegen zeigte sich zu keinem Zeitpunkt eine statistisch signifikante Erhöhung.

Im Gegensatz zu cf-DNA war die Menge NE zwischen Wildtyp und Knockout in der Kontrollgruppe ähnlich.

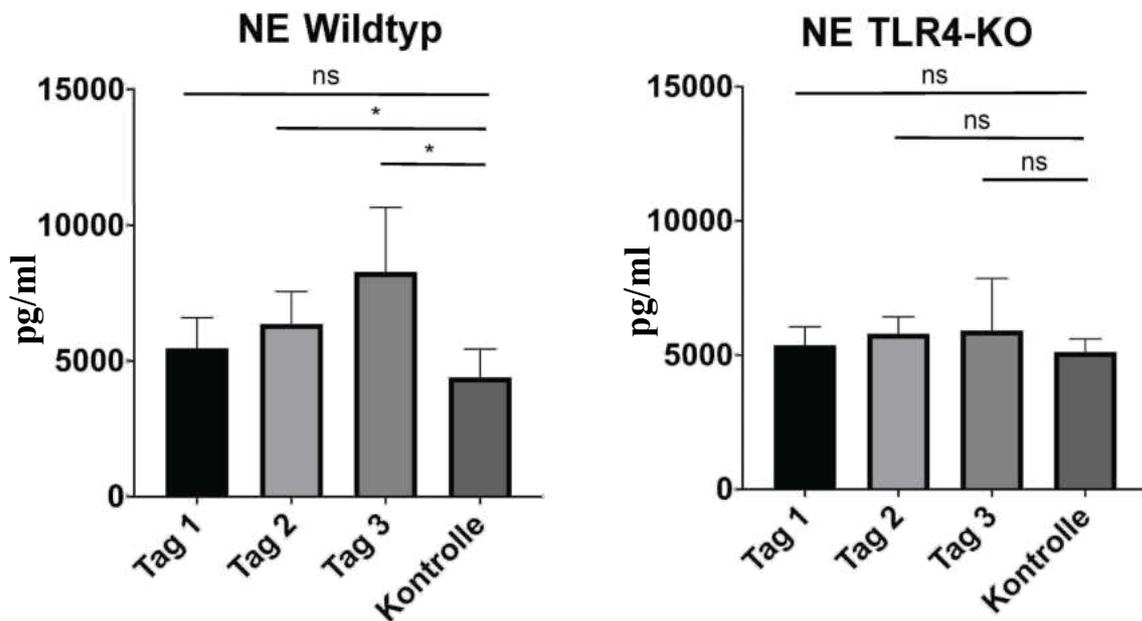


Abbildung 20: quantitative Bestimmung der neutrophilen Elastase (NE) nach Injektion von Shiga-Toxin 2 gegenüber einer Kontrollgruppe mit 0,9% NaCl beim Wildtyp (C57/Bl6) und TLR4-KO

4.2.3. Bestimmung der Myeloperoxidase im Blutplasma

Beim Wildtyp war die Menge von Myeloperoxidase im Plasma 72 Stunden nach der intraperitonealen Injektion von Shiga-Toxin 2 signifikant erhöht. Bei TLR4-defizienten Mäusen hingegen kam es zu keinem der drei Zeitpunkte zu einer signifikanten Erhöhung. Analog zur Messung der neutrophilen Elastase war die Menge an MPO in der Kontrollgruppe beim Wildtyp und TLR4-KO ähnlich.

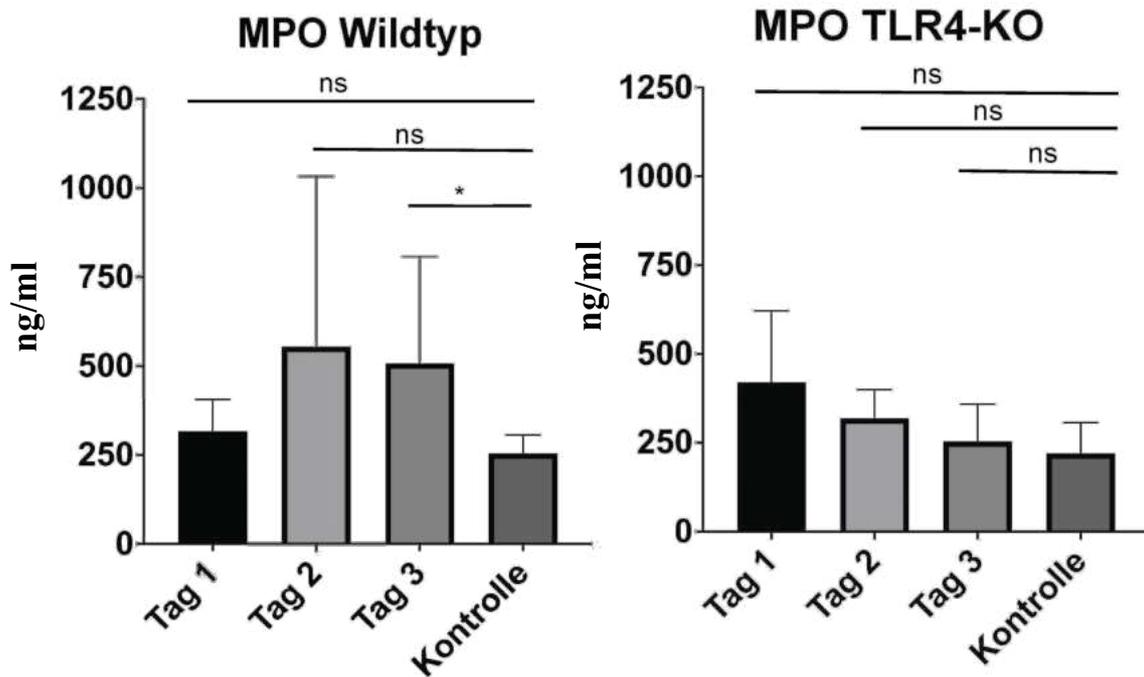


Abbildung 21: Bestimmung der Myeloperoxidase (MPO) nach Injektion von Shiga-Toxin 2 gegenüber einer Kontrollgruppe mit 0,9% NaCl beim Wildtyp (C57/Bl6) und TLR4-KO

4.2.4. Vergleich des Überlebens von Wildtyp und TLR4-Knockout

Ein Einsetzen einer Belastungssituation entsprechend den Kriterien des „Murine Sepsis Score“ nach Shrum et al. 2014 (siehe Anhang III, S.56) war nach 48-72 Stunden innerhalb eines kurzen Zeitraums zu verzeichnen. Im Allgemeinen traten bei Tieren des Wildtyps diese Symptome früher auf und Mäuse dieser Gruppe verstarben häufiger unerwartet während des Versuchs. Während bei den Wildtypen 6 Tiere innerhalb von 72 Stunden verstarben, trat dies bei den TLR4-KO nur einmal auf. Wenngleich es auch bei allen Mäusen des Knockouts Hinweise für eine deutliche Belastung nach 72 Stunden gab, sind deutlich weniger Tiere spontan verstorben. Nach Injektion von 0,9% NaCl als Kontrolle trat in keiner Gruppe ein spontaner Todesfall auf und kein Tier zeigte bei regelmäßiger Evaluation Hinweise für eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes.

Nachfolgend ist das Überleben der Mäuse nach Injektion von Shiga-Toxin 2 dargestellt (s. Anhang I, S. 53):

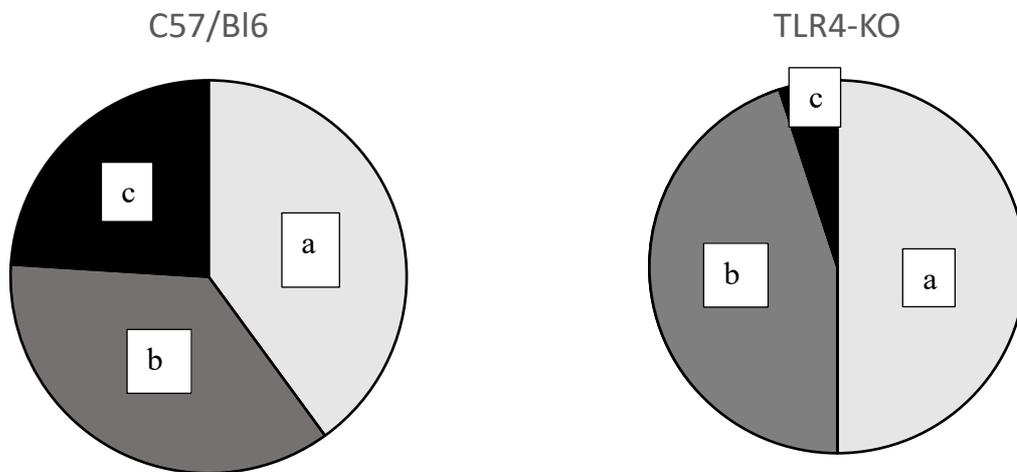


Abbildung 22: Gegenüberstellung von Überleben der Mäuse des Wildtyps (C57/Bl6) und der TLR4-KO-Linie, a) planmäßige Euthanasie, b) Euthanasie bei schlechtem Allgemeinzustand nach 72h, c) spontanes Versterben

5. Diskussion

5.1. In vitro-Versuche

Ziel der *in vitro* Versuche war die Untersuchung der NETose-Parameter bei Stimulation mit Shiga-Toxin 2 und nach Behandlung der neutrophilen Granulozyten mit dem TLR4-Inhibitor TAK242. Eine Limitation des *in vitro* Versuchs stellt definitionsgemäß die fehlende Abbildbarkeit der komplexen Prozesse *in vivo* dar, jedoch ließen sich hier spezifisch die Einflüsse des Shiga-Toxin 2 auf Neutrophile ohne potentielle externe Einflüsse untersuchen.

5.1.1. cf-DNA

Im ersten Schritt konnten die Ergebnisse von Khan et. al 2017 erfolgreich reproduziert werden. Nach Inkubation mit TAK242 in den von uns verwendeten Konzentrationen 500 nM und 5 nM zeigte sich eine signifikante Verminderung von cf-DNA nach Stimulation der frisch isolierten Neutrophilen mit Lipopolysaccharid. Im zweiten Schritt gelang der Nachweis von erhöhtem cf-DNA ebenso nach Exposition gegenüber Shiga-Toxin sowie eine Verminderung nach Vorbehandlung durch den TLR4-Inhibitor, sodass ein gleichsamer pathophysiologischer Mechanismus anzunehmen ist.

Bei LPS handelt es sich um einen gut untersuchten Bindungspartner des TLR4 (Lu, Yeh et al. 2008) und auch für Shiga-Toxin 2 ist die Bindung an den TLR4-Rezeptor neutrophiler Granulozyten bereits beschrieben (Brigotti, Carnicelli et al. 2013). Unsere Versuche unterstützen dies, indem wir zeigen konnten, dass Shiga-Toxin 2 über den TLR4-Rezeptor zu einer cf-DNA Freisetzung zu führen scheint.

Cf-DNA kann durch unterschiedliche zelluläre Mechanismen entstehen. Zum einen bildet sie einen Bestandteil von neutrophilen extrazellulären Fallen. Eine erhöhte Menge korreliert zudem mit der Prognose von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen zum Beispiel bei posttraumatischer Sepsis (Margraf, Logters et al. 2008), schweren Verbrennungen (Altrichter, Zedler et al. 2010) und Appendizitis (Boettcher, Esser et al. 2020). Neben der NETose stellt die Apoptose oder Nekrose eine mögliche Ursache für cf-DNA dar (Heitzer, Auinger et al. 2020). Die von uns durchgeführte durchflusszytometrische Bestimmung von Annexin V und Propidium Iodid ist einer der am besten beschriebenen Nachweise für nekrotische beziehungsweise apoptotische Zellen (Crowley, Marfell et al. 2016). Da sich in hier keine signifikante Erhöhung darstellen ließ, ist von einer abweichenden Genese der cf-DNA auszugehen. Von Brigotti et al. wurde bereits ein verlängertes Überleben neutrophiler Granulozyten nach

Inkubation mit Shiga-Toxin 2 beschrieben (Brigotti, Carnicelli et al. 2008). Auch LPS induziert in bestimmten Konzentrationen eine verringerte spontane Apoptose (Kolman, Pagerols Raluy et al. 2022).

5.1.2. qPCR von IRF3 und IRF5

Nach Reproduktion der Ergebnisse von Khan et al. untersuchten wir, ob durch TAK242 eine Hemmung des TLR4-Rezeptors nach Stimulation mit Shiga-Toxin 2 nachweisbar ist. Untersucht wurden hierfür IRF3 und IRF5. IRF 5 ist Teil des MyD88-abhängigen Signalwegs. IRF3 hingegen ist dem MyD88-unabhängigen Signalweg zuzuordnen (Lu, Yeh et al. 2008).

Da TAK242 in DMSO gelöst ist, erfolgte konzentrationsentsprechend eine Hintergrundkontrolle bei den unbehandelten Neutrophilen mit DMSO. Es zeigte sich in unserem Versuch lediglich eine signifikant vermehrte Expression von IRF3 in der niedrigen DMSO Hintergrundkontrolle. Da DMSO ein Zellgift ist, könnte die höhere Konzentration allein bereits eine Änderung des Zellstoffwechsels verursachen und somit Einfluss auf das Ergebnis der qPCR nehmen.

Die signifikante Erhöhung von IRF3 und nicht von IRF5 spricht für eine Beteiligung des MyD88-unabhängigen ohne Beteiligung des MyD88-abhängigen Signalwegs. Im Unterschied dazu führt LPS zur Aktivierung beider Signalkaskaden (Lu, Yeh et al. 2008). Eine Hemmung der Expression von IRF3 oder IRF5 war jedoch nicht nachweisbar, sodass im Folgenden nur die Auswirkungen einer Behandlung mit TAK242 diskutiert werden können.

5.1.3. Neutrophile Elastase

Zum Nachweis einer NETose ist die gleichzeitige Erhöhung mehrerer NET-Parameter erstrebenswert. Die Bestimmung der neutrophilen Elastase erfolgte durch Umsatz des spezifischen Substrats MeOSuc-AAPV-pNA. Bei hoher Standardabweichung zwischen den Versuchen war die darstellbare Erhöhung ohne statistische Signifikanz. Bei den unstimulierten Zellen zeigten sich zwischen den Versuchen große Abweichungen, weswegen eine Normalisierung der Daten erfolgte. Grund für diese Unterschiede zwischen den unstimulierten Neutrophilen könnte eine abweichende Voraktivierung der Spender-Immunsysteme sein. Auch im Blut von HUS-Patienten zeigte sich im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten eine erhöhte spontane NETose (Ramos, Mejias et al. 2016). Ergänzend handelt es sich bei diesem Versuchsaufbau um eine indirekte

Nachweismethode über die Umsetzung eines Substrats. Dies reduziert die Sensitivität im Vergleich zu einem ELISA.

5.1.4. Calcium-Einstrom

Calcium ist notwendig für die NETose (Papayannopoulos 2018). Bei der Messung der Standardabweichung zeigen sich ebenfalls große Standardabweichungen, mit signifikanter Vermehrung nach Stimulation mit Shiga-Toxin 2 zu wenigen Zeitpunkten. Eine Reduktion durch eine Behandlung mit TAK242 konnte nicht demonstriert werden. Der intrazelluläre Calciumeinstrom zählt zu den eher unspezifischen NET-Parametern, da dieser bei vielen zellulären Prozessen eine Rolle spielt.

5.1.5. Immunofluoreszenz von MPO, H3cit und DNA

Aufgrund der zum Teil divergierenden Ergebnisse führten wir eine Immunofluoreszenz von MPO, H3cit und DNA durch. In den hier exemplarisch dargestellten Graphiken zeigten sich vermehrt Signale aller drei Parameter sowie eine konzentrationsabhängige Reduktion durch TAK242.

Der Vorteil dieser Methodik liegt in der möglichen räumlichen Beurteilung der NET-Parameter zueinander und die Darstellung der DNA als netzartige Struktur.

5.2. In vivo-Versuche

Zusammenfassend zeigen TLR4-KO-Tiere gegenüber den Wildtypen eine verminderte Belastung während des Versuchs sowie keinen signifikanten Anstieg von MPO und NE im Blut. Diese Verminderung beider Enzyme bei TLR4-defizienten Mäusen weist auf einen Zusammenhang zwischen TLR4-Rezeptor und NETose neutrophiler Granulozyten hin.

Cf-DNA lässt sich als einzelner Parameter bei beiden Genotypen signifikant nachweisen. Wie bereits in Punkt 5.1.1. diskutiert, handelt es sich um einen eher unspezifischen NET-Marker. Eine Erhöhung ist auch bei anderen Prozessen, wie Apoptose und Nekrose möglich. Dies könnte beispielsweise durch den durch Shiga-Toxin induzierten Zelltod, z.B. von Epithelzellen zurückzuführen sein (Takeda, Dohi et al. 1993).

Dass die Gruppe der TLR4-KO vermehrt cf-DNA im Plasma aufweist, kann als Zeichen eines vermehrten Zelltods andersartiger Zellen zurückzuführen sein. Normalerweise stammt cf-DNA bei gesunden Individuen aus hämatopoetischen Zellen. Bei hohem Remodeling und überschießendem Zelltod, wie beispielsweise bei onkologischen

Erkrankungen, kann sie jedoch auch aus anderen Zellen freigesetzt werden (Heitzer, Auinger et al. 2020). Ebenfalls konnte bei der Sepsis (Hamaguchi, Akeda et al. 2015) und beim akutem Nierenversagen (Celec, Vlkova et al. 2018), wie es auch beim HUS auftritt, eine cf-DNA-Erhöhung beschrieben werden. Dieser These gegenüber steht der bessere Allgemeinzustand der TLR4-defizienten Tiere. Eine abschließende Beurteilung der cf-DNA Genese bei unbehandelten Wildtypen und TLR4-KO-Tieren ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. NE und MPO waren in den jeweiligen Kontrollgruppen für Wildtypen und TLR4-Knockouts ähnlich hoch nachweisbar. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass diese cf-DNA-Erhöhung unabhängig von der NETose auftritt. In diesem Fall wäre von einer gleichzeitigen Erhöhung der drei Marker auszugehen.

5.2.1. Limitationen des in vivo-Versuchs

Limitationen des *in vivo*-Versuchs am Mausmodell liegen in den Unterschieden zwischen Mensch und Maus begründet. Zum Teil sind die Auswirkungen dieser Unterschiede schwer abschätzbar, da der pathophysiologischen Prozesse beim HUS noch nicht vollständig verstanden sind.

So unterscheidet sich beispielsweise die Zusammensetzung des weißen Blutbildes. Während sich humane Leukozyten im gesunden Zustand aus 50-70 % Neutrophilen zusammensetzen, sind dies bei der Maus nur 10-25 %. Anstelle dessen verfügen Mäuse über 75-90 % Lymphozyten, statt nur 30-50 % wie beim Menschen (Mestas and Hughes 2004). Durch die quantitative Verminderung an Neutrophilen als Ausgangszelle der NETs sind NETotische Prozesse erschwert darstellbar.

Des Weiteren zeigen murine Podozyten im Gegensatz zum Menschen keine Expression des Gb3-Rezeptor, durch den die pathogene Wirkung in der Niere vermittelt wird. Kortikale und medulläre Tubuluszellen scheinen bei der Maus Zielstruktur des Shiga-Toxin 2 für apoptotische Prozesse zu bilden (Psotka, Obata et al. 2009). Beim Menschen sind vor allem glomerulären Epithelzellen und Podozyten betroffen (Zoja, Buelli et al. 2017).

Zuletzt spielen bei der Entstehung des HUS sowohl LPS als auch Shiga-Toxin 2 eine Rolle, auch wenn letzteres die Hauptwirkung vermittelt. Synergistische Prozesse könnten von besonderer Bedeutung sein (Louise and Obrig 1992).

5.2.2. NETose durch Shiga-Toxin 2 und TLR4-Rezeptor

Die *in vivo*-Versuche ermöglichten eine Untersuchung des Einflusses des TLR4-Rezeptors auf die NETose, nachdem eine vollständige Blockade *in vitro* nicht beweisbar war. Zum anderen werden, möglicherweise noch unbekannte, pathophysiologische Vorgänge miteinbezogen. So zeigten Clark et al. beispielsweise, dass der TLR4-Rezeptor auf Thrombozyten bei Sepsis NETose *in vivo* aktivieren kann. Auch *in vitro* wurde die NETose nach LPS-Gabe durch das Vorhandensein von Thrombozyten weiter stimuliert (Clark, Ma et al. 2007).

Wie in 5.2.1. beschrieben, spielt beim Menschen auch LPS in der Pathophysiologie des HUS eine Rolle. Ebenso wie eine synergistische Wirkung bei Stimulation durch beide Pathogene erfolgen kann (Louise and Obrig 1992), könnte die Senkung der NET-Parameter sowohl bei LPS als auch Shiga-Toxin 2 durch eine TLR4-Blockade möglich sein.

Auch TLR4-Polymorphismen könnten *in vivo* beim Menschen eine Rolle spielen. Dies ist bereits für die Empfänglichkeit bei anderen Infektionskrankheiten bekannt und hier von besonderem Interesse, da nicht vollständig verstanden ist, warum es bei manchen Menschen zur Entwicklung eines HUS nach EHEC-Infektion kommt, während andere nicht erkranken (Zoja, Buelli et al. 2017).

6. Zusammenfassung

In vitro zeigten sich eine gesteigerte Menge an cf-DNA sowie Komplexe aus DNA, MPO und H3cit in der Immunofluoreszenz nach Inkubation neutrophiler Granulozyten mit Shiga-Toxin 2. Eine Behandlung mit TAK242 führte zu einer Hemmung der cf-DNA Freisetzung und der mikroskopisch darstellbaren NETose. Apoptotische Prozesse als Ursache freier DNA konnten durchflusszytometrisch ausgeschlossen werden. In der PCR ließ sich eine Stimulation für IRF3 darstellen, was auf eine Aktivierung des MyD88-unabhängigen Weges schließen lässt. Eine Hemmung von IRF3 durch TAK242 sowie Beteiligung von IRF5, Teil des MyD88-abhängigen Wegs, konnte nicht gezeigt werden. Eine signifikante Vermehrung von neutrophiler Elastase und Calciueinstrom konnte bei hohen Standardabweichungen nicht festgestellt werden. Ursache hierfür könnten niedrige Sensitivitäten der Versuchsaufbauten bzw. Spezifitäten des Parameters sein. Doch auch eine Abhängigkeit von einem oder mehreren Mediatoren der NETose *in vivo* muss in diesem Zusammenhang diskutiert werden.

Die *in vivo*-Versuche ermöglichten Untersuchungen bei defizienten TLR4-Rezeptor. Es zeigte sich eine signifikante Verminderung von NE und MPO bei TLR4-Knockout Tieren. Allein für cf-DNA zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine signifikante Vermehrung, eventuell aufgrund von anderen apoptotischen Prozessen, die bei den Knockout-Mäusen vermehrt auftreten. Im Gegensatz zu dieser Vermutung steht, dass TLR4-KO-Tiere während des Versuchs eine geringere Beeinträchtigung zeigten, sodass die Ursache der erhöhten cf-DNA nicht abschließend geklärt werden kann.

Aufgrund dessen postulieren wir einen Teileinfluss des TLR4-Rezeptors auf die NETose und den Schweregrad des Hämolytisch-Urämischen Syndroms im Mausmodell.

7. Summary

In vitro, incubation of neutrophil granulocytes with Shiga toxin 2 resulted in stimulation of cf-DNA genesis as well as complexes of DNA, MPO and H3cit in immunofluorescence. Treatment with TAK242 led to an inhibition of cf-DNA release and microscopically visualizable NETosis. Apoptotic processes as the cause of free DNA could be excluded by flow cytometry. PCR showed stimulation of IRF3, which indicates activation of the MyD88-independent pathway. Inhibition of IRF3 by TAK242 and involvement of IRF5, part of the MyD88-dependent pathway, could not be demonstrated. A significant increase in neutrophil elastase and calcium influx could not be detected with high standard deviations. This could be due to low sensitivities of the experimental setups or specificities of the parameters. However, a dependence on one or more mediators of NETosis in vivo must also be discussed in this context.

The in vivo experiments allowed investigations in TLR4 receptor deficient animals. There was a significant reduction in NE and MPO in TLR4-knockout animals. Only cf-DNA showed a significant increase in both experimental groups, possibly due to other apoptotic processes that occur more frequently in the knockout mice. In contrast to this assumption, TLR4-KO animals showed less impairment during the experiment, so that the cause of the increased cf-DNA cannot be conclusively clarified.

Based on this, we suggest a partial influence of the TLR4 receptor on NETosis and the severity of hemolytic uremic syndrome in a mouse model.

8. Anhang

I) Tabelle zu Abbildung 22: Überleben der Mäuse C57/B16 und TLR4-KO

Überleben der Gruppe C57/B16 nach Injektion mit Shiga-Toxin 2:

Planmäßige Euthanasie	10
<i>davon an Tag 1</i>	5
<i>davon an Tag 2</i>	5
<i>davon an Tag 3</i>	0
Euthanasie bei schlechtem Allgemeinzustand	9
<i>davon an Tag 1</i>	0
<i>davon an Tag 2</i>	0
<i>davon an Tag 3</i>	6
Verstorben	6
<i>davon an Tag 1</i>	0
<i>davon an Tag 2</i>	0
<i>davon an Tag 3</i>	6
Gesamte Tierzahl	25

Überleben der Gruppe TLR4-KO nach Injektion mit Shiga-Toxin 2:

Planmäßige Euthanasie	10
<i>davon an Tag 1</i>	5
<i>davon an Tag 2</i>	5
<i>davon an Tag 3</i>	0
Euthanasie bei schlechtem Allgemeinzustand	9
<i>davon an Tag 1</i>	0
<i>davon an Tag 2</i>	0
<i>davon an Tag 3</i>	9
Verstorben	1
<i>davon an Tag 1</i>	0
<i>davon an Tag 2</i>	0
<i>davon an Tag 3</i>	1
Gesamte Tierzahl	20

II) Score-Sheet des Tierversuchs

Frequenz: 3x täglich ab Versuchsbeginn

Symptome	Handlungsanweisung
I Körpergewicht bezogen auf Ausgangsgewicht [] bezogen auf Kontrollgruppe [X]	
ggr. Reduktion > 5 %	A
mgr. Reduktion > 10 %	B
hgr. Reduktion > 20 %	C
II Atmung Dyspnoe oder > 3 Punkte im MSS für respiratory rate und quality	C
III Allgemeinzustand/Spontanverhalten Geringgradige Störung (z.B. Fell ggr. ungepflegt, verringerte Bewegung oder ggr. gestörte Motorik)	A
mittelgradige Störung: (z.B. Fell mgr. verschmutzt, struppig, verschmutzte Augen; Isolation, mgr. gestörte Motorik)	B
hochgradige Störung (z.B. gekrümmte Körperhaltung, Pilorektion, Krämpfe; Lähmungen; Atemgeräusche; verklebte oder feuchte Körperöffnungen; unnormale Haltung; hoher Muskeltonus; Dehydratation, Apathie, Automutilation)	C
III Versuchsspezifische Kriterien Murine Sepsis Score >7 Appearance (0-4) Activity (0-4) Response to stimulus (0-4) Eyes (0-4) Respiratory quality (0-4) Respiratory rate (0-4)	C

Handlungsanweisungen (Beispiel, müssen versuchsspezifisch formuliert werden)

Die Abbruchkriterien und die zu tolerierende Maximalbelastung müssen versuchsspezifisch bestimmt werden. So erreicht z.B. bei einer prospektiv eingeschätzten geringen Gesamtbelastung ein mäßig belastetes Tier die Abbruchkriterien. In diesem Fall muss zusammen mit einem TSchB abgeschätzt werden, ob das Tier im Versuch belassen werden kann.

Sollte sich die Gesamtbelastung grundsätzlich als schwerer erweisen als prospektiv eingeschätzt, muss der TSchB informiert und ein Änderungsantrag gestellt werden.

Handlungsanweisung A (geringe Belastung)

Überwachungsfrequenz 2x täglich (Dokumentation in den Aufzeichnungen), ggf unterstützende Maßnahmen ergreifen (Spezialfutter, Wärmezufuhr etc.) und ggf. Tierarzt konsultieren.

Bei 2 oder mehr Symptomen der Kategorie A ist von einer mittleren Belastung auszugehen und Handlungsanweisung B ist zu berücksichtigen.

Handlungsanweisung B (mäßige Belastung)

Tier umgehend einschläfern oder Tierschutzbeauftragten kontaktieren, um weiteres Vorgehen abzusprechen.

Handlungsanweisung C (schwere Belastung)

Tier umgehend einschläfern oder Tierschutzbeauftragten kontaktieren, um weiteres Vorgehen abzusprechen.

III) Murine Sepsis Score (MSS) (Shrum, Anantha et al. 2014)

Aussehen

0	glattes Fell
1	Fell partiell aufgestellt
2	Mehrheit des Rückenfells aufgestellt
3	Piloerektion kann oder kann nicht vorhanden sein, Maus erscheint aufgequollen
4	Piloerektion kann oder kann nicht vorhanden sein, Maus erscheint abgemagert

Bewusstseinszustand

0	Maus ist aktiv
1	Maus ist aktiv, aber vermeidet es sich auf die Hinterbeine zu stellen
2	Aktivität ist merkbar verringert, noch gehfähig
3	Aktivität eingeschränkt, nur Bewegung wenn provoziert, Bewegungen mit Tremor
4	Aktivität stark eingeschränkt, Maus bleibt auf der Stelle wenn provoziert, mit möglichem Tremor

Aktivität

0	normales Ausmaß an Aktivität, Maus isst, trinkt, klettert, rennt, kämpft
1	leicht verringerte Aktivität, Bewegung am Käfigboden
2	reduzierte Aktivität, Maus bleibt an einer Stelle mit zeitweisem untersuchendem Verhalten
3	keine Aktivität, Maus bleibt an einer Stelle.
4	keine Aktivität, Maus mit Tremor, besonders an den Hinterbeinen.

Reaktion auf Stimulus

0	Maus reagiert sofort auf auditorisches Signal oder Berührung
1	langsame oder keine Reaktion auf auditorisches Signal, starke Reaktion auf Berührung (Flucht)
2	keine Reaktion auf auditorisches Signal, moderate Reaktion auf Berührung (bewegt sich einige Schritte)

3	keine Reaktion auf auditorisches Signal, milde Reaktion auf Berührung (keine Änderung des Standorts)
4	keine Reaktion auf auditorisches Signal, geringe oder keine Reaktion auf Berührung, kann sich nicht halten, wenn geschoben

Augen

0	Augen offen
1	Augen nicht vollständig offen, möglicherweise mit Sekretion
2	Augen bis halb geschlossen, möglicherweise mit Sekretion
3	Augen wenigstens halb oder ganz geschlossen, möglicherweise mit Sekretion
4	Augen geschlossen oder milchig

Atemmuster

0	normal
1	kurze Perioden von angestrenzter Atmung
2	angestrenzte Atmung, kein Schnappen nach Luft
3	angestrenzte Atmung und zeitweise Schnappen nach Luft
4	Schnappatmung

Atemfrequenz

0	normale, schnelle murine Atmung
1	leicht reduzierte Atemfrequenz (nicht per Auge quantifizierbar)
2	moderat reduzierte Atemfrequenz (knapp per Auge quantifizierbar)
3	stark reduzierte Atemfrequenz (einfach per Auge zählbar, 0,5 Sekunden zwischen Atemzügen)
4	sehr stark reduzierte Atemfrequenz (> 1 Sekunde zwischen Atemzügen)

IV) Material- und Geräteliste

Allgemeine Laborausstattung

Eppendorf Research Plus, 0,5 – 10 µL, mittelgrau	3123000020	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus, 0,1 – 2,5 µL, dunkelgrau	3123000012	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus, 2 – 20 µL, hellgrau	3123000098	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus, 2 – 20 µL, gelb	3123000039	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus, 10 – 100 µL, gelb	3123000047	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus, 20 – 200 µL, gelb	3123000055	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus, 100 – 1,000 µL, blau	3123000063	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus, 8-Kanal, 10 – 100 µL, gelb	3125000036	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus, 8-Kanal, 30 – 300 µL, orange	3125000052	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Integra Pipetboy 2 Serologische Pipette	155000	INTEGRA Biosciences, Zizers, Schweiz
Biosphäre Filter Tips 2.5µl	70.1130.217	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphäre Filter Tips 10µl	70.1130.215	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphäre Filter Tips 20µl	70.1114.215	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphäre Filter Tips 200µl	70.760.216	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphäre Filter Tips 300µl	70.765.215	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphäre Filter Tips 1000µl	70.762.216	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Cellstar Tubes, 15ml, PP	188271	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Tubes, 50ml, PP	227261	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Tubes, 50ml, PP, brown	227280	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Serological Pipette, 5ml	606180	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Serological Pipette, 10ml	607180	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Serological Pipette, 25ml	760180	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
PCR-Einzelgefäß, 0,2 ml	72.737.002	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safe Seal Reagiergefäß 0,5ml	72.704.400	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safe Seal Reagiergefäß 1,5ml	72.706.400	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safe Seal Reagiergefäß 2ml	72.695.400	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Tubes, 5ml	0030119401	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Aqua B. Braun Ecotainer Spüllösung	0082479E	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Thermo Scientific Nalgene Rapid Flow Sterile Einwegfiltrationsgeräte	10044550	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Parafilm 4in.x125ft.	P7793-1EA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Geräte

Cell Culture CO2 Incubator	MCO-19AIC-PE	Panasonic Healthcare, Ora-Gun, Japan
Zentrifuge 5430R Eppendorf	EP022620603	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sartorius Elektronische Feinwaage	BP 310 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Liebherr Labortiefkühlschrank Mediline Lgex 3410	LGex 3410	Liebherr, Ulm, Deutschland
Liebherr Laborkühlschrank Mediline LKUv 1610	LKUv 1610	Liebherr, Ulm, Deutschland
Thermo Scientific TSX Serie Ultratiefkühlgerät -80°C	TSX60086V	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Mikrowelle	HMT 882L	Robert Bosch, Gerlingen, Deutschland
FlexStation 3 Multi- Mode Microplate Reader	FLEX3	Molecular Devices, San Jose, USA
Basis Reiskocher Reishunger	RCP-30	Reishunger, Bremen, Deutschland
SONOREX SUPER RK 103 H Ultraschallbad	326	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
neoVortex® Schüttler	D-6012	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Heraeus Brutschrank B 5090 E	26166010	Heraeus, Hanau, Deutschland
S20 - SevenEasy pH	51302803	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Leica SM2010 R Schlittenmikrotom	1492010RUEL	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
TES 99 Paraffineinbettssystem	TES99.420	Medite Medical, Burgdorf, Deutschland
Epredia Citadel 2000 Tissue Processor	16125.00	Fisher Scientific, Loughborough, UK
LSB Aqua Pro Linear Shaking Water Bath Range	LSB18	Grant Instruments, Shepreth, UK
IKA Magnetrührer RH basic	5019700	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Laboratory shaker TT 30	846-042-300 TT30	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Lab Thermometer IP65 LT-102	30.1034.1.1	TFA Dostmann, Wertheim, Deutschland
Biometra T-Personal 48 Thermocycler	03823	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
QIAGEN Rotor Gene Q	R0814145	Qiagen, Venlo, Niederlande
BD FACS CANTO II	-	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA

Feuchte Kammer - Inkubationskammer	600016	Weckert, Kitzingen, Deutschland
Zentrifuge 5804R Eppendorf	EP022628146	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Biofuge Stratos	75005289R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Epoch Microplate Spectrometer	265816	BioTek Instruments, Vermont, USA
Take3 Micro-Volume Plate	273728	BioTek Instruments, Vermont, USA
HERAsafe KSP 9	51024057	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Olympus IX50 – S8F	6L03591	Olympus, Shinjuku, Japan
GFL 1083-Schüttelwasserbad	1086	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
Paraffin Streckbad	1052	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
Heizplatte MEDAX Typ 13800	10892	MEDAX Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
Para Cooler O	30360	Weinkauf Medizin & Umwelttechnik, Hallerndorf, Deutschland
Zeiss Axio Observer Z1	-	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland

Software

Microsoft Excel 2019	-	Microsoft, Redmond, USA
GraphPad Prism 8.4.3	-	GraphPad Software, San Diego, USA
BD FACS Diva v8.0.2	-	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA

Spezielle Materialien für die Versuche

Zellisolierung und Stimulation

MACSxpress Whole Blood Neutrophil Isolation Kit, human	130-104-434	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
RPMI 1640	21875034	Gibco, Life Technologies, Paisley, UK
DPBS (1x) 500ml	14190-144	Gibco, Life Technologies, Paisley, UK

Bovine Serum Albumin (BSA)	A7030-100G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumchlorid	1632-500G	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Calciumchlorid	CN93.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cellstar Tubes, 15ml, PP	188271	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Lipopolysaccharid aus Escherichia coli O55:B5	L2880	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Shiga-Toxin 2 von Escherichia coli	162L	List Laboratories, Campbell, USA
TAK242	614316	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tryptan Blue Solution	T8154	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MACSxpress Separator	130-098-308	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSmix™ Tube Rotator	130-090-753	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Cutasept F Haut Desinfizienz	455577	Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Safety Multifly Kanüle	85.1638235	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
S-Monovette EDTA K3E/7,5ml	01.1605.001	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland

Cf-DNA human

96 well Platte, schwarz, flat	655076	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Dimethyl sulfoxide	D4540-500ML	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sytox Orange Nucleic Acid Stain	S11368	Invitrogen, Life Technologies, Eugene, USA

Neutrophile Elastase human

96 well Platte, steril, clear	353072	Corning Incorporated, Durham, USA
Cell-Based Assay Buffer Tablet	10009322	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
MeOSuc-AAPV-pNA	17601	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

Calcium-Influx (Fluo8)

96 well Platte, schwarz, steril, clear	3603	Corning Incorporated, Kennebunk, USA
Fluo-8 Calcium Flux Assay Kit - No Wash	ab112129	abcam, Cambridge, UK

FACS Annexin V und PI

12-well Platte, steril	355043	Corning Incorporated, Durham, USA
Tube 5ml, 75x12mm, ps	55.1579	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Annexin-V-PE	556419	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
AutoMACS Rinsing Solution	130-091-222	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	A7030-100G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Propidium Iodide Staining Solution	51-66211E	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Annexin V Binding Buffer 10X	51-66121E	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA

qPCR

UltraPure Distilled Water DNase/Rnase Free	10977-035	Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA
--------------------------------------------	-----------	--------------------------------------------------

RNeasy Mini Kit	74104	Qiagen, Venlo, Niederlande
Maxima First Strand Synthesis Kit	K1641	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit	204074	Qiagen, Venlo, Niederlande
6-well Platte, Cellstar, sterile	657160	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
PCR 0,1 ml 4-Tube & 4- Cap Strips	711200	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Immunofluoreszenz MPO, H3cit und DNA human

12-well Platte, Cellstar, sterile	665180	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkultur Coverslips steril, 25mm	174985	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Methanol	1437.1011	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Deckgläser 24x46mm, Stärke 1 0,13-0,16mm	101202	Paul Marienfeld, Lauda- Königshofen, Deutschland
DAPI (4',6-diamidino-2- phenylindole)	D1306	Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA
Fluoromount-G	00-4958-02	Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA
Antikörper/Isokontrollen s. Seite 28		

Tierversuch

C57BL/6JRj Maus <i>14 Weibchen, 26 Männchen</i>	-	Forschungstierhaltung UKE, Hamburg, Deutschland
B6(Cg)-TLR4 tm1.2 Karp (TLR4-KO) Maus <i>10 Weibchen, 15 Männchen</i>	029015	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
Omnifix-F Luer Solo 0.001ml-1ml	9161406V	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Sterican Gr. 20, G 27 x 3/4"/0,40 x 20 mm, grau	4657705	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Isotone Natriumchloridlösung 0,9% Braun Injektionslösung	2350748	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Tramal 100mg/ml Lösung zum Einnehmen	11236125	Grünenthal, Aachen, Deutschland

Cf-DNA murin

96-well Platte, schwarz, flat	655076	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
DPBS (1x) 500ml	14190-144	Gibco, Life Technologies, Paisley, UK
UltraPure 0.5M EDTA, pH 8.0	15575-038	Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	A7030-100G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lambda DNA	SD0011	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sytox Orange Nucleic Acid Stain	S11368	Invitrogen, Life Technologies, Eugene, USA

Neutrophile Elastase murin

Mouse Neutrophil Elastase/ELA2/ELANE ELISA Kit PicoKine	EK1445	Boster, Pleasanton, USA
---------------------------------------------------------	--------	-------------------------

Myeloperoxidase murin

MPO mouse ELISA Kit	HK210-01	Hycult Biotech, Uden, Niederlande
---------------------	----------	-----------------------------------

Probenentnahme

Probebehältnisse	-	Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Paraformaldehyd (PFA) 4 %, in PBS pH 7,2	10303	Morphisto, Offenbach (Main), Deutschland
Microvette 500 K3E EDTA K	20.1341	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Minicaps Einmal-Kapillarpipetten end to end Na-Heparin	9000205	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Isofluran Baxter	HDG9623	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Fine Scissors - Tungsten Carbide, gerade, 25mm	14568-12	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Mikropinzette Ergoplant	FD253R	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland

9. Literaturverzeichnis

Agger, M., F. Scheutz, S. Villumsen, K. Molbak and A. M. Petersen (2015). "Antibiotic treatment of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection: a systematic review and a proposal." J Antimicrob Chemother **70**(9): 2440-2446.

Altrichter, J., S. Zedler, R. Kraft, E. Faist, S. R. Mitzner, M. Sauer, J. Windolf, M. Scholz and T. Logters (2010). "Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs), a potential prognostic marker for mortality in patients with severe burn injury." Eur J Trauma Emerg Surg **36**(6): 551-557.

Anderson, K. V., G. Jurgens and C. Nusslein-Volhard (1985). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product." Cell **42**(3): 779-789.

Andreoli, S. P. and J. M. Bergstein (1982). "Development of insulin-dependent diabetes mellitus during the hemolytic-uremic syndrome." J Pediatr **100**(4): 541-545.

Armstrong, G. L., J. Hollingsworth and J. G. Morris, Jr. (1996). "Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world." Epidemiol Rev **18**(1): 29-51.

Belaouaj, A., K. S. Kim and S. D. Shapiro (2000). "Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase." Science **289**(5482): 1185-1188.

Bell, B. P., M. Goldoft, P. M. Griffin, M. A. Davis, D. C. Gordon, P. I. Tarr, C. A. Bartleson, J. H. Lewis, T. J. Barrett, J. G. Wells and et al. (1994). "A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience." JAMA **272**(17): 1349-1353.

Berger, C. N., V. F. Crepin, K. Baruch, A. Mousnier, I. Rosenshine and G. Frankel (2012). "EspZ of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* regulates type III secretion system protein translocation." MBio **3**(5).

Bhattacharyya, S., W. Wang, Z. Tamaki, B. Shi, A. Yeldandi, Y. Tsukimi, M. Yamasaki and J. Varga (2018). "Pharmacological Inhibition of Toll-Like Receptor-4 Signaling by TAK242 Prevents and Induces Regression of Experimental Organ Fibrosis." Front Immunol **9**: 2434.

Boettcher, M., M. Esser, J. Trah, S. Klohs, N. Mokhaberi, J. Wenskus, M. Trochimiuk, B. Appl, K. Reinshagen, L. P. Raluy and M. Klinke (2020). "Markers of neutrophil activation and extracellular traps formation are predictive of appendicitis in mice and humans: a pilot study." Sci Rep **10**(1): 18240.

Boyd, B. and C. Lingwood (1989). "Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue." Nephron **51**(2): 207-210.

Brigotti, M., D. Carnicelli, V. Arfilli, N. Tamassia, F. Borsetti, E. Fabbri, P. L. Tazzari, F. Ricci, P. Pagliaro, E. Spisni and M. A. Cassatella (2013). "Identification of TLR4 as

the receptor that recognizes Shiga toxins in human neutrophils." J Immunol **191**(9): 4748-4758.

Brigotti, M., D. Carnicelli, E. Ravanelli, S. Barbieri, F. Ricci, A. Bontadini, A. E. Tozzi, G. Scavia, A. Caprioli and P. L. Tazzari (2008). "Interactions between Shiga toxins and human polymorphonuclear leukocytes." J Leukoc Biol **84**(4): 1019-1027.

Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch and A. Zychlinsky (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." Science **303**(5663): 1532-1535.

Celec, P., B. Vlkova, L. Laukova, J. Babickova and P. Boor (2018). "Cell-free DNA: the role in pathophysiology and as a biomarker in kidney diseases." Expert Rev Mol Med **20**: e1.

Cepeda-Molero, M., C. N. Berger, A. D. S. Walsham, S. J. Ellis, S. Wemyss-Holden, S. Schuller, G. Frankel and L. A. Fernandez (2017). "Attaching and effacing (A/E) lesion formation by enteropathogenic *E. coli* on human intestinal mucosa is dependent on non-LEE effectors." PLoS Pathog **13**(10): e1006706.

Chandler, W., S. Jelacic, D. Boster, M. Ciol, G. Williams, S. Watkins, T. Igarashi and P. Tarr (2002). "Prothrombotic coagulation abnormalities during *Escherichia coli* O157:H7 infections." N Engl J Med **346**(1): 23-32.

Clark, S. R., A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devinney, C. J. Doig, F. H. Green and P. Kubes (2007). "Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood." Nat Med **13**(4): 463-469.

Clayton, F., T. J. Pysher, R. Lou, D. E. Kohan, N. D. Denkers, V. L. Tesh, F. B. Taylor, Jr. and R. L. Siegler (2005). "Lipopolysaccharide upregulates renal shiga toxin receptors in a primate model of hemolytic uremic syndrome." Am J Nephrol **25**(6): 536-540.

Crowley, L. C., B. J. Marfell, A. P. Scott and N. J. Waterhouse (2016). "Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry." Cold Spring Harb Protoc **2016**(11).

Dinh, A., A. Anathasayanan and L. M. Rubin (2015). "Safe and effective use of eculizumab in the treatment of severe Shiga toxin *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome." Am J Health Syst Pharm **72**(2): 117-120.

Endo, Y., K. Tsurugi, T. Yutsudo, Y. Takeda, T. Ogasawara and K. Igarashi (1988). "Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins." Eur J Biochem **171**(1-2): 45-50.

Fadini, G. P., L. Menegazzo, M. Rigato, V. Scattolini, N. Poncina, A. Bruttocao, S. Ciciliot, F. Mammano, C. D. Ciubotaru, E. Brocco, M. C. Marescotti, R. Cappellari, G. Arrigoni, R. Millionsi, S. Vigili de Kreutzenberg, M. Albiero and A. Avogaro (2016).

"NETosis Delays Diabetic Wound Healing in Mice and Humans." Diabetes **65**(4): 1061-1071.

Fakhouri, F., J. Zuber, V. Fremeaux-Bacchi and C. Loirat (2017). "Haemolytic uraemic syndrome." Lancet **390**(10095): 681-696.

Frankel, G. and A. D. Phillips (2008). "Attaching effacing Escherichia coli and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal." Cell Microbiol **10**(3): 549-556.

Fraser, M. E., M. Fujinaga, M. M. Cherney, A. R. Melton-Celsa, E. M. Twiddy, A. D. O'Brien and M. N. James (2004). "Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from Escherichia coli O157:H7." J Biol Chem **279**(26): 27511-27517.

Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann and A. Zychlinsky (2007). "Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps." J Cell Biol **176**(2): 231-241.

Fuchs, T. A., A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, Jr., S. K. Wroblewski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig and D. D. Wagner (2010). "Extracellular DNA traps promote thrombosis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(36): 15880-15885.

Garg, A. X., R. S. Suri, N. Barrowman, F. Rehman, D. Matsell, M. P. Rosas-Arellano, M. Salvadori, R. B. Haynes and W. F. Clark (2003). "Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression." JAMA **290**(10): 1360-1370.

Gasser, C., E. Gautier, A. Steck, R. E. Siebenmann and R. Oechslin (1955). "[Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia]." Schweiz Med Wochenschr **85**(38-39): 905-909.

Gaut, J. P., G. C. Yeh, H. D. Tran, J. Byun, J. P. Henderson, G. M. Richter, M. L. Brennan, A. J. Lulis, A. Belaouaj, R. S. Hotchkiss and J. W. Heinecke (2001). "Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 11961-11966.

Gaytan, M. O., V. I. Martinez-Santos, E. Soto and B. Gonzalez-Pedrajo (2016). "Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens." Front Cell Infect Microbiol **6**: 129.

Geraissate, J. C., R. E. Yamamoto, D. L. Isaac and M. P. Avila (2014). "Hemorrhagic retinopathy in an infant with hemolytic-uremic syndrome." Arq Bras Oftalmol **77**(6): 397-399.

Gerber, A., H. Karch, F. Allerberger, H. M. Verweyen and L. B. Zimmerhackl (2002). "Clinical course and the role of shiga toxin-producing Escherichia coli infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study." J Infect Dis **186**(4): 493-500.

Guttman, J. A. and B. B. Finlay (2008). "Subcellular alterations that lead to diarrhea during bacterial pathogenesis." Trends Microbiol **16**(11): 535-542.

Hamaguchi, S., Y. Akeda, N. Yamamoto, M. Seki, K. Yamamoto, K. Oishi and K. Tomono (2015). "Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model." Mediators Inflamm **2015**: 614518.

Heitzer, E., L. Auinger and M. R. Speicher (2020). "Cell-Free DNA and Apoptosis: How Dead Cells Inform About the Living." Trends Mol Med **26**(5): 519-528.

Heitzer, E., L. Auinger and M. R. Speicher (2020). "Cell-Free DNA and Apoptosis: How Dead Cells Inform About the Living." Trends in Molecular Medicine **26**(5): 519-528.

Huang, R. S., J. J. Zhou, Y. Y. Feng, M. Shi, F. Guo, S. J. Gou, S. Salerno, L. Ma and P. Fu (2017). "Pharmacological Inhibition of Macrophage Toll-like Receptor 4/Nuclear Factor-kappa B Alleviates Rhabdomyolysis-induced Acute Kidney Injury." Chin Med J (Engl) **130**(18): 2163-2169.

Inward, C. D., A. J. Howie, M. M. Fitzpatrick, F. Rafaat, D. V. Milford and C. M. Taylor (1997). "Renal histopathology in fatal cases of diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. British Association for Paediatric Nephrology." Pediatr Nephrol **11**(5): 556-559.

Jeong, Y. J., S. K. Park, S. J. Yoon, Y. J. Park and M. S. Lee (2018). "Experimental In Vivo Models of Bacterial Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome." J Microbiol Biotechnol **28**(9): 1413-1425.

Jiang, L. J., Z. X. Xu, M. F. Wu, G. Q. Dong, L. L. Zhang, J. Y. Gao, C. X. Feng and X. Feng (2020). "Resatorvid protects against hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats." Neural Regen Res **15**(7): 1316-1325.

Jokiranta, T. S. (2017). "HUS and atypical HUS." Blood **129**(21): 2847-2856.

Joseph, A., A. Cointe, P. Mariani Kurkdjian, C. Rafat and A. Hertig (2020). "Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review." Toxins (Basel) **12**(2).

Khalid, M. and S. Andreoli (2018). "Extrarenal manifestations of the hemolytic uremic syndrome associated with Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC HUS)." Pediatr Nephrol.

Khan, M. A., A. Farahvash, D. N. Douada, J. C. Licht, H. Grasemann, N. Swezey and N. Palaniyar (2017). "JNK Activation Turns on LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis." Sci Rep **7**(1): 3409.

Kolman, J. P., L. Pagerols Raluy, I. Muller, V. O. Nikolaev, M. Trochimiuk, B. Appl, H. Wadehn, C. M. Ducker, F. D. Stoll, M. Boettcher, K. Reinshagen and J. Trah (2022). "NET Release of Long-Term Surviving Neutrophils." Front Immunol **13**: 815412.

- Kuzmich, N. N., K. V. Sivak, V. N. Chubarev, Y. B. Porozov, T. N. Savateeva-Lyubimova and F. Peri (2017). "TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis." Vaccines (Basel) **5**(4).
- Lai, Y., I. Rosenshine, J. M. Leong and G. Frankel (2013). "Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli." Cell Microbiol **15**(11): 1796-1808.
- Law, S. M. and R. D. Gray (2017). "Neutrophil extracellular traps and the dysfunctional innate immune response of cystic fibrosis lung disease: a review." J Inflamm (Lond) **14**: 29.
- Leffler, J., Z. Prohaszka, B. Mikes, G. Sinkovits, K. Ciacma, P. Farkas, M. Reti, K. Kelen, G. S. Reusz, A. J. Szabo, M. Martin and A. M. Blom (2017). "Decreased Neutrophil Extracellular Trap Degradation in Shiga Toxin-Associated Haemolytic Uraemic Syndrome." J Innate Immun **9**(1): 12-21.
- Loos, S., T. Ahlenstiel, B. Kranz, H. Staude, L. Pape, C. Hartel, U. Vester, L. Buchtala, K. Benz, B. Hoppe, O. Beringer, M. Krause, D. Muller, M. Pohl, J. Lemke, G. Hillebrand, M. Kreuzer, J. Konig, M. Wigger, M. Konrad, D. Haffner, J. Oh and M. J. Kemper (2012). "An outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O104:H4 hemolytic uremic syndrome in Germany: presentation and short-term outcome in children." Clin Infect Dis **55**(6): 753-759.
- Loudon, S. E., E. M. Dorresteijn, C. E. Catsman-Berrevoets, R. M. Verdijk, H. J. Simonsz and A. J. Jansen (2014). "Blinded by shiga toxin-producing O104 Escherichia coli and hemolytic uremic syndrome." J Pediatr **165**(2): 410-410 e411.
- Louise, C. B. and T. G. Obrig (1992). "Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of shiga toxin and lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells in vitro." Infect Immun **60**(4): 1536-1543.
- Lu, Y. C., W. C. Yeh and P. S. Ohashi (2008). "LPS/TLR4 signal transduction pathway." Cytokine **42**(2): 145-151.
- Majowicz, S. E., E. Scallan, A. Jones-Bitton, J. M. Sargeant, J. Stapleton, F. J. Angulo, D. H. Yeung and M. D. Kirk (2014). "Global incidence of human Shiga toxin-producing Escherichia coli infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis." Foodborne Pathog Dis **11**(6): 447-455.
- Malyukova, I., K. F. Murray, C. Zhu, E. Boedeker, A. Kane, K. Patterson, J. R. Peterson, M. Donowitz and O. Kovbasnjuk (2009). "Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **296**(1): G78-92.
- Margraf, S., T. Logters, J. Reipen, J. Altrichter, M. Scholz and J. Windolf (2008). "Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis." Shock **30**(4): 352-358.

Massberg, S., L. Grahl, M. L. von Bruehl, D. Manukyan, S. Pfeiler, C. Goosmann, V. Brinkmann, M. Lorenz, K. Bidzhekov, A. B. Khandagale, I. Konrad, E. Kennerknecht, K. Reges, S. Holdenrieder, S. Braun, C. Reinhardt, M. Spannagl, K. T. Preissner and B. Engelmann (2010). "Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases." Nat Med **16**(8): 887-896.

Matsunaga, N., N. Tsuchimori, T. Matsumoto and M. Ii (2011). "TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules." Mol Pharmacol **79**(1): 34-41.

Matussek, A., J. Lauber, A. Bergau, W. Hansen, M. Rohde, K. E. Dittmar, M. Gunzer, M. Mengel, P. Gatzlaff, M. Hartmann, J. Buer and F. Gunzer (2003). "Molecular and functional analysis of Shiga toxin-induced response patterns in human vascular endothelial cells." Blood **102**(4): 1323-1332.

McDaniel, T. K. and J. B. Kaper (1997). "A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing phenotype on E. coli K-12." Mol Microbiol **23**(2): 399-407.

Menne, J., M. Nitschke, R. Stingle, M. Abu-Tair, J. Beneke, J. Bramstedt, J. P. Bremer, R. Brunkhorst, V. Busch, R. Dengler, G. Deuschl, K. Fellermann, H. Fickenscher, C. Gerigk, A. Goettsche, J. Greeve, C. Hafer, F. Hagenmuller, H. Haller, S. Herget-Rosenthal, B. Hertenstein, C. Hofmann, M. Lang, J. T. Kielstein, U. C. Klostermeier, J. Knobloch, M. Kuehbacher, U. Kunzendorf, H. Lehnert, M. P. Manns, T. F. Menne, T. N. Meyer, C. Michael, T. Munte, C. Neumann-Grutzeck, J. Nuernberger, H. Pavenstaedt, L. Ramazan, L. Renders, J. Repenthin, W. Ries, A. Rohr, L. C. Rump, O. Samuelsson, F. Sayk, B. M. Schmidt, S. Schnatter, H. Schocklmann, S. Schreiber, C. U. von Seydewitz, J. Steinhoff, S. Stracke, S. Suerbaum, A. van de Loo, M. Vishedyk, K. Weissenborn, P. Wellhoner, M. Wiesner, S. Zeissig, J. Buning, M. Schiffer, T. Kuehbacher and E.-H. consortium (2012). "Validation of treatment strategies for enterohaemorrhagic Escherichia coli O104:H4 induced haemolytic uraemic syndrome: case-control study." BMJ **345**: e4565.

Mestas, J. and C. C. Hughes (2004). "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." J Immunol **172**(5): 2731-2738.

Metzler, K. D., T. A. Fuchs, W. M. Nauseef, D. Reumaux, J. Roesler, I. Schulze, V. Wahn, V. Papayannopoulos and A. Zychlinsky (2011). "Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity." Blood **117**(3): 953-959.

Mody, R. K., W. Gu, P. M. Griffin, T. F. Jones, J. Rounds, B. Shiferaw, M. Tobin-D'Angelo, G. Smith, N. Spina, S. Hurd, S. Lathrop, A. Palmer, E. Boothe, R. E. Luna-Gierke and R. M. Hoekstra (2015). "Postdiarrheal hemolytic uremic syndrome in United States children: clinical spectrum and predictors of in-hospital death." J Pediatr **166**(4): 1022-1029.

Mody, R. K., R. E. Luna-Gierke, T. F. Jones, N. Comstock, S. Hurd, J. Scheftel, S. Lathrop, G. Smith, A. Palmer, N. Strockbine, D. Talkington, B. E. Mahon, R. M. Hoekstra and P. M. Griffin (2012). "Infections in pediatric postdiarrheal hemolytic

uremic syndrome: factors associated with identifying shiga toxin-producing Escherichia coli." Arch Pediatr Adolesc Med **166**(10): 902-909.

Mohawk, K. L. and A. D. O'Brien (2011). "Mouse models of Escherichia coli O157:H7 infection and shiga toxin injection." J Biomed Biotechnol **2011**: 258185.

Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine and R. A. Giannella (1983). "Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit intestines." Infect Immun **41**(3): 1340-1351.

Müller, D. (2016). "S2k-Leitlinie: Hämolytisch-urämisches Syndrom im Kindesalter." AWMF-Register **166/002**.

Nathanson, S., T. Kwon, M. Elmaleh, M. Charbit, E. A. Launay, J. Harambat, M. Brun, B. Ranchin, F. Bandin, S. Cloarec, G. Bourdat-Michel, C. Pietrement, G. Champion, T. Ulinski and G. Deschenes (2010). "Acute neurological involvement in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome." Clin J Am Soc Nephrol **5**(7): 1218-1228.

Naylor, S. W., D. L. Gally and J. C. Low (2005). "Enterohaemorrhagic E. coli in veterinary medicine." Int J Med Microbiol **295**(6-7): 419-441.

Nolasco, L. H., N. A. Turner, A. Bernardo, Z. Tao, T. G. Cleary, J. F. Dong and J. L. Moake (2005). "Hemolytic uremic syndrome-associated Shiga toxins promote endothelial-cell secretion and impair ADAMTS13 cleavage of unusually large von Willebrand factor multimers." Blood **106**(13): 4199-4209.

Ogura, Y., S. I. Mondal, M. R. Islam, T. Mako, K. Arisawa, K. Katsura, T. Ooka, Y. Gotoh, K. Murase, M. Ohnishi and T. Hayashi (2015). "The Shiga toxin 2 production level in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 is correlated with the subtypes of toxin-encoding phage." Sci Rep **5**: 16663.

Okuda, T., N. Tokuda, S. Numata, M. Ito, M. Ohta, K. Kawamura, J. Wiels, T. Urano, O. Tajima, K. Furukawa and K. Furukawa (2006). "Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins." J Biol Chem **281**(15): 10230-10235.

Ostroff, S. M., Kobayashi, John M., Lewis, Jay H. (1989). "Infections With Escherichia coli O157:H7 in Washington State: The First Year of Statewide Disease Surveillance." JAMA **262**: 355-359.

Papayannopoulos, V. (2018). "Neutrophil extracellular traps in immunity and disease." Nat Rev Immunol **18**(2): 134-147.

Papayannopoulos, V., K. D. Metzler, A. Hakkim and A. Zychlinsky (2010). "Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps." J Cell Biol **191**(3): 677-691.

Psotka, M. A., F. Obata, G. L. Kolling, L. K. Gross, M. A. Saleem, S. C. Satchell, P. W. Mathieson and T. G. Obrig (2009). "Shiga toxin 2 targets the murine renal collecting duct epithelium." Infect Immun **77**(3): 959-969.

- Ramos, M. V., M. P. Mejias, F. Sabbione, R. J. Fernandez-Brando, A. P. Santiago, M. M. Amaral, R. Exeni, A. S. Trevani and M. S. Palermo (2016). "Induction of Neutrophil Extracellular Traps in Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome." J Innate Immun **8**(4): 400-411.
- Rivas, M., I. Chinen, E. Miliwebsky and M. Masana (2014). "Risk Factors for Shiga Toxin-Producing Escherichia coli-Associated Human Diseases." Microbiol Spectr **2**(5).
- Robson, W. L., A. K. Leung, R. Brant, C. L. Trevenen and D. K. Stephure (1995). "Hyperglycemia in diarrhea-associated hemolytic-uremic syndrome." Nephron **71**(1): 54-58.
- Rosales, A., J. Hofer, L. B. Zimmerhackl, T. C. Jungraithmayr, M. Riedl, T. Giner, A. Strasak, D. Orth-Holler, R. Wurzner, H. Karch and H. U. S. S. G. German-Austrian (2012). "Need for long-term follow-up in enterohemorrhagic Escherichia coli-associated hemolytic uremic syndrome due to late-emerging sequelae." Clin Infect Dis **54**(10): 1413-1421.
- Rutjes, N. W., B. A. Binnington, C. R. Smith, M. D. Maloney and C. A. Lingwood (2002). "Differential tissue targeting and pathogenesis of verotoxins 1 and 2 in the mouse animal model." Kidney Int **62**(3): 832-845.
- Saltzman, D. A., B. Chavers, W. Brennom, R. Vernier and R. L. Telander (1998). "Timing of colonic necrosis in hemolytic uremic syndrome." Pediatr Surg Int **13**(4): 268-270.
- Sandvig, K., Dyve, A. B., Skotland, T., Bergan, J. (2015). The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Fourth Edition), Academic Press.
- Sandvig, K., O. Garred, K. Prydz, J. V. Kozlov, S. H. Hansen and B. van Deurs (1992). "Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum." Nature **358**(6386): 510-512.
- Savage, P. J., K. G. Campellone and J. M. Leong (2007). "Interaction of enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) with mammalian cells: cell adhesion, type III secretion, and actin pedestal formation." Curr Protoc Microbiol **Chapter 5**: Unit 5A 1.
- Saxena, S. K., A. D. O'Brien and E. J. Ackerman (1989). "Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into Xenopus oocytes." J Biol Chem **264**(1): 596-601.
- Scheiring, J., S. P. Andreoli and L. B. Zimmerhackl (2008). "Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS)." Pediatr Nephrol **23**(10): 1749-1760.
- Schulz, A., L. Pagerols Raluy, J. P. Kolman, I. Konigs, M. Trochimiuk, B. Appl, K. Reinshagen, M. Boettcher and J. Trah (2020). "The Inhibitory Effect of Curosurf((R)) and Alveofact((R)) on the Formation of Neutrophil Extracellular Traps." Front Immunol **11**: 582895.

Shrum, B., R. V. Anantha, S. X. Xu, M. Donnelly, S. M. Haeryfar, J. K. McCormick and T. Mele (2014). "A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model." BMC Res Notes **7**: 233.

Sorensen, O. E. and N. Borregaard (2016). "Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils." J Clin Invest **126**(5): 1612-1620.

Suri, R. S., W. F. Clark, N. Barrowman, J. L. Mahon, H. R. Thiessen-Philbrook, M. P. Rosas-Arellano, K. Zarnke, J. S. Garland and A. X. Garg (2005). "Diabetes during diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: a systematic review and meta-analysis." Diabetes Care **28**(10): 2556-2562.

Takeda, T., S. Dohi, T. Igarashi, T. Yamanaka, K. Yoshiya and N. Kobayashi (1993). "Impairment by verotoxin of tubular function contributes to the renal damage seen in haemolytic uraemic syndrome." J Infect **27**(3): 339-341.

Tarr, P. I., C. A. Gordon and W. L. Chandler (2005). "Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome." Lancet **365**(9464): 1073-1086.

Tuttle, J., T. Gomez, M. P. Doyle, J. G. Wells, T. Zhao, R. V. Tauxe and P. M. Griffin (1999). "Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties." Epidemiol Infect **122**(2): 185-192.

Vaisbich, M. H. (2014). "Hemolytic-Uremic Syndrome in childhood." J Bras Nefrol **36**(2): 208-220.

van Setten, P. A., L. A. Monnens, R. G. Verstraten, L. P. van den Heuvel and V. W. van Hinsbergh (1996). "Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release." Blood **88**(1): 174-183.

Vincent, D., M. Klinke, G. Eschenburg, M. Trochimiuk, B. Appl, B. Tiemann, R. Bergholz, K. Reinshagen and M. Boettcher (2018). "NEC is likely a NETs dependent process and markers of NETosis are predictive of NEC in mice and humans." Sci Rep **8**(1): 12612.

Wang, Y., M. Li, S. Stadler, S. Correll, P. Li, D. Wang, R. Hayama, L. Leonelli, H. Han, S. A. Grigoryev, C. D. Allis and S. A. Coonrod (2009). "Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation." J Cell Biol **184**(2): 205-213.

Wolf, M. K. (1997). "Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*." Clin Microbiol Rev **10**(4): 569-584.

Wong, A. R., J. S. Pearson, M. D. Bright, D. Munera, K. S. Robinson, S. F. Lee, G. Frankel and E. L. Hartland (2011). "Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements." Mol Microbiol **80**(6): 1420-1438.

Wong, C. S., J. C. Mooney, J. R. Brandt, A. O. Staples, S. Jelacic, D. R. Boster, S. L. Watkins and P. I. Tarr (2012). "Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with Escherichia coli O157:H7: a multivariable analysis." Clin Infect Dis **55**(1): 33-41.

Zoja, C., S. Angioletti, R. Donadelli, C. Zanchi, S. Tomasoni, E. Binda, B. Imberti, M. te Loo, L. Monnens, G. Remuzzi and M. Morigi (2002). "Shiga toxin-2 triggers endothelial leukocyte adhesion and transmigration via NF-kappaB dependent up-regulation of IL-8 and MCP-1." Kidney Int **62**(3): 846-856.

Zoja, C., S. Buelli and M. Morigi (2017). "Shiga toxin triggers endothelial and podocyte injury: the role of complement activation." Pediatr Nephrol.

10. Danksagung

Ich danke den Herren Prof. Dr. med. K. Reinshagen und Prof. Dr.med. M. Boettcher für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu dürfen und die damit verbundenen Einblicke.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Dr. med. J. Trah für die Betreuung dieser Arbeit. Ohne die fortwährende Unterstützung, Diskussionen und Hilfestellungen wäre die Fertigstellung dieser nicht möglich gewesen.

Weiterhin gilt ein besonderer Dank Dr. rer. nat. L. Pagerols-Raluy für ihre fachliche Unterstützung und wertvollen Ratschläge, die wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben. Auch bedanke ich mich bei Frau M. Trochimiuk für die tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit mit den Tieren. Ohne ihre Mitarbeit, auch außerhalb der regulären Arbeitszeiten, wäre die Durchführung für mich nicht denkbar gewesen. Ebenso danke ich ihr und Frau B. Appl für die stetige Unterstützung beim Erlernen neuer Versuchstechniken und bei der Durchführung von Versuchen, insbesondere der Immunofluoreszenzfärbungen.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. med. S. Loos für die fachliche Unterstützung mit seinem fundierten Wissen auf dem Gebiet des hämolytisch-urämischen Syndroms.

Ich möchte mich zudem bei den Mitarbeiter:innen des Instituts für experimentelle Herz-Kreislaufforschung unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. V. Nikolaev sowie der FACS Core Unit, der Klinik für Dermatologie und der Tierhaltung des UKE für die Möglichkeit zur Nutzung ihrer Einrichtungen im Rahmen meiner Versuche und deren stete fachliche Unterstützung bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt außerdem Frau C. Dücker für ihre Hilfestellungen sowie Frau J. Hagens für die fachliche Unterstützung beim Erlernen neuer Versuchsmethoden.

Zuletzt gilt ein großer Dank meiner Familie und meinen Freunden für deren immerwährende Unterstützung und lieben Worte, die mich stets motiviert haben.

11. Lebenslauf

Geburtsdatum: 01.03.1998

Geburtsort: Schwedt/Oder

Studium

<i>01.12.2022</i>	Approbation als Ärztin
<i>10/2016-11/2022</i>	Medizinstudium am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
<i>11/2022</i>	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>11/2021-10/2022</i>	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Jena
<i>10/2021</i>	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>07/2019</i>	Äquivalenz zum Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Klinische Erfahrung

<i>seit 02/24</i>	Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerz- und Palliativmedizin Asklepios Klinikum Hamburg Harburg
<i>01/2023-01/2024</i>	Assistenzärztin in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie Asklepios Klinikum Hamburg Harburg

Wissenschaftliche Ausbildung

<i>10/2021</i>	Poster beim Kongress der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin
<i>01/2020</i>	Versuchstierkundlicher Kurs mit Schwerpunkt Maus Module A1 und D

Fremdsprachen

Deutsch: Muttersprache

Englisch: Sprachniveau C1

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: 