

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der Einfluss von genetischen Variationen des
Endotoxin-Rezeptor-Komplexes auf Empfänglichkeit und Verlauf
von systemischen Infektionserkrankungen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Oliver Michael Kumpf

aus Stuttgart

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. R. Schumann
 2. Prof. Dr. med. F. M. Brunkhorst
 3. Prof. Dr. med. H. Gerlach

Datum der Promotion: 18. November 2011

INHALTSVERZEICHNIS

1	Verzeichnis der Abkürzungen	4
2	Zusammenfassung	5
2.1	Abstract	5
2.2	Einleitung	6
2.3	Zielstellung	7
2.4	Methodik	7
2.5	Ergebnisse	10
2.6	Diskussion	11
2.7	Literaturverzeichnis	17
2.8	Tabelle 1	20
2.9	Abbildung 1	21
3	Anteilerklärung	22
4	Ausgewählte Publikationen	
	Pre- and postoperative cytokine release after in vitro whole blood lipopolysaccharide stimulation and frequent toll-like receptor 4 polymorphisms	23
	A coding mutation within the first exon of the human MD-2 gene results in decreased lipopolysaccharide-induced signaling	24
	Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts	25
5	Lebenslauf	36
6	Publikationsliste	37
7	Selbständigkeitserklärung	39
8	Danksagung	40

1 Verzeichnis der Abkürzungen

CD	"Cluster of Differentiation"
CpG-DNA	Cytosin-Phosphat-Guanin-DNA Sequenzmotiv
DAMP	"Danger associated molecular pattern"
dsRNA	Doppel-Strang RNA, "double-stranded RNA",
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HMGB-1	"High-mobility group B protein-1"
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HSV1	Herpes-simplex-Virus 1
I-kappa-B	"Inhibitor of kappa-light-chain-gene enhancer in B cells"
IKK	I-kappa-B Kinase
IL	Interleukin
IRAK	IL-1-Rezeptor-assozierte Kinase
IRF3	"Interferon regulatory factor 3"
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-rich repeats
Mal	"Myd88 adaptor-like"
MD-2	"Myeloid differential factor-2"
MMTV	Maus-Mammatumovirus
MyD88	"Myeloid differentiation primary response gene 88"
NEMO	"NF-kappaB essential modulator"
NF-kappaB	"Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells", NF-κB
PAMP	"Pathogen associated molecular pattern"
PRR	"Pattern recognition receptor"
RFLP	Restriktionslängen Fragment Polymorphismus
RSV	Respiratory-Syncytial-Virus
SNP	"Single nucleotide polymorphism"
SSCP	"Single strand conformation polymorphism"
ssRNA	"Single stranded RNA", Einzelstrang RNA
TANK	"TRAF-associated NF-kappaB activator"
TBK	"TANK-binding Kinase"
TIR	TIR (Toll-IL-1 receptor) domain
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLR	"Toll-like receptor",
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF	"Tumor necrosis factor receptor-associated factor"
TRAM	"TRIF-related adaptor molecule"
TRIF	"TIR-domain-containing adaptor inducing IFN-β"

2 Zusammenfassung

Der Einfluss von genetischen Variationen des Endotoxin-Rezeptor-Komplexes auf Empfänglichkeit und Verlauf von systemischen Infektionserkrankungen

2.1 Abstract:

Lipopolysaccharid (LPS), ein Hauptbestandteil Gram-negativer Bakterien, wird durch den Rezeptorkomplex des Toll-like Rezeptor (TLR)4, vom angeborenen Immunsystem des Menschen erkannt. Genetische Variationen, sogenannte single nucleotide polymorphisms (SNPs), von Bestandteilen dieses Komplexes sind möglicherweise verantwortlich für die Empfindlichkeit des Organismus, eine bakterielle Infektion zu erleiden oder beeinflussen deren Schweregrad. In einer prospektiven Untersuchung an 62 Patienten wurde gezeigt, dass der TLR4 Polymorphismus Asp299/Thr399 bei ex-vivo Vollblutstimulation durch LPS die Produktion von TNF und IL-6 nicht beeinflusst. Zusätzlich wurde eine seltene genetische Variation des extrazellulären Adapters von TLR4, MD-2 gefunden, der eine verminderte Stimulierbarkeit von NF- κ B und in einer Patientin eine deutlich verminderte Zytokinantwort zeigte, jedoch keinen Einfluss auf die Expression oder das Bindungsverhalten des Moleküls. Eine dritte Studie ging der Frage nach, ob ein SNP in dem intrazellulären Adaptermolekül von TLR4, TIRAP/Mal, Einfluss auf Infektionshäufigkeit und Verlauf sowie in-vivo und in-vitro Zytokinantwort hat. Es zeigte sich bei retrospektiver Analyse von 375 Patienten, dass das simultane Vorliegen von TLR4 und TIRAP/Mal Polymorphismen sowie der homozygote Trägerstatus für TIRAP/Mal den Verlauf von septischen Erkrankungen negativ beeinflussen. In einer griechischen Patientengruppe mit Gram-negativer Sepsis zeigte sich, dass eine Assoziation zwischen dem doppelt mutierten Genotyp und niedrigeren Zytokinserumspiegeln besteht. Diese Patienten hatten zudem eine verminderte Stimulierbarkeit von Zytokinen in ex-vivo Monozyten-Stimulationsversuchen. Aus einer dritten prospektiven Untersuchung an 54 Patienten nach kardio- und gefäßchirurgischen Eingriffen hatte nach einer Fall-Kontroll-Analyse der Genotyp keinen Einfluss auf die Freisetzung von Zytokinen. Zusammenfassend existiert eine Assoziation zwischen der Existenz von genetischen Variationen des TLR4-Komplexes und seiner Adaptermoleküle und dem Verlauf schwerer Infektionen. Ebenso ist ein funktioneller Effekt dieser SNPs im Rahmen von Infektionskrankheiten detektierbar. Diese Unterschiede sind bei sterilen Inflammationsreaktionen nicht nachzuweisen.

2.2 Einleitung:

Schwere systemische Infektionen, z.B. nach operativen Eingriffen, stellen eine große medizinische Herausforderung dar ¹⁻³. Ein elementarer Bestandteil der konzertierten Infektionsabwehr des Menschen ist das angeborene Immunsystem ⁴. Mustererkennende Rezeptoren haben als Teil der angeborenen Abwehr in der Erkennung pathogener Keime eine herausragende Bedeutung. Fast alle Phänomene der frühen Immunantwort, wie sie bei der Akutphasereaktion auftreten, sind zu großen Teilen durch das angeborene Immunsystems hervorgerufen ⁵. Aber auch die Initiierung des adaptiven Immunsystems hängt wesentlich von der angeborenen Immunantwort ab ⁶.

Die Phänomene der angeborenen Immunantwort treten unterschiedlich ausgeprägt bei einzelnen Individuen auf. Ein Teil der Unterschiede der Reaktion bei ähnlichen exogenen Noxen, ist auf Begleiterkrankungen zurückzuführen, ein anderer aber auf individuelle genetische Variationen ⁷. Es liegt daher nahe, genetische Variationen in den Elementen der angeborenen Immunität zu suchen, und zu prüfen, ob sie an der interindividuellen Ausprägung der systemischen Wirtsreaktion auf Infektionen beteiligt sind.

Es besteht kein Zweifel, dass eine unzureichende angeborene Immunantwort den Verlauf von Infektionen beeinflusst ⁸. So konnte gezeigt werden, dass z.B. genetische Varianten des Tumor-Nekrose Faktors (TNF) in der frühen angeborenen Immunreaktion den Verlauf des septischen Schocks beeinflussen ⁹.

Genetische Varianten können in vielfältiger Form vorkommen ¹⁰. Hierbei sind sogenannte „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) von besonderem Interesse. Dies sind Austausche von Einzelbasen des Genoms, die über eine Veränderung der Aminosäuresequenz wahrscheinlich die Funktion des Proteins beeinflussen. Neben diesen kodierenden SNPs existieren auch SNPs in nicht-kodierenden Genbereichen, die z.B. über die Beeinflussung der Ableserate die gebildete Proteinmenge nach Gen-aktivierung verändern ¹¹.

Eine der ersten Schnittstellen zwischen Krankheitserregern und dem menschlichen Organismus sind mustererkennende Rezeptoren ("pattern recognition receptors" oder PRR), die spezielle hochkonservierte molekulare Strukturen ("pathogen associated molecular patterns" oder PAMP) erkennen können. Auch körpereigene und nicht-mikrobielle Fremdstoffe werden durch mustererkennende Rezeptoren erkannt. Zusammen mit diesen als "Alarminen" bezeichneten Molekülen werden sie als Gefahr-assoziierte molekulare Strukturen oder "danger associated molecular patterns", DAMPs bezeichnet ¹².

Eine Gruppe der mustererkennenden Rezeptoren sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs). Tabelle 1 zeigt die momentan bekannten humanen TLRs. Von diesen momentan

bekanntesten zehnten TLR ist TLR4 der Rezeptor, der die Erkennung von Lipopolysaccharid (Endotoxin) vermittelt^{13, 14}, neben anderen mikrobiellen Strukturen und körpereigenen Liganden. Der extrazelluläre Anteil der TLRs und anderer PRRs ist durch sogenannte „Leucin-reiche Wiederholungssequenzen“ („Leucin rich repeats“ oder LRRs) charakterisiert. Die Aktivierung von TLR4 benötigt extrazelluläre und intrazelluläre Adapter. In Abhängigkeit von den aktivierenden Liganden werden zwei unterschiedliche Signalwege aktiviert. In einem MyD88-abhängigen Weg werden über die Aktivierung von NF-κB Zytokine wie TNF und IL-1β freigesetzt. Über den MyD88-unabhängigen, TRIF-abhängigen Signalweg wird die Ausschüttung von Typ-1 Interferonen angeregt¹⁵. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 1. Die Bedeutung von genetischen Variationen ist gerade in diesem Rezeptor bedeutsam, da schon in verschiedenen Untersuchungen eine funktionelle und klinische Relevanz nachgewiesen wurde¹⁶. Die Ausprägung dieser Reaktion des Wirtes korreliert im Allgemeinen mit der Höhe der Zytokinantwort und von der koordinierten Freisetzung der Zytokine und in der weiteren Folge ihrer Gegenregulatoren hängt wesentlich ab, ob der Wirt die eindringenden Infektionserreger erfolgreich abwehren kann.

2.3 Zielstellung

In einer Genassoziationsstudie sollte geprüft werden inwieweit genetische Variationen des TLR4 und seiner extra- und intrazellulären Adapterproteine - als zentrale Bestandteile der angeborenen Immunität gegen bakterielle Infektionen - die interindividuellen Unterschiede in der beschriebenen Immunreaktion beeinflussen. Eine zweite Fragestellung die mit dieser Arbeit verfolgt werden soll ist eine mögliche Assoziation der genetischen Varianten mit dem Verlauf postoperativer Infektionen. Ob ein genetischer Einfluss auf die Ausprägung der Zytokinantwort im Rahmen von Infektionserkrankungen sich von steril ausgelösten Akutphasereaktionen unterscheidet, ist die dritte Frage, die in dieser Arbeit nachgegangen werden soll.

2.4 Methodik

Für die vorliegende Arbeit wurden in einer Genassoziationsstudie insgesamt vier Patientenkollektive ausgewertet. Für den ersten Teil der Studie war in einer prospektiven Kohortenstudie ein Patientenkollektiv auf bekannte genetische Varianten im TLR4 Rezeptor hin untersucht worden. Nach Aufklärung der Patienten wurde der Polymorphismus Asp299Gly/Thr399Ile (rs4986790 für Asp299Gly, rs4986791 für Thr399Ile) im TLR4 mittels

Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus („RFLP“) untersucht. Im Rahmen des Studienprotokolls wurde den Patienten vor und nach großen operativen Eingriffen Vollblut aus liegenden Kathetern venös oder arteriell entnommen. Dieses wurde nach Herstelleranweisungen mit Lipopolysaccharid ex-vivo für 4 Stunden mit einer definierten Dosis (50 pg/ml) stimuliert. Aus den bei -70 °C tiefgefrorenen Serumüberständen wurde dann mit kommerziellen Test-Kits die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6 bestimmt. Die Mittelwerte der Zytokinkonzentrationen wurden dann mit den Genotypen der Patienten in Beziehung gesetzt. Zudem wurden die Häufigkeit und die Ausprägungsschwere von postoperativen Infektionen prospektiv erfasst, und zwischen den untersuchten Genotypen verglichen. Für die Mittelwertvergleiche wurden der t-Test oder der Mann-U-Whitney Test in Abhängigkeit von der Fallzahl herangezogen. Die kategorialen Daten wurden mittels Kreuztabellen und Chi²-Test verglichen.

In der zweiten Arbeit wurde gezielt nach genetischen Variationen des Gens des extrazellulären Adapters von TLR4, MD-2, mittels "single strand conformation polymorphism" (SSCP) Technik gesucht. Die dabei gefundene Mutation wurde mittels „reporter gene assay“ in HEK-293 Zellen auf funktionelle Veränderungen untersucht, wobei hier die Reaktion des Rezeptorkomplexes auf LPS durch Messung der NF-κB Aktivierung in dem Zellsystem untersucht wurde. Zur weiteren Prüfung funktioneller Beeinflussung durch die Mutation wurden die jeweils gefundenen Genotypen mit den in der Studie gemessenen Zytokinwerten im Serum und denen nach der oben erwähnten ex-vivo Stimulation verglichen.

Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen gaben dann Anlass zu der dritten Studie, die aus mehreren Anteilen bestand. In ihr wurden neben den erwähnten SNPs des TLR4 weitere Genvariationen in dem intrazellulären Adapter des TLR4 Rezeptorkomplex namens TIRAP/Mal (Ser180Leu, rs8177374) untersucht: Zunächst wurde in einer retrospektiven Kohortenstudie eine Gruppe von Patienten, welche nach einem chirurgischen Eingriff intensivmedizinisch behandelt wurde, anhand der der Krankenakten auf das Vorliegen relevanter infektiöser Komplikationen hin untersucht. Dabei wurde eine längere Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation als die mediane Verweildauer (6,4 Tage) oder das Versterben nach dem operativen Eingriff als Indikator für einen komplizierten Verlauf gewählt. Es resultierte eine Gesamtkohorte von 601 Patienten. Nach Anwendung der Ausschlusskriterien wurde von den verbliebenen 375 Patienten routinemäßig gesammeltes Gewebematerial oder Blut auf das Vorliegen von Genpolymorphismen untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den Patientendaten verglichen. Hierbei kamen Kreuztabellen zum Einsatz. Die Unterschiede zwischen den Häufigkeiten der Erkrankungsausprägung wurden

mittels Chi^2 -Test ermittelt. Die Risikoschätzung erfolgte mittels Berechnung der odds-ratio (Mantel-Haenszel-Statistik und Fishers exaktem Test). Im zweiten Teil der Untersuchung wurde untersucht, ob die gefundene Häufung schwerer septischer Krankheitsverläufe bei Patienten mit vorhandenen SNPs im Gen für TIRAP/Mal und der Kombination und TLR4 bestätigt werden könnte. Hierzu wurden Patienten aus einer griechischen Kohorte untersucht. Bei diesen Patienten lagen bereits ausführliche phänotypische Analysen vor, u.a. Beschreibung der Krankheitsbilder sowie Serumzytokinwerte an verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs und Daten aus ex-vivo Versuchen, bei denen Monozyten der Patienten mit Lipopolysaccharid stimuliert wurden. Genetisches Material dieser Patienten wurde am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charite auf o.g. Genvarianten untersucht. Diese wurden dann mit den vorliegenden Patientendaten korreliert und statistisch durch Mittelwertvergleiche (Mann-U-Whitney Test) ausgewertet.

Der letzte Teil der Untersuchung beinhaltete Patienten aus einer Kooperationsstudie mit der Universitätsklinik Düsseldorf. Diese wurden in einer prospektiven Studie auf den Zusammenhang von Genpolymorphismen im TLR-Apparat und der Antwort der HHN-Achse hin untersucht. Mittels Fall-Kontroll Analyse wurde eine Patientensubgruppe, die sich einem kardiochirurgischen Eingriff mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine unterzogen hatte ausgewählt. Diese Patienten wurden genotypisiert und die gemessenen Zytokinwerte wurden mit dem Genotyp verglichen. Mögliche Unterschiede zwischen den Zytokinkonzentrationen der einzelnen Genotypen wurden mittels Wilcoxon's Rangsummen Test oder dem Kruskal-Wallis Test statistisch ausgewertet. Beim Vergleich innerhalb der Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni-Korrektur angewandt.

Alle in die prospektiven Studien eingeschlossenen Patienten haben in die Untersuchungen zuvor eingewilligt. Die lokalen Ethikkommissionen der beteiligten Einrichtungen haben den Untersuchungen jeweils zugestimmt. Die Patienten der retrospektiven Analyse hatten vor der chirurgischen Therapie eine entsprechende Einwilligung zur Untersuchung von Körpermaterialien im Rahmen der Erforschung von Tumorerkrankungen und den Folgezuständen abgegeben.

Sämtliche genetische Untersuchungen wurden mit etablierten Verfahren durchgeführt. Einerseits wurde Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus "RFLP" zur Detektion der Genpolymorphismen angewandt, andererseits wurden PCR-basierte Methoden (LightCycler®, Fa. Roche, Mannheim) genutzt. Bei unklaren Befunden kamen beide Methoden zur Anwendung. Die Untersuchung der Zytokinkonzentrationen erfolgte ebenfalls

mit etablierten Methoden und zumeist unter Anwendung kommerziell erhältlicher Messverfahren.

2.5 Ergebnisse

In der ersten prospektiven Kohortenstudie wurde 62 Patienten zu den definierten perioperativen Zeitpunkten Vollblut abgenommen und stimuliert. Die vollständig vorliegenden Zytokinwerte von 36 dieser Patienten wurden mit dem Genotyp korreliert (Mann-Whitney Test). Es zeigte sich, dass die Höhe der ZytokinKonzentrationen an den einzelnen Messzeitpunkten nicht durch den Genotyp beeinflusst wurde. Der Verlauf der Zytokinantwort war ebenfalls identisch. Es fanden sich geringe Unterschiede bezüglich der Infektionsarten in den einzelnen Gruppen, die statistisch nicht signifikant waren. Wenn Infektionen auftraten waren die absoluten ZytokinKonzentrationen im Verlauf unterschiedlich, wobei erwartungsgemäß höhere Konzentrationen bei schwerer Infektion auftraten. Insgesamt unterschied sich aber die Höhe der Zytokinwerte unter den Gruppen verschiedener Genotypen nicht.

In der zweiten Untersuchung wurde das genetische Material der Patienten aus der vorher beschriebenen Kohorte auf eventuelle genetische Variationen des extrazellulären Adaptermoleküls "myeloid-differentiation factor 2" (MD-2) hin untersucht. Durch SSCP wurde eine Mutation gefunden, die zu einem Basenaustausch von Adenosin zu Guanin an der Position 103 führt. Im Protein zeigte sich ein Aminosäureaustausch an der Position 35 von Threonin zu Alanin. In den funktionellen Untersuchungen konnte keine Veränderung der Expression von MD-2 in den transfizierten Zellen gesehen werden. Auch konnte keine Änderung des Bindungsverhaltens von MD-2 an TLR4 gesehen werden. Jedoch zeigte sich eine verminderte Aktivität von NF- κ B nach Stimulation mit LPS um ca. 30%. Eine Patientin, die trug diese Mutation und hatte einen unkomplizierten postoperativen Verlauf. Es zeigte sich, dass die Zytokin Spiegel im Vergleich zu 12 anderen Patienten aus der Gruppe unterschiedlich waren, wobei die Patientin deutlich niedrigere Spiegel nach LPS-Stimulation hatte. Bei Genotypisierung einer größeren Patientengruppe stellte sich heraus, dass es sich um eine seltene Mutation handelt. Eine weitere Verallgemeinerung der erhobenen Daten ließ dieses einzelne Ergebnis daher nicht zu.

Im dritten Teil der Untersuchungen wurden weitere drei Patientenkollektive untersucht. Der bereits untersuchte TLR4 SNP (Asp299Gly/Thr399Ile) hatte in der ersten retrospektiven Analyse keinen Einfluss auf Art, Häufigkeit und Schwere von postoperativen Infektionen. Die Untersuchung auf einen SNP (Ser180Leu) des intrazellulären Adapter

TIRAP/Mal, zeigte dann analog zu dem TLR4 Polymorphismus, dass sich Art und Häufigkeit der Infektionen zwischen Wilytyp und Allelträgern nicht unterschieden. Als Hinweis auf die Relevanz des untersuchten TIRAP/Mal SNP fanden sich dennoch zwei wesentliche Befunde: Zum einen hatten Patienten mit simultanen Mutationen in TLR4 und TIRAP/Mal ein höheres Risiko, eine schwere Sepsis zu erleiden. Zum anderen zeigte sich dieser Befund auch bei Patienten, die homozygot für den TIRAP/Mal SNP waren. Die funktionelle Relevanz dieser genetischen Kombinationen war mit den vorliegenden Untersuchungsmaterialien nicht zu prüfen. Daher wurde eine zweite Kohorte auf diese SNP-Kombination hin untersucht, wobei sich eine gleiche Allel-Häufigkeit zeigte. Die in-vivo und in-vitro Zytokindaten dieser Patienten unterstützten die Hypothese von funktionell relevanten SNPs. Patienten mit beiden Mutationen zeigten deutlich niedrigere Zytokinspiegel- und eine geringere LPS-Stimulierbarkeit von Monozyten. Die klinischen Verläufe waren allerdings durch diese SNP-Kombination nicht beeinflusst.

Inwieweit die Beeinflussung der Zytokinkonzentration durch die SNP-Kombination von der Art der inflammatorischen Stimuli abhing, sollte mit der dritten Patientenkohorte geklärt werden. Beim Vergleich der Genotypen konnte der gesehene Einfluss der SNP-Kombination nicht bestätigt werden. Alle Genotypen hatten eine identische postoperative Zytokinantwort was Verlauf und Ausprägung angeht. Bemerkenswert war der Befund, dass in der sterilen Inflammation die Zytokinantwort insgesamt ausgeprägter war mit z.B. ca. 3-fach höheren Werten für IL-6. Eine Korrelation mit klinischen Verläufen war bei der insgesamt geringen Anzahl von Infektionen in dieser Kohorte nicht möglich.

2.6 Diskussion

Genetische Einflüsse auf das angeborene Immunsystem beeinflussen nach momentanem Kenntnisstand mit großer Wahrscheinlichkeit die Ausprägung der Immunantwort bei einer großen Anzahl von Infektionskrankheiten. Schon früh zeigte sich beispielsweise, dass Patienten mit Malaria durch die Sichelzellanämie oder andere erbliche Erythrozytopathien geschützt sind ¹⁷. Hierbei standen der Gendefekt und die Infektionskrankheit in einer gewissen Konkurrenz. Der Selektionsdruck durch die häufige und gefährliche Infektionskrankheit ließ auch eine potentiell bedrohliche genetische Erkrankung eher in den Hintergrund treten. Dass ein genetischer Einfluss auf den Verlauf oder die Empfänglichkeit für Infektionskrankheiten existiert, wurde auch in einer wichtigen Zwillingsstudie nachgewiesen. Sie zeigte, dass Zwillinge, die nach der Geburt getrennt

wurden, beim Vergleich der Todesursache am stärksten phänotypisch bei den Infektionskrankheiten übereinstimmen¹⁸.

Da das Immunsystem aus einer großen Zahl verschiedener Untersysteme mit unzähligen Komponenten besteht ist es schwierig, einzelne genetische Varianten zu isolieren, die besonders starken Einfluss haben. Allerdings können zentrale Faktoren wichtiger Signalwege – wenn genetisch verändert – dramatische Konsequenzen haben, wie das Beispiel bezüglich einer IRAK4-Mutation zeigt: Hier ist eine Kernkomponente des intrazellulären Signalweges einzelner Toll-like Rezeptoren gestört und als Konsequenz treten vor allem in der Kindheit häufig schwere bakterielle Infektionen auf^{8, 19}. Das bedeutet, dass auch weitere genetische Varianten im Bereich der Mustererkennung denkbar sind, die in ähnlicher Weise die Infektionsabwehr beeinflussen.

TLR4 verfügt im Gegensatz zu allen anderen TLRs über einen etwas komplexeren Signalweg, der verschiedene Adaptermoleküle beinhaltet. Die hier durchgeführten Untersuchungen beschäftigen sich mit der Aktivierung des TLR4 durch LPS. TLR4 selbst liegt in dimerisierter Form vor. In funktionellen Analysen zeigte sich, dass der Rezeptor über eine intrazelluläre Signalkaskade, die auch das hier untersuchte Adaptermolekül TIRAP/Mal umfasst, die Zelle stimuliert. TLR4 einschließlich der involvierten Ko-moleküle ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

Die funktionelle Relevanz der TLR4 Polymorphismen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind in mehreren Untersuchungen nachgewiesen worden. Bei Probanden, die Endotoxin inhalierten, zeigte sich eine verminderte Reagibilität der Atemwege bei Patienten mit Mutationen, was für eine verminderte Zytokinfreisetzung spricht²⁰. Weitere Studien zeigten negative Effekte des hier untersuchten SNPs auf den Verlauf der Gram-negativen Sepsis²¹. Die eigenen Ergebnisse können die Befunde der erwähnten Arbeiten allerdings nicht bestätigen. Ein Grund für den fehlenden Einfluss kann der Unterschied in der Art der Stimulation sein. Bei der Inflammationsreaktion durch Stimulation mit LPS sind möglicherweise andere Mechanismen involviert als im Vergleich zu mikrobieller Stimulation, obwohl dieselben Rezeptoren involviert sind. Dies zeigt sich auch in Mausmodellen, bei denen TLR4 knock-out Mäuse durch LPS praktisch kaum Zytokinfreisetzung zeigen, aber bakteriellen Infektionen schutzlos ausgeliefert sind²². Zudem ist der beschriebene Polymorphismus Asp299/Thr399 beim Vorliegen beider Allele im Vergleich zum Vorliegen nur des Asp299 Allels in seiner Reaktion weniger stark ausgeprägt²³. Da beide Allele in der untersuchten Gruppe von 62 postoperativen Patienten kosegregierend vorlagen, kann dies den fehlenden Unterschied zumindest mit erklären. Auch in der Gruppe der kardiochirurgischen

Patienten waren beide Allele kosegregierend und die Zytokinverläufe waren gleich. Über beide Gruppen zeigten sich ansteigende Zytokinpiegel im Vergleich zwischen prä- und postoperativ. Hierbei waren bei den kardiochirurgischen Patienten die Spiegel insgesamt höher als bei den infizierten Patienten, was sehr wahrscheinlich mit der ausgeprägteren Inflammation nach Ischämie/Reperfusion im Rahmen der Operation mit der Herz-Lungen-Maschine zusammenhängt ²⁴.

Die Ergebnisse dieser "natürlichen" Stimulation im Rahmen des operativen Eingriffs konnten in ex-vivo Stimulationsexperimenten bei Patienten mit TLR4 SNP und anderen Polymorphismen nachvollzogen werden ²⁵. Diese Befunde decken sich auch mit nicht veröffentlichten Daten aus dieser Kohorte.

Der Zusammenhang zwischen der hierin beschriebenen Variante des "myeloid differentiation factor 2" (MD-2) im Hinblick auf die unterschiedliche Zytokinantwort aus isolierten Zellen nach LPS-Stimulation ist aus den vorliegenden Befunden schwieriger herzuleiten. Zunächst existieren in-vitro Daten die belegen, dass Mutationen im MD-2 zu einer deutlich verminderten Reaktion auf Stimulation des TLR4 führen ²⁶. Die hier gefundene Mutation liegt in einem am ehesten für die Proteinstabilisierung zuständigen Bereich in dem die Bildung von Disulfidbrücken postuliert wird ²⁷. Da in den Experimenten die Mutation zu einer verminderten Zytokinantwort führte, liegt es nahe, eine "loss-of function"-Mutation anzunehmen.

In den Transfektionsexperimenten war eine geringer ausgeprägte Bildung von NF- κ B auffällig. Zudem war dieser Befund durch die geringere TNF-Induktion in der Vollblutstimulation unterstützt. Allerdings wäre eine abschließende Beurteilung aufgrund des einzelnen untersuchten Patienten wohl nicht angemessen. Falls man eine "loss-of function"-Mutation annimmt, ist mit den durchgeführten Experimenten eine funktionelle Analyse nicht ganz schlüssig. Zumindest scheint keine Störung der Sekretion von MD-2 oder der Bindung an TLR4 vorzuliegen, wie die Ko-Immunopräzipitationsversuche zeigen. Ob eine Konformationsänderung eventuell die Bindung von LPS an MD-2 verändert oder diese Änderung andere Funktionen von MD-2 beeinflusst, bleibt spekulativ. Andere Arbeitsgruppen konnten andere genetische Variationen zeigen, die zunächst keinen Einfluss auf Infektionskrankheiten wie z.B. Tuberkulose haben ²⁸. Allerdings sind die Liganden für die TLR4/MD-2 Aktivierung in diesem Falle unterschiedlich.

Die dritte untersuchte Variation in dem intrazellulären Adapterprotein TIRAP/Mal ist ihrer Relevanz auf zwei Arten auffällig. Zunächst ist wie bei den zuvor beschriebenen Polymorphismen eine erhöhte Empfänglichkeit für Infektionen nicht nachweisbar. Vielmehr

ist der Verlauf der Erkrankung schwerer bei Patienten, die homozygot für das Ser180Leu Allel sind. Gleichzeitig sind Patienten, bei denen der heterozygote Genotyp vorliegt, eher geschützt. Dies bestätigt Daten, die an Patienten mit unterschiedlichen Infektionen (u.a. Pneumokokkenpneumonien) gewonnen wurden ²⁹. Zum zweiten war ein funktioneller Erklärungsansatz aus den ex-vivo Stimulationsversuchen mit diesem Genotyp nicht herzuleiten. Weder in der Kohorte griechischer Pneumoniepatienten waren signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Patienten und den homozygoten Trägern festzustellen, noch in den deutschen Patienten nach herzchirurgischen Operationen. Dies galt gleichermaßen für heterozygote Träger. Allerdings waren in der Pneumoniegruppe aufgrund der niedrigen Patientenzahl (lediglich ein homozygoter Patient) keine aussagekräftigen Vergleiche möglich. In der herzchirurgischen Kohorte zeigte der Vergleich von homozygoten Patienten mit allen anderen Genotypen gleiche Werte bei den Zeitverläufen. Insgesamt war der TIRAP/Mal SNP in der griechischen Kohorte eher mit erhöhten Zytokinkonzentrationen im Vergleich zu den anderen Genotypen vergesellschaftet. Da die Zytokinkonzentrationen der herzchirurgischen Patienten insgesamt mehrfach höher waren, mögen andere Faktoren bei der Zytokinfreisetzung eine Rolle gespielt haben, wie z.B. der Reperfusionsschaden, der im Rahmen der Herzoperation an der Herz-Lungen-Maschine auftritt. Auch ein Anstieg der Endotoxinkonzentration nach dem Eingriff kann eine Rolle spielen, allerdings ist das nicht sicher belegt ³⁰. Inwieweit der zeitliche Verlauf der Zytokinantwort für den Vergleich von Infektion und steriler/postischämischer Inflammation bei den gesehenen Unterschieden eine Rolle spielt, bleibt spekulativ. Zumal bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen die Messung der Zytokinantwort aufgrund des unbekanntes Beginns der Inflammationsreaktion ungenau ist ³¹.

Bei den Patienten mit einer kombinierten Variation von TLR4 und TIRAP/Mal zeigte sich analog zu den TIRAP/Mal homozygoten Patienten ein schwererer Verlauf der Sepsis. Im Gegensatz zu den TIRAP/Mal homozygoten Patienten konnte in dieser Gruppe auch ein Einfluss auf die Freisetzung der Zytokine in Patienten mit einer Gram-negativen Pneumonie gesehen werden. Deutlich niedrigere Zytokinspiegel und eine fast aufgehobene Stimulierbarkeit der Monozyten durch LPS sprechen hier für einen möglichen funktionellen Zusammenhang. Warum die homozygoten Patienten keine verminderten Zytokinwerte und keine verminderte Stimulierbarkeit der Monozyten zeigten ist möglicherweise mit der differenzierten Struktur der intrazellulären Signalkaskade von TLR4 zu erklären. Bei TIRAP/Mal homozygoten Patienten könnte lediglich die intrazelluläre Signaltransduktion gestört sein. Da über den MyD88/Mal unabhängigen Weg eine zweite Signalkaskade, die über

TRIF und TRAM führt und in IRF3 mündet, besteht, könnte dies normale Zytokinwerte erklären. Dies auch, da in Experimenten mit IRF3 knock-out Mäusen die TNF Produktion nicht reduziert war, was bedeutet, dass auch dieser zweite Signalweg an dessen Freisetzung beteiligt ist ³². Einschränkend hierzu sind jedoch in der Gruppe nach Herzoperationen die Zytokinwerte nicht unterschiedlich ^{15, 33}. Da nur ein Patient der griechischen Gruppe homozygot für TIRAP/Mal war, lässt sich der Befund nicht überprüfen, zumal keine TRIF-abhängigen Effektoren wie Interferon in den Stimulationsversuchen gemessen wurden. Eigene in-vitro Stimulationsversuche an Probanden, die homozygot für den TIRAP/Mal SNP waren, haben hierzu keine schlüssigen Ergebnisse erbracht.

Bei dem simultanen Vorliegen beider Mutationen könnten sowohl Pathogenerkennung als auch Signaltransduktion verändert sein, womit eine mögliche Kumulation der Effekte eine verminderte Zytokinkonzentration bedingt. Mehrere Erklärungsansätze wären für eine veränderte Pathogenerkennung denkbar. Durch eine Veränderung der Rezeptorstruktur könnte die Dimerformation ebenso verändert sein, wie auch die Anlagerung der notwendigen Ko-Moleküle LBP, MD-2 und CD-14. Allerdings sind hierzu keine wegweisenden experimentellen Daten vorhanden. Als anderer Erklärungsansatz könnte die Regulation der Rezeptordichte beeinflusst sein. Darüber hinaus existieren ebenfalls Belege, dass die Art der Signaltransduktion intrazellulär von der Art des Erregers abhängig ist ³⁴.

Zusammenfassend kann man als Ergebnis dieser Arbeit postulieren, dass Genpolymorphismen in Komponenten der angeborenen Immunabwehr an der Ausprägung der Schwere einer Infektion beteiligt sind. Insbesondere für Patienten mit Sepsis und septischem Schock gibt es mittlerweile eine Vielzahl von Untersuchungen für andere Genpolymorphismen, die einen Einfluss auf die Sepsis haben bzw. mit ihr assoziiert worden sind ³⁵. Es sind ebenso schädigende wie auch schützende genetische Varianten beschrieben, analog zu den eingangs erwähnten Mutationen, die vor der Sichelzellanämie schützen.

Dennoch ist es sicher eine grobe Vereinfachung, aus den hier gesehenen Assoziationen eine kausale Beeinflussung herzuleiten. Es bleibt teilweise spekulativ, die Veränderungen in den Zytokinspiegeln als funktionelle Effekte der Mutationen oder als Ursache für die beeinflussten Verläufe zu betrachten. Dennoch können die Befunde durchaus Hinweise geben, welche Anteile des angeborenen Immunsystems möglicherweise besonders anfällig bei genetischer Variation sind.

Bezüglich genetischer Einflüsse auf das angeborene Immunsystem kann nicht außer Acht gelassen werden, dass die Komplexität des Systems eine große Herausforderung für die Analyse genetischer Einflussfaktoren ist ³⁶. Ob der in dieser Arbeit gewählte Ansatz der

Assoziation mit Kandidatengeneten zielführend ist wird inzwischen sehr kritisch gesehen. Ob genomweite Analysen bei komplexen Erkrankungen letztlich klarere Ergebnisse zeigen ist unbestimmt ¹⁰.

Große Kohortenstudien zu diesem Themengebiet stehen zurzeit aus bzw. sind deren Ergebnisse erst ansatzweise veröffentlicht (Genosept-Studie ³⁷). Als Ergebnis dieser Untersuchungen könnte dann auch geklärt werden, ob der systemweite Ansatz, der die Gesamtheit oder Anteile der Immunabwehr untersucht, sinnvoll ist, Einflüsse genetischer Variationen auf die Ausprägung generalisierter Infektionsreaktionen zu erklären. Ob ein komplexes und inhomogenes Krankheitsbild wie die Sepsis mit einzelnen SNPs überhaupt sinnvoll assoziiert werden kann, ist somit momentan noch nicht abschließend geklärt ³⁸. Für die Frage nach Risikoeinschätzung oder für die Fragen der Stratifizierung von Patienten im Rahmen von Therapieentscheidungen oder Studieneinschluss etc. ist es dennoch sinnvoll, zumal die entsprechende Technologie mittlerweile fast flächendeckend zu sich verringernden Preisen verfügbar ist. Einer der genannten Ansätze vermag möglicherweise Antworten auf die Frage geben, wie Erbfaktoren den Verlauf von Infektionskrankheiten beeinflussen und ob dieses Wissen - im Sinne von „maßgeschneiderten“ personalisierten Therapien - in Zukunft die Behandlung von Patienten konkret verbessern kann.

2.7 Literaturverzeichnis:

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-10.
2. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007;33:606-18.
3. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 1995;274:639-44.
4. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 2004;40:845-59.
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
6. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819-26.
7. Rotimi CN, Jorde LB. Ancestry and disease in the age of genomic medicine. *N Engl J Med* 2010;363:1551-8.
8. Ku CL, von Bernuth H, Picard C, et al. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 2007;204:2407-22.
9. Stüber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996;24:381-4.
10. Nebert DW, Zhang G, Vesell ES. From human genetics and genomics to pharmacogenetics and pharmacogenomics: past lessons, future directions. *Drug Metab Rev* 2008;40:187-224.
11. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999;234:177-86.
12. Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand J Immunol* 2009;69:479-91.
13. Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 2000;12:20-6.
14. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999;162:3749-52.

15. Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv* 2003;3:466-77.
16. Schröder NWJ, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005;5:156-64.
17. Kwiatkowski DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet* 2005;77:171-92.
18. Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988;318:727-32.
19. Picard C, Puel A, Bonnet M, et al. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 2003;299:2076-9.
20. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-91.
21. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002;162:1028-32.
22. Mahieu T, Park JM, Revets H, et al. The wild-derived inbred mouse strain SPRET/Ei is resistant to LPS and defective in IFN-beta production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2292-7.
23. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, et al. Functional consequences of Toll-like receptor 4 polymorphisms. *Mol Med* 2008.
24. Suleiman MS, Zacharowski K, Angelini GD. Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery: the importance of anaesthetics. *Br J Pharmacol* 2008;153:21-33.
25. Schippers EF, van 't Veer C, van Voorden S, Martina CA, le Cessie S, van Dissel JT. TNF-alpha promoter, Nod2 and toll-like receptor-4 polymorphisms and the in vivo and ex vivo response to endotoxin. *Cytokine* 2004;26:16-24.
26. Schromm AB, Lien E, Henneke P, et al. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med* 2001;194:79-88.
27. Mullen GE, Kennedy MN, Visintin A, et al. The role of disulfide bonds in the assembly and function of MD-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3919-24.

28. Xue Y, Zhao ZQ, Hong D, et al. Lack of association between MD-2 promoter gene variants and tuberculosis. *Genet Mol Res* 2010;9:1584-90.
29. Khor CC, Chapman SJ, Vannberg FO, et al. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet* 2007;39:523-8.
30. Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest* 1997;112:676-92.
31. Netea MG, van der Meer JW, van Deuren M, Kullberg BJ. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends Immunol* 2003;24:254-8.
32. Sakaguchi S, Negishi H, Asagiri M, et al. Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:860-6.
33. Dang O, Navarro L, David M. Inhibition of lipopolysaccharide-induced interferon regulatory factor 3 activation and protection from septic shock by hydroxystilbenes. *Shock* 2004;21:470-5.
34. Netea MG, Kullberg BJ, Joosten LA, et al. Lethal *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* endotoxemia is mediated through different pathways. *Eur J Immunol* 2001;31:2529-38.
35. Kumpf O, Schumann RR. Genetic influence on bloodstream infections and sepsis. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32 Suppl 1:S44-50.
36. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 2005;437:1032-7.
37. Genosept - study protocol. Accessed May 15, 2011, at <https://www.genosept.eu/doc/GenOSept%20Research%20protocol%202007.pdf>.
38. Sutherland AM, Walley KR. Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis. *Crit Care* 2009;13:210.
39. Govindaraj RG, Manavalan B, Lee G, Choi S. Molecular modeling-based evaluation of hTLR10 and identification of potential ligands in Toll-like receptor signaling. *PLoS One* 2010;5:e12713.

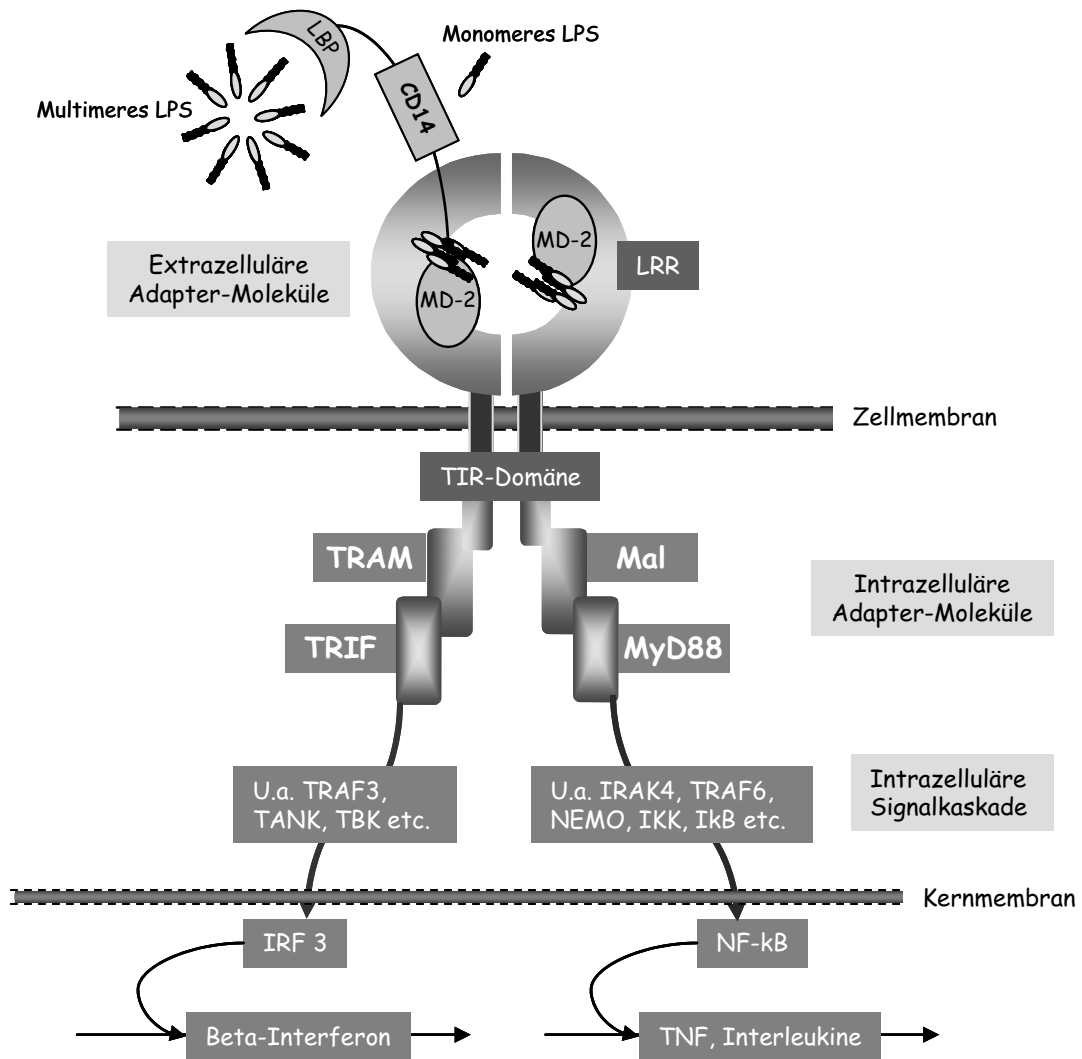
2.8 Tabelle 1: Liste der derzeit bekannten humanen Toll-like Rezeptoren (TLR)

Rezeptor	Ligand	Spezies
TLR1/TLR2	Triacyl-Lipopeptid	Bakterien und Mycobakterien
TLR2	Peptidoglycan	Gram-positive Bakterien
	Porine	Neisserien
	Lipoarabinomannan	Mycobakterien
	tGPI-mutin	Trypanosomen
	Phospholipomannan	Candida albicans
	Hämagglutinin Protein	Masern Virus
	nicht bekannt	HCMV, HSV1
TLR2 und TLR4	Glucuronoxylmannan	Cryptococcus neoformans
TLR3	dsRNA	Viren
TLR4	Lipopolysaccharid	Gram-negative Bakterien
	Mannan	Candida albicans
	Hüllproteine	RSV, MMTV
	Glycoinositolphospholipid	Trypanosomen
	Heat-shock protein 60, 70	Wirtseigen
	Fibrinogen	Wirtseigen
TLR5	Flagellin	Flagellierte Bakterien
TLR6/TLR2	Zymosan	Saccharomyces cerevisiae
	Diacyl-Lipopeptid	Mycoplasmen
	Lipoteichonsäure Gruppe B	Streptokokken
TLR7 and TLR8	ssRNA	RNA Viren
TLR9	Hämozoin	Plasmodien
	CpG-DNA	Bakterien und Mykobakterien
	DNA	Viren
^a TLR10	Lipopeptid (?)	

^aTLR10 bildet Heterodimere mit TLR1 und TLR2 und Homodimere (Diese Daten basieren auf Computermodellen ³⁹)

Abkürzungen siehe Verzeichnis

2.9 Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des TLR4 mit seinen extra- und intrazellulären Komplexen.



Die hier dargestellte LPS-Erkennung beginnt mit der Prozessierung der LPS-Moleküle durch LBP und CD-14. Durch MD-2 wird das monomere LPS an die LRR des dimer vorliegenden TLR4 gebunden. Die Signaltransduktion beginnt mit der Bindung von Mal an die intrazelluläre TIR-Domäne des TLR4 (rechts dargestellter Signalweg). Über die Anlagerung von MyD88 beginnt die Signalkaskade mit der Aktivierung von IRAK-4. Weitere Phosphorylierungsschritte und die Aktivierung von Kinasen bedingen schließlich die Translokation des aktivierten NF-κB in den Kern. Hierdurch wird die Transkription unterschiedlicher proinflammatorischer Zytokine initiiert.

3 Anteilserklärung

Oliver Michael Kumpf hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1 (Anteil: 75 Prozent):

Kumpf, O., L. Hamann, P. M. Schlag, and R. R. Schumann. Pre- and postoperative cytokine release after in vitro whole blood lipopolysaccharide stimulation and frequent toll-like receptor 4 polymorphisms. *Shock* 25:123-128. **2006 (IF: 2.87)**

Beitrag im Einzelnen: Studienplanung, Patientenrekrutierung, Durchführung der ex-vivo-Stimulation, Datenauswertung, statistische Berechnung, Formulierung des Manuskripts, korrespondierender Autor.

Publikation 2 (Anteil: 40 Prozent):

Hamann, L., **O. Kumpf**, M. Muller, A. Visintin, J. Eckert, P. M. Schlag, and R. R. Schumann. A coding mutation within the first exon of the human MD-2 gene results in decreased lipopolysaccharide-induced signaling. *Genes Immun* 5:283-288. **2004 (IF: 4.22)**

Beitrag im Einzelnen: Patientenrekrutierung, Durchführung der ex-vivo Stimulation, Datenauswertung, Formulierung von Teilen des Manuskripts.

Publikation 3 (Anteil: 70 Prozent)

Kumpf, O., E. J. Giamarellos-Bourboulis, A. Koch, L. Hamann, M. Mouktaroudi, D. Y. Oh, E. Latz, E. Lorenz, D. A. Schwartz, B. Ferwerda, C. Routsis, C. Skalioti, B. J. Kullberg, J. W. van der Meer, P. M. Schlag, M. G. Netea, K. Zacharowski, and R. R. Schumann. Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts. *Crit Care* 14:R103. **2010 (IF: 4,93)**

Beitrag im Einzelnen: Studienplanung, Aktenrecherche, Datenauswertung und statistische Auswertung für die retrospektive Patientenstudie, Datenakquisition der externen Patienten aus Griechenland und Deutschland, Auswertung der klinischen und Labordaten der herzchirurgischen Patienten, Zusammenführung der einzelnen Datenkomplexe, Formulierung des Manuskripts, korrespondierender Autor

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Kumpf, O., L. Hamann, P. M. Schlag, and R. R. Schumann. Pre- and postoperative cytokine release after in vitro whole blood lipopolysaccharide stimulation and frequent toll-like receptor 4 polymorphisms. *Shock* 25:123-128.

Der Artikel ist unter folgender Adresse zu finden:

<http://journals.lww.com/shockjournal/pages/articleviewer.aspx?year=2006&issue=02000&article=00004&type=abstract>

Hamann, L., **O. Kumpf**, M. Muller, A. Visintin, J. Eckert, P. M. Schlag, and R. R. Schumann. A coding mutation within the first exon of the human MD-2 gene results in decreased lipopolysaccharide-induced signaling. *Genes Immun* 5:283-288.

Der Artikel ist unter folgender Adresse zu finden:

<http://www.nature.com/gene/journal/v5/n4/full/6364068a.html>

Influence of genetic variations in *TLR4* and *TIRAP/Mal* on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts

Oliver Kumpf^{f*†1}, Evangelos J Giamarellos-Bourboulis^{†2,3}, Alexander Koch^{†4}, Lutz Hamann⁵, Maria Mouktaroudi^{2,3}, Djin-Ye Oh^{5,6}, Eicke Latz^{7,8}, Eva Lorenz⁹, David A Schwartz¹⁰, Bart Ferwerda², Christina Routsis¹¹, Chryssanthi Skalioti³, Bart-Jan Kullberg², Jos WM van der Meer², Peter M Schlag¹², Mihai G Netea², Kai Zacharowski⁴ and Ralf R Schumann⁵

Abstract

Introduction: It has been proposed that individual genetic variation contributes to the course of severe infections and sepsis. Recent studies of single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the endotoxin receptor and its signaling system showed an association with the risk of disease development. This study aims to examine the response associated with genetic variations of *TLR4*, the receptor for bacterial LPS, and a central intracellular signal transducer (*TIRAP/Mal*) on cytokine release and for susceptibility and course of severe hospital acquired infections in distinct patient populations.

Methods: Three intensive care units in tertiary care university hospitals in Greece and Germany participated. 375 and 415 postoperative patients and 159 patients with ventilator associated pneumonia (VAP) were included. *TLR4* and *TIRAP/Mal* polymorphisms in 375 general surgical patients were associated with risk of infection, clinical course and outcome. In two prospective studies, 415 patients following cardiac surgery and 159 patients with newly diagnosed VAP predominantly caused by Gram-negative bacteria were studied for cytokine levels in-vivo and after ex-vivo monocyte stimulation and clinical course.

Results: Patients simultaneously carrying polymorphisms in *TIRAP/Mal* and *TLR4* and patients homozygous for the *TIRAP/Mal* SNP had a significantly higher risk of severe infections after surgery (odds ratio (OR) 5.5; confidence interval (CI): 1.34 - 22.64; $P = 0.02$ and OR: 7.3; CI: 1.89 - 28.50; $P < 0.01$ respectively). Additionally we found significantly lower circulating cytokine levels in double-mutant individuals with ventilator associated pneumonia and reduced cytokine production in an ex-vivo monocyte stimulation assay, but this difference was not apparent in *TIRAP/Mal*-homozygous patients. In cardiac surgery patients without infection, the cytokine release profiles were not changed when comparing different genotypes.

Conclusions: Carriers of mutations in sequential components of the *TLR* signaling system may have an increased risk for severe infections. Patients with this genotype showed a decrease in cytokine release when infected which was not apparent in patients with sterile inflammation following cardiac surgery.

Introduction

Patients treated in ICUs following surgery or who are on ventilation support are prone to nosocomial infections [1,2]. The sequence of events leading to septic shock has been connected to the presence of biochemical products such as bacterial endotoxin or cytokines [3,4]. The innate immune system recognizes conserved microbial struc-

* Correspondence: oliver.kumpf@klinikum-hst.de

¹ Department of Anesthesiology, Intensive Care Medicine and Pain Management, Hanse-Klinikum Stralsund, Große Parower Strasse 47-53, Stralsund 18435, Germany

[†] Contributed equally

Full list of author information is available at the end of the article

tures also termed pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs) [5]. Also, intrinsic mediators (danger/damage-associated molecular patterns (DAMPs)) can induce an inflammatory response involving similar host molecules [6]. Genetic variation of the pathogen recognition system is thought to explain, at least in part, individual differences in the reaction of patients to similar infectious stimuli. An influence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of pathogen recognition on susceptibility for infections and sepsis has therefore been suggested [7]. Toll-like receptors (TLRs) are one class of PRRs that sense bacterial, viral or fungal molecular structures or nucleic acids and induce systemic inflammation [8]. TLR4 recognizes lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria as well as intrinsic mediators such as high-mobility group box-1 (HMGB-1) or heat-shock proteins [9]. TLR-signaling involves at least four intracellular signaling adaptor molecules termed myeloid differentiation response factor 88 (MyD88), toll/interleukin-1 receptor (TIR)-associated protein (TIRAP), also known as MyD88-adaptor-like (Mal), toll-receptor-associated molecule (Tram) and toll-receptor-associated activator of interferon (Trif). TIRAP/Mal acts as a bridging adaptor recruiting MyD88 to TLR2 or TLR4 [10].

For *TLR4*, which is encoded on chromosome 9, several SNPs have been described, with the most frequent one being the Asp299Gly/Thr399Ile variation. There have been conflicting reports on the influence of this SNP on severity of infections or outcome in prospective trials [11].

Two SNPs within the gene coding for the intracellular signal transducer *TIRAP/Mal* (positioned on chromosome 11) have been recently described: one synonymous SNP (rs7932766) was shown to be associated with meningeal tuberculosis in Vietnamese patients [12]. Another *TIRAP/Mal* SNP (rs8177374) leading to an amino acid exchange (Ser180Leu) has been shown to protect from pneumococcal pneumonia when present in a heterozygous state [13]. The frequencies of both genetic variations in *TLR4* and *TIRAP/Mal* have been recently studied worldwide in a comparative fashion, and it has been proposed that differences between regional populations can be attributed to selective pressure due to differences in sepsis susceptibility [14,15].

A direct cause and effect relation between cytokine release and carriage of SNPs of molecules implicated in response to stimulation with LPS is not easy to discern as a variety of factors such as the time of blood sampling and the intensity of the infectious stimulus may strongly influence the results. However, we attempted to perform an association between mortality in patients with sequential polymorphisms of the LPS receptor complex (*TLR4*-SNPs Asp299Gly/Thr399Ile and the *TIRAP/Mal*-SNP

Ser180Leu) or patients homozygous for the *TIRAP/Mal* SNP in an observational retrospective cohort study of 375 patients. More precisely, we analyzed these genetic variations in different patient populations representing a large proportion of patients in ICUs for their ability to mount an adequate cytokine response, and furthermore investigated a potential influence for risk of and course of septic complications.

To further confirm our results in a group of 159 patients with ventilator associated pneumonia (VAP) we related clinical and cytokine data to the genotype. Additionally, in these patients monocytes were stimulated with LPS and cytokine release was correlated to the different genotypes. Finally, out of a third group of 415 patients following cardiac surgery matched pairs were used to determine whether non-infectious inflammatory signals would be influenced by the different genotypes.

Materials and methods

Patient inclusion and data collection

The studies were all approved by the local ethics committees of the respective institutions and DNA testing was permitted by either a signed broad written consent including DNA testing before surgery (Group I and Group III) or written informed consent provided by first-degree relatives in the case of patients with VAP (Group II). All steps were performed in accordance with the Helsinki declaration. Statistical analysis was carried out after anonymization of the patient's data. For all cohorts definition of sepsis (systemic inflammatory response syndrome (SIRS), sepsis, severe sepsis and septic shock) was based on published criteria [16]. In brief: sepsis was defined as the presence of criteria for SIRS in response to a documented or clinically suspected acute infection. Severe sepsis was defined as sepsis associated with either evidence of hypoperfusion with organ dysfunction or sepsis-induced hypotension. Septic shock was defined as sepsis with sepsis-induced hypotension requiring vasopressor therapy despite adequate fluid challenge along with the presence of hypoperfusion and organ dysfunction.

Patients in the first group (Group I) were all treated in the ICU of the Robert-Rössle-Klinik of the Charité-University Medical Center, Berlin, Germany between 1999 and 2004. Main inclusion criteria were a length of stay (LOS) of more than the mean LOS in the ICU (6.4 days) or death at any time following surgery. Both criteria were considered indicative of a complicated course. Medical records of these patients were examined for the development of infectious complications and accompanying medical conditions. Patients with end-stage tumor disease and chronic immunosuppression were excluded from the analysis. Out of 601 eligible patients, 375 fulfilled the inclusion criteria. Infections were defined as

described by the National Institutes of Health clinical classification for nosocomial infections. Patients were followed up until discharge from the hospital. Prior to surgery, sampled blood or tissue specimens were examined for common *TLR4* and *TIRAP/Mal* SNPs. The frequency of the *TIRAP/Mal* SNP in a subgroup of these patients has been reported recently [17].

Additionally two prospective studies including 159 patients with VAP (Group II) and 415 patients following cardiac surgery (Group III) were conducted. Patients in Group II were observed over the period of 2004 to 2006 in Athens, Greece. Clinical and serum cytokine data from a subgroup of 56 patients out of this cohort were included in previous studies and have been published elsewhere [18-20]. Patients were either hospitalized in the Department of Critical Care of the Evangelismos' General Hospital or in the second Department of Critical Care of the ATTIKON University Hospital of Athens, Greece. All patients were over 18 years of age and intubated for at least 48 hours before diagnosis of sepsis. Inclusion criteria were the concomitant presence of VAP, and sepsis, severe sepsis or septic shock. VAP was diagnosed if all of the following signs were present: a) core temperature above 38°C or below 36°C; b) new or persistent consolidation in lung X-ray; c) purulent trancheobronchial secretions; and clinical pulmonary infection score above six, as proposed elsewhere [1]. Exclusion criteria were the presence of a) neutropenia (< 500 neutrophils per mm³), b) HIV infection, and c) intake of corticoids (> 1 mg/kg of prednisone or equivalent for more than one month). Enrolled patients were followed-up for 28 days. For these patients the frequency of SNPs of *TLR4* and *TIRAP/Mal* have already been reported [15].

Patients in Group III were part of a prospective cohort study determining the effect of genetic variations in innate immunity receptors on the cortisol response post-operatively. They were observed following elective cardiac surgery over the period 2005 to 2006 in the University Medical Center, Düsseldorf, Germany. Following written informed consent patients underwent cardiac or major vascular surgery, that is coronary artery bypass surgery, valve surgery or combined procedures employing extracorporeal circulation. Exclusion criteria consisted of chronic corticosteroid medication and known disease in the hypothalamic-pituitary-adrenal-axis. Blood samples were obtained at five different time points: on the day of surgery between 07:00 and 09:00 am (0 hours) and on ICU admission (4 to 6 hours) and on the 1st to 3rd days following the procedure between 07:00 and 09:00 hours (24, 48 and 72 hours, respectively). We used a matched-control approach to reduce confounding factors of cytokine response. For each of the affected individuals, one patient from the wild type (*WT*)-group and the *TLR4* group was chosen as a control. Therefore post-surgical

cytokine levels were compared between patients with double mutations (n = 13) and patients with *Mal*-homozygous genotype (n = 5). A combination of 18 matched wild type patients and 18 *TLR4* patients were chosen as controls resulting in a subgroup of 54 analyzed individuals. An additional group of 176 healthy blood donors with known age and gender who consented to anonymous genotyping served as controls for genotype frequency.

DNA analysis

Tissue specimen and blood sampled earlier were examined with a previously described method [21]. *TLR4* genotyping (rs4986790 for Asp299Gly, rs4986791 for Thr399Ile) was performed by restriction fragment length polymorphism- or melting curve analysis as described elsewhere [21,22]. Genotyping for *TIRAP/Mal* (rs8177374 for Ser180Leu) was achieved by melting curve analyses employing the Lightcycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using the following primers and probes: sense primer: GCCAGGCACTGAGCAGTAGT, antisense primer: GTGGGTAGGCAGCTCTCTG, anchor probe; Red640-GATGGTGCAGCCC TCGGCCCC, sensor probe: AGGCCCAACAG CAGGG-FL. The melting peaks are at 53°C and 62°C for the wild type and mutated sequences, respectively. Due to secondary structures and allele biased amplification within the region of this SNP, analysis of heterozygous genotypes may sometimes result in false homozygous results. Therefore, all mutated samples were reanalysed by conventional restriction fragment length polymorphism as described in [13].

Monocyte isolation and ex-vivo stimulation

Peripheral blood mononuclear cells were isolated after gradient centrifugation of heparinized whole blood over Ficoll Hypaque (Biochrom, Berlin, Germany) and three consecutive washings with PBS (pH 7.2) (Merck, Darmstadt, Germany); after flask incubation purity of adherent CD14-positive cells was more than 95%. Cells were stimulated with 1 ng/ml of purified endotoxin (LPS) from *Escherichia coli* O155:B5 (Sigma Co, St. Louis, MO, USA). TNF- α , IL-6 and IL-10 were estimated in supernatants [18].

Measurement of cytokines

A 5 ml sample of blood was collected in a sterile and pyrogen-free tube. After centrifugation, serum was kept at -70°C until assayed. In Group II concentrations of TNF- α , IL-6 and IL-8 in serum, and of TNF- α , IL-6 and IL-10 in supernatants were estimated in duplicate by an ELISA (Diacclone, Paris, France). Lower detection limits were 3.12 pg/ml for TNF- α , 6.25 pg/ml for IL-6, 62.50 pg/ml for IL-8, and 12.50 pg/ml for IL-10. Concentrations of

cytokines in supernatants were expressed as pg/10⁴ cells. Cytokine analysis in patients of Group III was performed with the Cytokine Ten-Plex antibody bead kit (Biosource Europe, Nivelles, Belgium) on a Luminex xMAP system (Luminex, Austin, TX, USA) (Sensitivity for the assays: interferon (IFN)- γ : 5 pg/ml, IL-1b: 15 pg/ml, IL-2: 6 pg/ml, IL-4: 5 pg/ml, IL-5: 3 pg/ml, IL-6: 3 pg/ml, IL-8: 3 pg/ml, IL-10: 5 pg/ml, TNF- α : 10 pg/ml and granulocyte macrophage colony-stimulating factor: 15 pg/ml respectively). Data on cytokine values other than those presented in the current study are currently being analyzed for subsequent publication and are therefore not all included in this study.

Statistical analysis

Differences in categorical data between patient groups were analyzed with the chi-squared test and with Fisher's exact two-tailed test for expected frequencies of less than five. Numerical data were expressed as means \pm standard deviation (SD) if they followed a normal distribution or medians and interquartile range or median and 95% confidence intervals (CI) for non-normal distribution. For comparisons between groups the Kruskal-Wallis test, the Mann-Whitney U test or one-way analysis of variance with a Bonferroni correction and within a group the Wilcoxon's rank sum test were used, respectively. Odds ratios (OR) were determined by Mantel and Haenzel's statistics. For calculation, the SPSS for Windows software, release 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and the Prism 5.01 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) software were used. A two-tailed $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Frequency of TIRAP/Mal and TLR4 polymorphisms

In all patients examined ($n = 949$), 252 carried the *TIRAP/Mal* SNP with 229 being heterozygous and 23 homozygous for this allele. The resulting allele frequency was 0.145, which is consistent with other reports and our own control group consisting of 176 healthy individuals from Germany (Table 1). In all patient cohorts, this SNP was in Hardy-Weinberg Equilibrium. Of 127 individuals with *TLR4* variants two patients displayed the Thr399Ile allele only, and three displayed only the Asp299Gly allele. As recently described for European populations in all other patients, the Asp299Gly and Thr399Ile SNPs were cosegregating [15]. Three patients were homozygous for both alleles. The allele frequency for any *TLR4* SNP was 0.069, which is in line with previous studies [11].

Overall, 30 individuals had a combination of *TIRAP/Mal* and *TLR4* SNPs. One patient was *TLR4* homozygous and *TIRAP/Mal* heterozygous. Of 29 *TLR4* heterozygous mutation carriers, 24 were *TIRAP/Mal* heterozygous and 5 homozygous. The distribution of SNPs in the studied

patients and the cohort of healthy controls is shown in detail in Table 1.

Clinical influence of genotypes on postoperative infection severity in surgical patients

The 375 patients enrolled in the first cohort of patients (Group I) were unrelated European Caucasians. The mean age of patients was 61.8 years (SD: \pm 12.6) and 137 (36.5%) patients were female. Overall, 203 patients in Group I developed infections. No association with single genotypes and susceptibility for infection or specific microorganisms was found. For risk associations with severe sepsis we compared the SNP carriers (41 heterozygous *TLR4*, and 10 homozygous and 75 heterozygous carriers of the *TIRAP/Mal*-SNP) with *WT*-patients ($n = 240$). In our analysis, the *TIRAP/Mal* homozygous genotype influenced patient morbidity resulting in higher risk of severe infections (OR: 7.3; 95% CI: 1.89 to 28.50; $P < 0.01$). Furthermore, in nine patients the combination of *TLR4* and *TIRAP/Mal* SNPs significantly contributed to the risk of severe infections as shown in Table 2 (OR 5.5; 95% CI: 1.34 to 22.64; $P = 0.02$). This effect was not influenced by the type of infection in these two genotype groups. However, an influence of infection type was observed in the remaining subgroups (*TLR4*, *TIRAP/Mal* heterozygous and wild type-patients). In these patients presence of pneumonia and peritonitis contributed to the risk of severe infections. A detailed summary of this patient cohort is presented in the supplementary material in Tables S1, S2 and S3 in Additional file 1.

Cytokine release and monocyte stimulation in patients with ventilator-associated pneumonia

To further study the apparent impact of these double mutations on patients in ICUs we examined 159 Caucasian patients of Greek ethnicity (Group II) as part of a prospective cohort study. All these patients were on ventilator support as part of the treatment for brain hemorrhage, multiple injuries, primary respiratory failure or postoperative support, and developed VAP predominantly caused by Gram-negative bacteria during their treatment. Mean age of patients was 59.6 years (SD: \pm 18.6). Forty (25%) patients were female. Patient characteristics were similarly distributed over the genotype groups as shown in Tables S1, S2 and S4 in Additional file 1. Of the patients, 106 were carriers of only *WT* alleles; 9 were carriers of only *TLR4* SNP alleles; 41 were carriers of at least one *TIRAP/Mal* SNP allele; and 3 were carriers of both *TLR4* and *TIRAP/Mal* SNP alleles. Septic shock occurred among 47 (44.3%), 6 (66.7%), 19 (46.3%), and none of them, respectively.

When comparing circulating cytokine levels and their correlation to the *TLR4* and *TIRAP/Mal* genotype, individuals with combined mutations in *TLR4* and *TIRAP/*

Table 1: Distribution of genotypes in the patients and healthy controls

Genotype		TIRAP/Mal				
		Wild type	heterozygous	Homozygous		
Group I (n = 375)	Wild type	240 (64.0%)	75 (20.0%)	10 (2.7%)	AF TIRAP/Mal: 0.140	
	TLR4	heterozygous	41 (10.9%)	7 (1.9%)		1 (0.3%)
		homozygous	--	1 (0.3%)		--
	AF TLR4:					0.068
		Wild type	heterozygous	Homozygous		
Group II (n = 159)	Wild type	106 (66.7%)	40 (25.2)	1 (0.6 %)	AF TIRAP/Mal: 0.142	
	TLR4	heterozygous	9 (5.7%)	3 (1.9%)		--
		homozygous	--	--		--
	AF TLR4:					0.038
		Wild type	heterozygous	Homozygous		
Group III (n = 415)	Wild type	254 (61.2%)	89 (21.4%)	7 (1.7%)	AF TIRAP/Mal: 0.151	
	TLR4	heterozygous	45 (10.8%)	14 (3.4%)		4 (1.0%)
		homozygous	2 (0.5%)	--		--
	AF TLR4:					0.080
		Wild type	heterozygous	Homozygous		
Controls (n = 176)	Wild type	122 (69.3%)	26 (14.8%)	2 (1.1%)	AF TIRAP/Mal: 0.102	
	TLR4	heterozygous	20 (11.4%)	3 (1.7%)		1 (0.6%)
		homozygous	1 (0.6%)	1 (0.6%)		--
	AF TLR4:					0.080

Allele frequencies equal between the groups. All groups in Hardy-Weinberg-Equilibrium: For TLR4: Group 1: $P = 0.55$; Group II: $P = 0.62$; Group III: $P = 0.64$; Controls: $P = 0.36$. For TIRAP/Mal: Group 1: $P = 0.12$; Group II: $P = 0.40$; Group III: $P = 0.54$; Controls: $P = 0.34$.

AF, allelic frequency, Mal, MyD88-adaptor-like, MyD88, myeloid differentiation response factor 88, TIR, toll/interleukin-1 receptor, TIRAP, TIR-associated protein, TLR, toll-like receptor.

Mal had very low circulating cytokine levels of IL-6 (*WT*-patients vs. *TIRAP/Mal* + *TLR4*, $P = 0.01$ for IL-6) and IL-8, while all other individuals, including those with single mutations in either *TLR4* or *TIRAP/Mal* had elevated cytokine levels at day 1 after diagnosis of pneumonia. Figure 1 shows cytokine values in patients of Group II on day 1 after diagnosis of VAP.

To investigate the influence of different genotypes on the cytokine induction pattern, monocytes from these patients were isolated and stimulated *ex-vivo* with LPS. Concentrations of TNF- α and IL-6 in cell supernatants of patients bearing the wild-type phenotype and of carriers of *TIRAP/Mal* or *TLR4* polymorphisms showed an increase of cytokine levels. Individuals with a double

Table 2: Association between septic complications and genotype in 375 patients of Group I

Genotype	Severe Infections (n = 102)	^a OR	95% CI	P value
Wild-type (n = 240) Mutant alleles	64 (26.7%)	0.87	0.51 - 1.48	0.69
TLR4 (n = 41)	10 (24.4%)	1.57	0.73 to 3.37	0.33
TIRAP (het) (n = 75)	15 (20.0%)	0.87	0.49 to 1.56	0.65
TIRAP (hom) (n = 10)	7 (70.0%)	7.33	1.89 to 28.50	< 0.01
TIRAP/TLR4 genotype (n = 9)	6 (66.7%)	5.50	1.34 to 22.64	0.02

^aOR (odds ratio) when comparing severe infections (severe sepsis and septic shock) to patients with no infection. Calculated by comparison of wild type-patients with patients bearing other variants through Mantel-Haenzel's statistic and Fisher's exact test. CI, confidence interval, het, heterozygous, hom, homozygous, Mal, MyD88-adaptor-like, MyD88, myeloid differentiation response factor 88, OR, odds ratio, TIR, toll/interleukin-1 receptor, TIRAP, TIR-associated protein, TLR, toll-like receptor.

mutation in *TLR4* and *TIRAP/Mal*, however, exhibited a lack of inducibility for TNF- α and IL-6 on day 1 after diagnosis (Figure 2). Patients carrying no mutations or either *TLR4* or *TIRAP/Mal* mutations showed a stronger induction of IL-6 following LPS-stimulation compared with patients with double mutations, although the difference did not reach statistical significance. Similar results were seen for TNF- α although less pronounced. No differences in cytokine concentrations of monocyte supernatants between patients bearing the wild-type and carriers of polymorphisms were found on day 7 (data not shown).

Influence of genotypes on cytokine release following cardiac surgery

A third group of patients was then examined to distinguish between a predominately sterile inflammatory stimulation as compared with the stimulus towards immune cells by bacterial ligands. The patients studied following cardiac surgery were all of Caucasian descent. Patient characteristics of this cohort and the matched patients are shown in Tables S1, S2 and S5 in Additional file 1. There were no statistically significant differences in the cytokine levels following surgery over the study period between the subgroups (Figure 3). The postoperative course was not related to cytokine levels in these patients (data not shown). Interestingly, patients receiving cardiac surgery exhibited markedly higher levels of IL-6 following the procedure in all studied genotypes as compared with patients suffering from infection approximately 24 hours following the insult. Although the results were obtained by different cytokine-detection assays there seem to be different mechanisms responsible for the release of cytokines in operated patients.

Discussion

Patients suffering from infections seem to react individually to a similar insult. This capability to combat an infection is thought to be at least in part influenced by genetic factors [23]. Despite important advances in the understanding of the pathophysiological processes leading to sepsis and septic shock [4,24,25], knowledge on the role of genetic factors contributing to sepsis susceptibility has not yet translated into improved outcome [26,27].

In the first part of this study we were able to show an association between the risk of severe infections and a combination of genetic variants in sequential molecules of the LPS-sensor consisting of *TLR4* and its adaptor *TIRAP/Mal*. The presence of *TLR4* mutations in combination with *TIRAP/Mal* variants - either homozygous or heterozygous - resulted in a statistically significant increase in the risk of severe infections. Despite the fact that the number of patients carrying these mutations is low, we found intriguingly low serum levels of pro-inflammatory cytokines in double-mutant individuals in a second cohort (Group II). Additionally we found that monocytes of these patients show decreased cytokine production upon stimulation with LPS. One might speculate that moderate defects in *TLR4* and *TIRAP/Mal* function may accumulate to induce significant alterations of *TLR4* dependent signals. However, clinical outcome data in this cohort could not support the findings with regard to sepsis severity. One reason for this discrepancy could be that the second cohort consisted of more severely ill patients already suffering from infections caused by highly resistant Gram-negative pathogens. Moreover, other confounding factors may influence those effects such as preexisting conditions, type of infection in surgical patients or causing microorganisms. As the innate

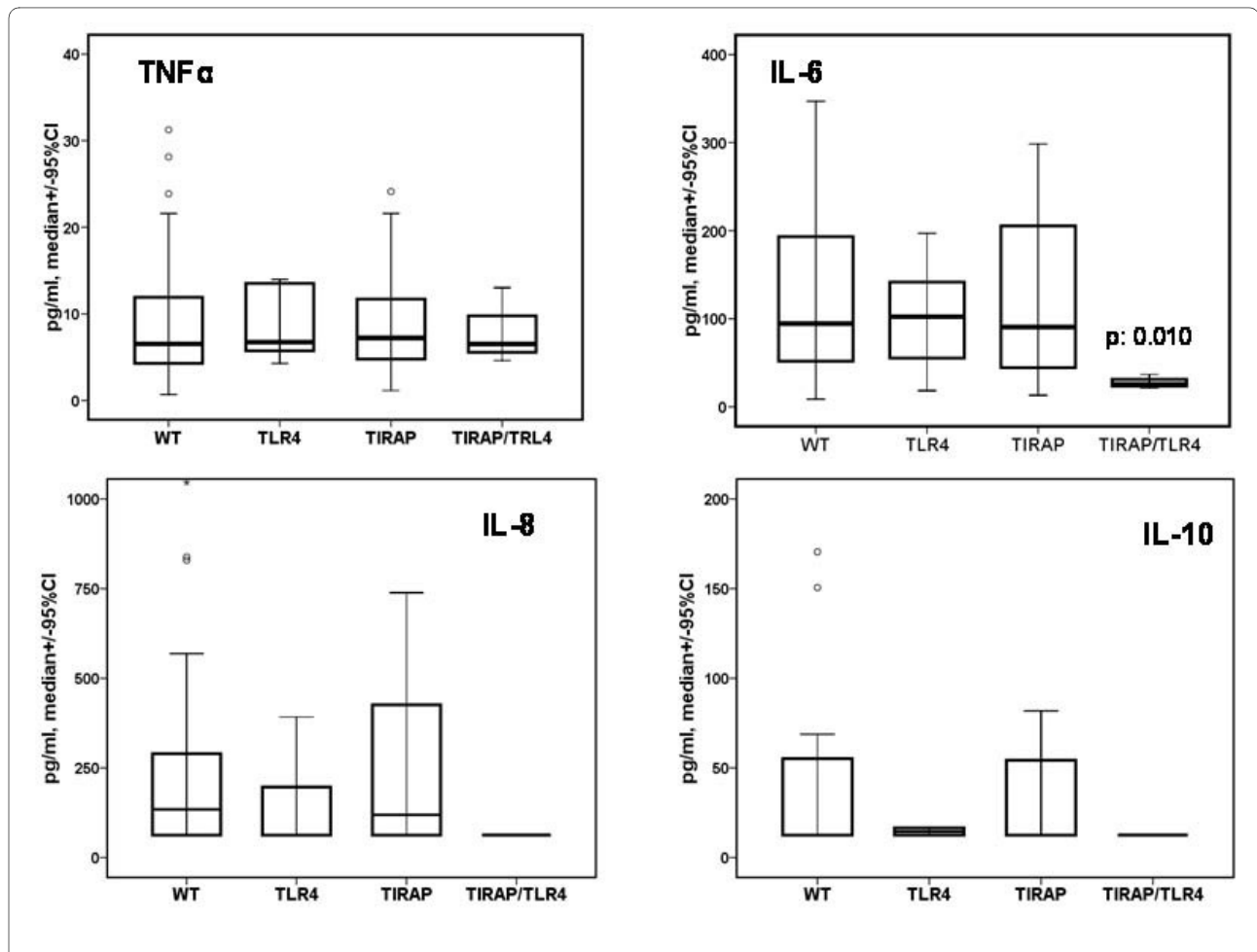


Figure 1 Impact of *TIRAP/Mal* or *TLR4* polymorphisms or their combinations on circulating cytokine levels. Cytokine serum levels (pg/ml) were measured on day 1 after diagnosis of ventilator-associated pneumonia in Group II. Values are shown as median +/- 95% confidence interval (CI) and as mean +/- standard error. Number of patients in each group: Controls = 106, *TIRAP/Mal* (heterozygotes and homozygotes reported together) = 41, *TIRAP/Mal-TLR4* = 3, *TLR4* = 9. *P* values refer to significant differences compared with patients bearing the wild-type for all tested polymorphisms. Comparison calculated with Mann-U Whitney test. In this figure *TIRAP/Mal* is named *TIRAP* for readability.

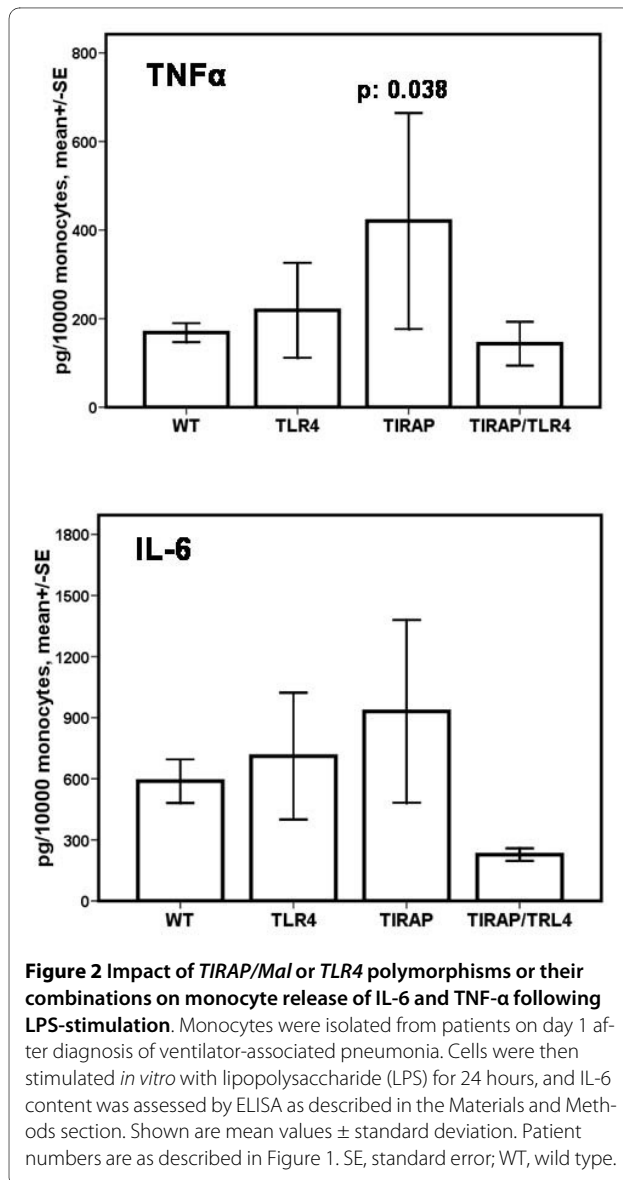
immune response to bacterial infection has to be mounted early and effectively, genetic influence on cytokine response in infection may determine effectiveness of bacterial killing [28].

Supporting our results, it has been recently found that severe sepsis and septic shock is associated with decreased expression of TLR4 on host immune cells [29]. Thus, a lack in TLR4 signaling may be associated with a worse outcome of disease, which also correlates with the recent findings suggesting that immunosuppression caused by negative regulators of TLR signaling are associated with sepsis mortality [30].

To further differentiate whether the observed lack in inducibility of cytokines depended on the type of inflammation, either *bacterial* infection or *sterile* inflammatory stimulus, we also assessed postoperative cytokine response following cardiac surgery (Group III). This strong inflammatory reaction is a consequence of isch-

emia-reperfusion injury and is observed frequently following procedures involving cardiopulmonary bypass [31]. DAMPs are thought to be involved in this process and previous studies have associated this phenomenon to the innate immune system [32]. In this non-infectious group, we were not able to show a difference in the cytokine response between the genotype groups. This could be in part explained by the hypothesis that the involvement of endogenous danger signals compared with bacterial ligands involves further elements of the innate immune system, or that TLR4 is not a main receptor of DAMPs in this group of patients. This could potentially explain the difference observed in cytokine concentrations between patients following cardiac procedures as compared with the patient group with pneumonia.

TIRAP/Mal is an important adaptor molecule for intracellular signaling of both TLR4 and TLR2 [10]. As one of



four adaptors for TLR4 signaling [33], TIRAP/Mal functions as a 'bridging molecule' for MyD88 [34]. A recently published study postulated a protective effect of the heterozygous *TIRAP/Mal* variant (Ser180Leu) for pneumococcal disease [13]. A study on patients with severe forms of tuberculosis, the rate of meningeal manifestations was associated with a synonymous *TIRAP/Mal* SNP, but not with the above mentioned variant [12]. Both investigations found an altered cytokine release in cell-stimulation assays, supporting the view that these SNPs are functionally relevant. Therefore, a second important finding of our study was the significantly increased risk for severe infections in *TIRAP/Mal*-homozygous patients. This supports previous findings of Khor and colleagues [13]. Although we could not observe a significant reduction in risk for *TIRAP/Mal*-heterozygous

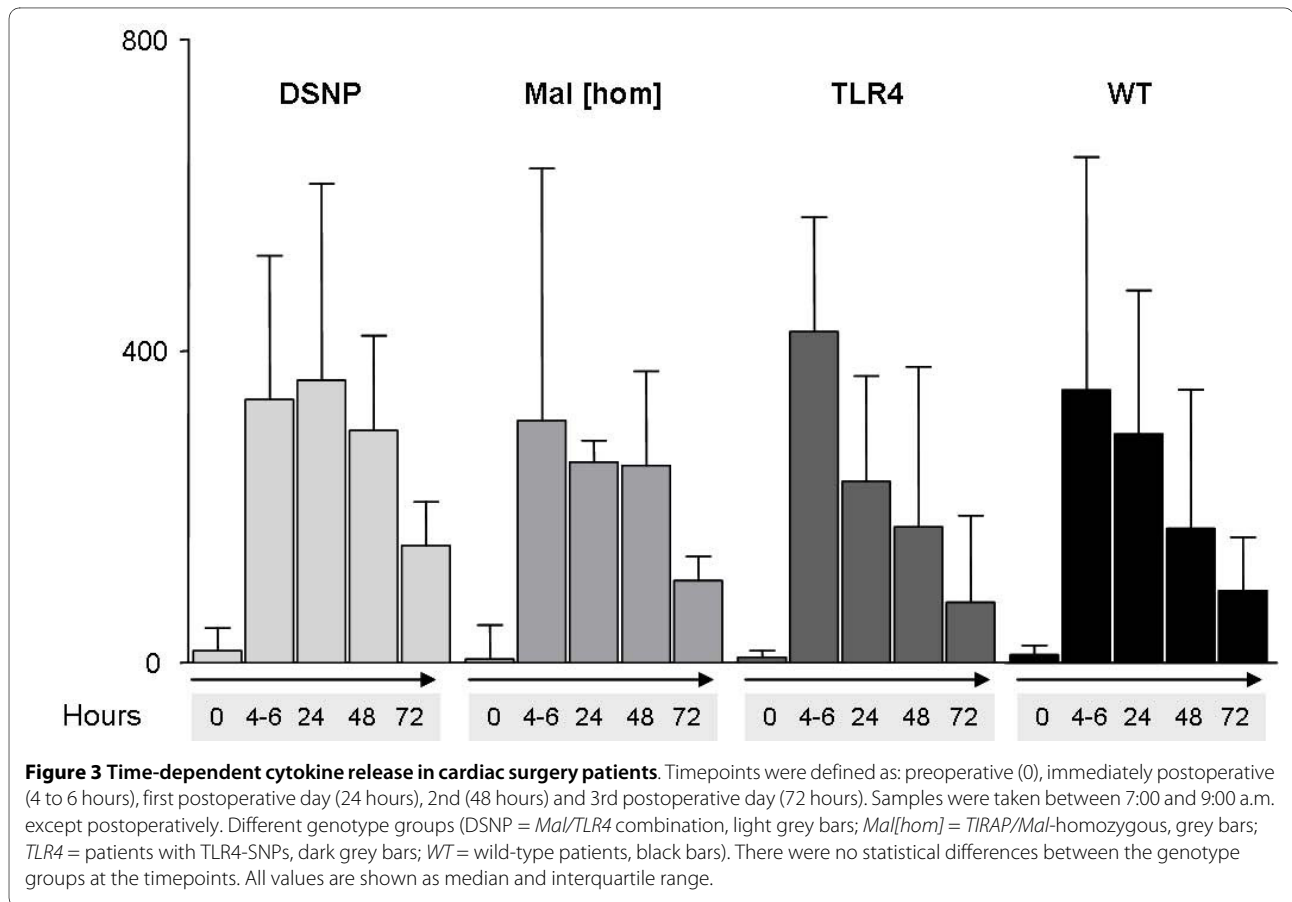
patients compared with *WT*-patients as seen in the Khor and colleagues study, comparison of homozygous and heterozygous patients was statistically different. As only one patient in Group II was *TIRAP/Mal*-homozygous, no comparison of patients was possible here.

Activation of TLR4 may lead to a differential use of intracellular adaptors depending on the ligand that is bound to it [35]. Thus, a disturbance in the TLR4-TIRAP/Mal axis could lead to a predominant activation of the TIRAP/Mal-independent signaling pathway, which could explain the reduced release of nuclear factor (NF)- κ B-dependent cytokines. Therefore, a potential 'shunting' of signals via a second pathway (Trif/Tram) could result in an unbalanced cytokine release brought about by interferon regulatory factor 3 (IRF3) and the release of type I interferon- α and - β [36]. It has recently been shown that IRF3 is crucial for endotoxin tolerance and activation may result in a reduction of cytokine release upon LPS-stimulation [36]. It is not known whether this may lead to a change in the clinical course of sepsis, but animal models showed an influence on sepsis mortality if IRF3 was pharmacologically inhibited [37]. In contrast, in *TIRAP/Mal* knock-out mice or in macrophages with nonfunctional *TIRAP/Mal*, the cytokine release via NF- κ B was strongly reduced, while IRF3-dependent signals were almost unaltered [33]. A clinical trial such as the one presented here can only yield associations of genetic variations and the observed findings. For proving a causal link an animal model is needed with transgenic mice carrying either the human gene(s) of interest or its mutated variant(s). Our interpretation that the decreased ability to induce cytokines is a cause of an altered course of infectious diseases at this point is pure speculation.

An interesting observation was the lack of differences of cytokine stimulations between patients carrying *WT* alleles and those carrying SNP alleles on day 7. The only probable explanation may come from the known changes of responsiveness of monocytes to *ex vivo* stimulation during the course of sepsis, which could depend on other factors such as secondary infections or the anti-inflammatory response. We were not able to associate these mechanisms to clinical or cytokine data in our patients.

In addition, recently generated data in *TLR2* and *TLR4* knock-out mice give strong evidence that the TLR-pathway plays a pivotal role in the stress-hormone axis after LPS-challenge as well [38]. So the course of infections in patients with the described SNPs is potentially linked to an altered stress response and may therefore influence severity of sepsis. However, data on the influence of *TIRAP/Mal* variants on the stress-hormone axis are lacking to date.

The *TLR4* SNP Asp299Gly/Thr399Ile studied here was found to cosegregate in 98% of the individuals in these European populations, confirming previous data in the



literature [11]. In the present study the 299/399 *TLR4* haplotype, when present without *TIRAP*/*Mal* mutations, was only weakly associated with susceptibility and course of disease in both groups. Our results also failed to show an association of the *TLR4* 299/399 haplotype with the incidence or type of microorganisms in surgical infections. Small previous studies on the *TLR4* Asp299Gly/Thr399Ile haplotype showed higher disease susceptibility and higher incidence of infections caused by Gram-negative microorganisms [39], but this was not supported by subsequent studies [40,41]. The normal responses of individuals bearing this allele following LPS challenge *in vitro* [42-44] and *in vivo* [45] support this lack of association. Whether the presence of *TLR4* haplotypes containing only the Asp299Gly or Thr399Ile SNPs is associated with Gram-negative infection susceptibility cannot be concluded from our study, due to the small number of patients carrying these haplotypes. However, in individuals bearing the Asp299Gly *TLR4* haplotype alone an altered cytokine response to LPS and increased susceptibility for sepsis has been reported [15,46].

As mentioned above, both *TLR4* and *TIRAP*/*Mal* genetic variants differ significantly in their frequency according to geographic locations [14,15]. This suggests that selective pressure has been present as a consequence

of different disease susceptibilities. In these studies differences in cytokine release according to the genetic variations have been proposed to be the key functional factor supporting the results presented here.

Conclusions

Recognition of microbial products via TLRs and subsequent signaling is crucial for the innate immune system to initiate a response. Genetic alterations affect this response and are related to individual variations in the course of sepsis. In summary, our studies describe a novel association between common genetic polymorphisms in sequential elements of the endotoxin recognition system (*TLR4* and the intracellular signaling adaptor *TIRAP*/*Mal*) and the course of sepsis and pneumonia. However, we were not able to show an effect on susceptibility to infections. This could indicate that variant genes in the innate immune receptor system apparently are not affecting the capability to sense invading microorganisms, but rather the appropriate initiation and modulation of the innate immune response. These findings are supported by the fact that following cardiac surgery a strong and non-infectious stimulus does not lead to an altered cytokine response when comparing the genotype groups. Further clinical and experimental studies are necessary to

elucidate the role of combined genetic variations in complex diseases such as sepsis.

Key messages

- Individuals carrying genetic variations in both, *TLR4* and the TLR signal transducer *TIRAP/Mal* had a higher risk of developing severe infectious complications following surgery as shown in two large studies including a total of 790 patients.
- Individuals carrying these two genetic variations had significantly lower cytokine levels both, in serum and following *ex-vivo* monocyte stimulation.
- These differences were not observed in a non-infectious patient cohort with post-surgical SIRS indicating the effects observed to be microorganism-driven.
- We conclude that the increased risk for developing septic complications of double SNP carriers may be caused by an impaired ability to react to pathogens with an inflammatory response.
- Genotyping for innate immune receptors may identify individuals with increased risk for septic complications who should be subject to intensified prophylactic measures.

Additional material

Additional file 1 Supplementary Tables S1 to S5. The supplementary tables contain detailed information about the studied cohorts.

Abbreviations

CI: confidence interval; DAMP: danger/damage associated molecular patterns; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor; HMGB-1: high-mobility group box-1; IFN- γ : interferon- γ ; IL: interleukin; IRF3: interferon regulatory factor 3; LOS: length of stay; LPS: lipopolysaccharide; Mal: MyD88-adaptor-like; MyD88: myeloid differentiation response factor 88; NF- κ B: nuclear factor- κ B; OR: odds ratio; PAMP: pathogen-associated molecular pattern; PBS: phosphate buffered saline; PRR: pattern recognition receptor; SD: standard deviation; SIRS: systemic inflammatory response syndrome; SNP: single nucleotide polymorphism; TIR: toll/interleukin-1 receptor; TIRAP: TIR-associated protein; TLR: toll-like receptor; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; Tram: toll-receptor-associated molecule; Trif: toll-receptor associated activator of interferon; VAP: ventilator-associated pneumonia; WT: wild type.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

OK and ELatz performed the data collection in the surgical patient group. EJG-B, MM, CR and CS performed the data collection and cytokine stimulation experiments in patients with VAP. AK and KZ performed data collection and cytokine measurements in cardiac surgery patients. DYO recruited control patients and performed data collection. LH and ELorenz performed the genotyping. PMS, DAS, ELatz, MGN, BK, JMWvdM and KZ contributed to conception and design of the study. Statistical analysis was performed by OK and EJG-B. RRS headed the project, supervised and conducted the study. OK, EJG-B, AK and RRS wrote the manuscript with input from all other authors.

Acknowledgements

We acknowledge the excellent technical help of Ina Wendler, Fränzi Creutzburg and Diana Woellner, Berlin, Germany and the support in data acquisition by Nina Klingner MD. D.-Y. Oh is a recipient of a Rahel-Hirsch-Grant of the Charité University Medical Center. K.Z. was supported by grants of the Deutsche Forschungs-

gemeinschaft (DFG) (Za243/8-1, 8-2 and 9-1). M.G.N. was supported by a Vidi Grant of the Netherlands Organization for Scientific Research. R.R.S. was supported by grants of the DFG and the Charité University Medical Center. A.K. was supported by a grant of the Forschungskommission, University Düsseldorf, Germany.

Author Details

¹Department of Anesthesiology, Intensive Care Medicine and Pain Management, Hanse-Klinikum Stralsund, Große Parower Strasse 47-53, Stralsund 18435, Germany, ²Department of Medicine, Radboud University Nijmegen Medical Center and Nijmegen Institute for Infection, Inflammation and Immunity (N4i), Geert Grooteplein 8, Nijmegen 6525 GA, The Netherlands, ³4th Department of Internal Medicine University of Athens, Medical School, 1 Rimini, Athens 12462, Greece, ⁴Clinic of Anesthesiology, Intensive Care Medicine and Pain Management, J.W.-Goethe-University Hospital, Theodor-Stern-Kai 7, Frankfurt am Main 60590, Germany, ⁵Institute for Microbiology and Hygiene, Charite-University Medical Center Berlin, Dorotheenstrasse 96, Berlin 10117, Germany, ⁶The Floating Hospital of Children, Tufts University, 755 Washington Street, Boston, MA 02111, USA, ⁷Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, 55 Lake Ave North, Worcester, MA 01605, USA, ⁸Institute of Innate Immunity, University of Bonn, Sigmund-Freud-Strasse 25, Bonn 53127, Germany, ⁹Thurston Arthritis Research Center, University of North Carolina, 3330 Thurston Building, Chapel Hill, NC 27599, USA, ¹⁰Center for Genes, Environment, and Health, National Jewish Health, 1400 Jackson Street, Denver, CO 80206, USA, ¹¹1st Department of Critical Care, University of Athens, Medical School, 45-47 Ipsilantou Street, Athens 10676, Greece and ¹²Charite Comprehensive Cancer Center, Charite-University Medical Center Berlin, Invalidenstrasse 80, Berlin 10115, Germany

Received: 21 October 2009 Revised: 7 April 2010

Accepted: 3 June 2010 Published: 3 June 2010

References

1. Chastre J, Fagon JY: Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **165**:867-903.
2. Pessaux P, Msika S, Atalla D, Hay JM, Flamant Y: Risk factors for postoperative infectious complications in noncolorectal abdominal surgery: a multivariate analysis based on a prospective multicenter study of 4718 patients. *Arch Surg* 2003, **138**:314-324.
3. Dinarello CA: Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000, **118**:503-508.
4. Parrillo JE: Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993, **328**:1471-1477.
5. Medzhitov R: Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007, **449**:819-826.
6. Adib-Conquy M, Cavaillon JM: Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS Lett* 2007, **581**:3723-3733.
7. Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E: Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock* 2005, **24**:300-312.
8. Beutler B: Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 2004, **40**:845-859.
9. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006, **124**:783-801.
10. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA: Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001, **413**:78-83.
11. Schröder NW, Schumann RR: Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005, **5**:156-164.
12. Hawn TR, Dunstan SJ, Thwaites GE, Simmons CP, Thuong NT, Lan NT, Quy HT, Chau TT, Hieu NT, Rodrigues S, Janer M, Zhao LP, Hien TT, Farrar JJ, Aderem A: A polymorphism in Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein is associated with susceptibility to meningeal tuberculosis. *J Infect Dis* 2006, **194**:1127-1134.
13. Khor CC, Chapman SJ, Vannberg FO, Dunne A, Murphy C, Ling EY, Frodsham AJ, Walley AJ, Kyriakidis O, Khan A, Aucan C, Segal S, Moore CE, Knox K, Campbell SJ, Lienhardt C, Scott A, Aaby P, Sow OY, Grignani RT, Sillah J, Sirugo G, Peshu N, Williams TN, Maitland K, Davies RJ, Kwiatkowski DP, Day NP, Yala D, Crook DW, et al.: A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet* 2007, **39**:523-528.

14. Ferwerda B, Alonso S, Banahan K, McCall MB, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ramakers BP, Mouktaroudi M, Fain PR, Izagirre N, Syafruddin D, Cristea T, Mockenhaupt FP, Troye-Blomberg M, Kumpf O, Maiga B, Dolo A, Doumbo O, Sundaresan S, Bedu-Addo G, van Crevel R, Hamann L, Oh DY, Schumann RR, Joosten LA, de la Rúa C, Sauerwein R, Drenth JP, Kullberg BJ, van der Ven AJ, Hill AV, et al: **Functional and genetic evidence that the Mal/TIRAP allele variant 180L has been selected by providing protection against septic shock.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**:10272-10277.
15. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, Syafruddin D, Kibiki G, Cristea T, Hijmans A, Hamann L, Israel S, ElGhazali G, Troye-Blomberg M, Kumpf O, Maiga B, Dolo A, Doumbo O, Hermesen CC, Stalenhoef AF, van Crevel R, Brunner HG, Oh DY, Schumann RR, de la Rúa C, Sauerwein R, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW, Netea MG: **TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:16645-16650.
16. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G: **2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.** *Crit Care Med* 2003, **31**:1250-1256.
17. Hamann L, Kumpf O, Schuring RP, Alpsyoy E, Bedu-Addo G, Bienzle U, Oskam L, Mockenhaupt FP, Schumann RR: **Low frequency of the TIRAP S180L polymorphism in Africa, and its potential role in malaria, sepsis, and leprosy.** *BMC Med Genet* 2009, **10**:65.
18. Giamarellos-Bourboulis EJ, Routsis C, Plachouras D, Markaki V, Raftogiannis M, Zervakis D, Koussoulas V, Orfanos S, Kotanidou A, Armaganidis A, Roussos C, Giamarellou H: **Early apoptosis of blood monocytes in the septic host: is it a mechanism of protection in the event of septic shock?** *Crit Care* 2006, **10**:R76.
19. Giamarellos-Bourboulis EJ, Zakyntinos S, Baziaka F, Papadomichelakis E, Vartzili S, Koutoukas P, Armaganidis A, Giamarellou H, Roussos C: **Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 as an anti-inflammatory mediator in sepsis.** *Intensive Care Med* 2006, **32**:237-243.
20. Routsis C, Giamarellos-Bourboulis EJ, Antonopoulou A, Kollias S, Siasiakou S, Koronaios A, Zakyntinos S, Armaganidis A, Giamarellou H, Roussos C: **Does soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 play any role in the pathogenesis of septic shock?** *Clin Exp Immunol* 2005, **142**:62-67.
21. Hamann L, Hamprecht A, Gomma A, Schumann RR: **Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, and -9 genes.** *J Immunol Methods* 2004, **285**:281-291.
22. Lorenz E, Frees KL, Schwartz DA: **Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR.** *Biotechniques* 2001, **31**:22-24.
23. Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW: **Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees.** *N Engl J Med* 1988, **318**:727-732.
24. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM: **Septic shock.** *Lancet* 2005, **365**:63-78.
25. Remick DG: **Pathophysiology of sepsis.** *Am J Pathol* 2007, **170**:1435-1444.
26. Holmes CL, Russell JA, Walley KR: **Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy.** *Chest* 2003, **124**:1103-1115.
27. Lin MT, Albertson TE: **Genomic polymorphisms in sepsis.** *Crit Care Med* 2004, **32**:569-579.
28. Netea MG, van der Meer JW, van Deuren M, Kullberg BJ: **Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing?** *Trends Immunol* 2003, **24**:254-258.
29. Salomao R, Martins PS, Brunialti MK, Fernandes Mda L, Martos LS, Mendes ME, Gomes NE, Rigato O: **TLR signaling pathway in patients with sepsis.** *Shock* 2008:73-77.
30. Wiersinga WJ, van't Veer C, van den Pangaart PS, Dondorp AM, Day NP, Peacock SJ, van der Poll T: **Immunosuppression associated with interleukin-1R-associated-kinase-M upregulation predicts mortality in Gram-negative sepsis (melioidosis).** *Crit Care Med* 2009, **37**:569-576.
31. Suleiman MS, Zacharowski K, Angelini GD: **Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery: the importance of anaesthetics.** *Br J Pharmacol* 2008, **153**:21-33.
32. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OF, Espevik T, Sundan A: **Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4.** *Circulation* 2002, **105**:685-690.
33. Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ: **TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression.** *Mol Interv* 2003, **3**:466-477.
34. Kagan JC, Medzhitov R: **Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling.** *Cell* 2006, **125**:943-955.
35. Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC: **The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4.** *Science* 2007, **316**:1628-1632.
36. Biswas SK, Bist P, Dhillon MK, Kajiji T, Del Fresno C, Yamamoto M, Lopez-Collazo E, Akira S, Tergaonkar V: **Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance.** *J Immunol* 2007, **179**:4083-4092.
37. Dang O, Navarro L, David M: **Inhibition of lipopolysaccharide-induced interferon regulatory factor 3 activation and protection from septic shock by hydroxystilbenes.** *Shock* 2004, **21**:470-475.
38. Zacharowski K, Zacharowski PA, Koch A, Baban A, Tran N, Berkels R, Papewalis C, Schulze-Osthoff K, Knuefermann P, Zahringer U, Schumann RR, Rettori V, McCann SM, Bornstein SR: **Toll-like receptor 4 plays a crucial role in the immune-adrenal response to systemic inflammatory response syndrome.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:6392-6397.
39. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF: **Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections.** *J Infect Dis* 2002, **186**:1522-1525.
40. Read RC, Pullin J, Gregory S, Borrow R, Kaczmarek EB, di Giovine FS, Dower SK, Cannings C, Wilson AG: **A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease.** *J Infect Dis* 2001, **184**:640-642.
41. Smirnova I, Mann N, Dols A, Derxk HH, Hibberd ML, Levin M, Beutler B: **Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:6075-6080.
42. Kumpf O, Hamann L, Schlag PM, Schumann RR: **Pre- and postoperative cytokine release after in vitro whole blood lipopolysaccharide stimulation and frequent toll-like receptor 4 polymorphisms.** *Shock* 2006, **25**:123-128.
43. Schippers EF, van't Veer C, van Voorden S, Martina CA, le Cessie S, van Dissel JT: **TNF-alpha promoter, Nod2 and toll-like receptor-4 polymorphisms and the in vivo and ex vivo response to endotoxin.** *Cytokine* 2004, **26**:16-24.
44. van der Graaf C, Kullberg BJ, Joosten L, Verver-Jansen T, Jacobs L, Van der Meer JW, Netea MG: **Functional consequences of the Asp299Gly Toll-like receptor-4 polymorphism.** *Cytokine* 2005, **30**:264-268.
45. Calvano JE, Bowers DJ, Coyle SM, Macor M, Reddell MT, Kumar A, Calvano SE, Lowry SF: **Response to systemic endotoxemia among humans bearing polymorphisms of the Toll-like receptor 4 (hTLR4).** *Clin Immunol* 2006, **121**:186-190.
46. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA: **Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock.** *Arch Intern Med* 2002, **162**:1028-1032.

doi: 10.1186/cc9047

Cite this article as: Kumpf et al., Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts *Critical Care* 2010, **14**:R103

5 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

6 Publikationsliste

1. Moesta, K.T., C. Ulmer, O. Kumpf, B. Rau, P.M. Schlag PM. 2002. Bronchoskopie unter Spontanatmung im perioperativen Management pulmonaler Komplikationen. *Viszeralchirurgie*. 2002; 37: 237-242
2. Hamann, L., O. Kumpf, M. Muller, A. Visintin, J. Eckert, P. M. Schlag, and R. R. Schumann. 2004. A coding mutation within the first exon of the human MD-2 gene results in decreased lipopolysaccharide-induced signaling. *Genes Immun* 5:283-288.
3. Schulze, T., O. Kumpf, and B. Rau. 2005. Massive subcutaneous emphysema after thoroscopic argon beamer use for pleurodesis. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 15:252-255.
4. Kumpf, O., L. Hamann, P. M. Schlag, and R. R. Schumann. 2006. Pre- and postoperative cytokine release after in vitro whole blood lipopolysaccharide stimulation and frequent toll-like receptor 4 polymorphisms. *Shock* 25:123-128.
5. Ferwerda, B., M. B. McCall, S. Alonso, E. J. Giamarellos-Bourboulis, M. Mouktaroudi, N. Izagirre, D. Syafruddin, G. Kibiki, T. Cristea, A. Hijmans, L. Hamann, S. Israel, G. ElGhazali, M. Troye-Blomberg, O. Kumpf, B. Maiga, A. Dolo, O. Doumbo, C. C. Hermesen, A. F. Stalenhoef, R. van Crevel, H. G. Brunner, D. Y. Oh, R. R. Schumann, C. de la Rúa, R. Sauerwein, B. J. Kullberg, A. J. van der Ven, J. W. van der Meer, and M. G. Netea. 2007. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16645-16650.
6. Kumpf, O., and R. R. Schumann. 2008. Genetic influence on bloodstream infections and sepsis. *Int J Antimicrob Agents* 32 Suppl 1:S44-50.
7. Hamann, L., O. Kumpf, R. P. Schuring, E. Alpsyoy, G. Bedu-Addo, U. Bienzle, L. Oskam, F. P. Mockenhaupt, and R. R. Schumann. 2009. Low frequency of the TIRAP S180L polymorphism in Africa, and its potential role in malaria, sepsis, and leprosy. *BMC Med Genet* 10:65.

8. Ferwerda, B., S. Alonso, K. Banahan, M. B. McCall, E. J. Giamarellos-Bourboulis, B. P. Ramakers, M. Mouktaroudi, P. R. Fain, N. Izagirre, D. Syafruddin, T. Cristea, F. P. Mockenhaupt, M. Troye-Blomberg, O. Kumpf, B. Maiga, A. Dolo, O. Doumbo, S. Sundaresan, G. Bedu-Addo, R. van Crevel, L. Hamann, D. Y. Oh, R. R. Schumann, L. A. Joosten, C. de la Rúa, R. Sauerwein, J. P. Drenth, B. J. Kullberg, A. J. van der Ven, A. V. Hill, P. Pickkers, J. W. van der Meer, L. A. O'Neill, and M. G. Netea. 2009. Functional and genetic evidence that the Mal/TIRAP allele variant 180L has been selected by providing protection against septic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10272-10277.
9. Kumpf, O., E. J. Giamarellos-Bourboulis, A. Koch, L. Hamann, M. Mouktaroudi, D. Y. Oh, E. Latz, E. Lorenz, D. A. Schwartz, B. Ferwerda, C. Routsis, C. Skalioti, B. J. Kullberg, J. W. van der Meer, P. M. Schlag, M. G. Netea, K. Zacharowski, and R. R. Schumann. 2010. Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts. *Crit Care* 14:R103.
10. Kumpf, O., and R. R. Schumann. 2010. Genetic Variation in Innate Immunity Pathways and Their Potential Contribution to the SIRS/CARS Debate: Evidence from Human Studies and Animal Models. *J Innate Immun* 2:381-394. Epub 2010 Apr 30.

Posterbeiträge:

Klima, K.-M., K. Lommel, R. Schabath, O. Kumpf, M. Janz, M. Tronnier, W.-D. Ludwig, R. Ratei, Eine 63-jährige Frau mit Follikulärem Lymphom und erosiven mukokutanen Läsionen; präsentiert beim Kongress der DGHO 2007

Buchbeiträge:

Schlag, P.M., O. Kumpf, V. Papstein;

Tumorschmerztherapie: in Chirurgische Onkologie.

Herausgeber: Becker, D., W. Hohenberger, T. Junginger, P.M. Schlag;
2002; Thieme Verlag, Stuttgart.

7 Selbständigkeitserklärung

„Ich, Oliver Michael Kumpf, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Der Einfluss von genetischen Variationen des Endotoxin-Rezeptor-Komplexes auf Empfänglichkeit und Verlauf von systemischen Infektionserkrankungen** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

8 Danksagung

Ohne Jukka wäre dies alles nicht möglich gewesen.

"I need a love to keep me happy" (Mick Jagger/Keith Richards, "Happy" aus "Exile on Main Street")

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern Karin und Michael, deren Leben und Schicksal mich immer beflügelt haben.

Danken will ich allen den Menschen, die meinen Weg mit gutem Rat, Ansporn, Kritik und menschlicher Stärke begleitet haben: Ralf Schumann und Eicke Latz, Prof. Dr. Peter Schlag, Prof. Dr. Ralf Kuhlen, Thonas Moesta, Holger Löser, Oberarzt Werner Kinzel, Winfried Schubert. Den vielen lieben Kolleginnen und Kollegen, ohne deren Geduld und Freude an der Arbeit man nicht durchhalten kann. Meinen lieben Freunden Babette Ulmer, Ilse Hohendorf und Hauke Kant.