

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie
und Pneumologie der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Neutralisation des Komplementfaktors C5a in der
Pneumokokken-induzierten murinen Pneumonie und Sepsis

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ute Kellermann

aus Suhl

Datum der Promotion: 17.09.2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Publikation: Müller-Redetzky H, Kellermann U, Wienhold S-M, Gutbier B, Lienau J, Hellwig K, Reppe K, Letsiou E, Tschernig T, Scholz M, Ahnert P, Maasch C, Hoehlig K, Klussmann S, Vater A, Firsching TC, Hoppe J, Suttorp N, Witzernath M. Neutralizing Complement C5a Protects Mice with Pneumococcal Pulmonary Sepsis. *Anesthesiology* 2020; 132(4):795–807.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis.....	9
Materialliste	12
Zusammenfassung.....	17
Abstract	18
1 Einleitung	19
1.1 Die ambulant erworbene Pneumonie	19
1.2 Sepsis	20
1.3 Das Komplementsystem	21
1.3.1 Die Aktivierung der Komplementkaskade	21
1.3.2 Der Membranangriffskomplex	24
1.3.3 Die Rolle des Komplementspaltproduktes C5a	26
1.4 Der beatmungsassoziierte Lungenschaden	27
1.5 Hypothese und Ziel dieser Arbeit	28
2 Material und Methoden	29
2.1 Klinische Studie.....	29
2.2 Aufbereitung der L-RNA Aptamere	30
2.3 Herstellung der Nährmedien.....	30
2.4 Herstellung eines Stammstocks	31
2.5 Anzucht Pneumokokken für die Versuchsserien	31
2.6 Versuchstiere und Tierhaltung.....	32
2.7 Infektion der Versuchstiere.....	32
2.7.1 Beobachtungsinstrumente der Pneumokokkenpneumonie	33
2.7.2 Einschlusskriterien für das Vorliegen einer Pneumokokkenpneumonie	35
2.8 Applikation von humanem Serumalbumin	35
2.9 Neutralisation von C5a im Modell der murinen pneumogenen Sepsis	35
2.9.1 Versuchsgruppen	35
2.9.2 Studiendesign	36
2.9.3 Präparation und Probengewinnung	37
2.10 Neutralisation von C5a im <i>double-hit</i> Modell der pneumogenen Sepsis und beatmungsassoziierten Lungenschaden	39
2.10.1 Versuchsgruppen	39
2.10.2 Studiendesign	39
2.10.3 Kalibration, Präparation, Parameter Beatmung und Probengewinnung	41
2.11 Leukozytendifferenzierung	44

2.11.1	Quantifizierung der Gesamtleukozytenzahl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	44
2.11.2	Fluorescence-activated cell sorting (FACS) in der BALF.....	44
2.11.3	Quantifizierung der Gesamtleukozytenzahl im Blut.....	45
2.12	Bestimmung der Bakterienlast.....	45
2.13	Quantifizierung der Zytokine	46
2.14	Beurteilung der pulmonalvaskulären Permeabilität	46
2.15	Laborchemische Messung von AST und Harnstoff	47
2.16	Immunhistochemische Färbung der Leber.....	47
2.17	Quantifizierung des Komplementfaktors C5a	48
2.18	Statistische Analyse.....	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Die ambulant erworbene Pneumokokkenpneumonie führt zu erhöhten Konzentrationsspiegeln des Anaphylatoxins C5a.....	49
3.2	Die Pneumokokkenpneumonie mit pneumogener Sepsis führt zu einem signifikanten Anstieg der C5a Spiegel	53
3.3	Die Pneumonie als lokale Inflammation.....	54
3.3.1	Die Neutralisation des Komplementfaktors C5a führt in der Pneumokokkenpneumonie zu einer Reduktion der pulmonalvaskulären Permeabilität.....	54
3.3.2	Die Neutralisation des Komplementfaktors C5a reduziert die Krankheitsschwere der murinen Pneumokokkenpneumonie	55
3.3.3	Die Neutralisation des Komplementfaktors C5a hat keinen Einfluss auf die Rekrutierung der Leukozyten ins Lungenparenchym.....	55
3.3.4	Die Neutralisation von C5a zeigt keinen Einfluss auf die Immunantwort.....	56
3.3.5	Die Neutralisation von C5a führt in der Pneumokokkenpneumonie zu keiner Änderung der lokalen Bakterienlast	57
3.4	Pneumonie als systemische Inflammation	58
3.4.1	Die Neutralisation von C5a zeigt keinen Einfluss auf die systemische zelluläre Immunantwort	58
3.4.2	Die Neutralisation von C5a bewirkt eine Reduktion systemischer G-CSF-Levels	59
3.4.3	Die Neutralisation von C5a hat keinen Effekt auf die bakteriämische Absiedlung der Pneumokokken	60
3.5	Extrapulmonaler Organschaden.....	61
3.5.1	Die Neutralisation von C5a hat keinen Einfluss auf akutes Nierenversagen.....	61
3.5.2	Die Neutralisation von C5a wirkt protektiv auf das Entstehen eines Leberversagens	62
3.6	Neutralisation von C5a im Modell des beatmungsassoziierten Lungenschadens (VILI) in der Pneumokokkenpneumonie und Sepsis	66
3.6.1	Die Neutralisation von C5a stabilisiert die pulmonalvaskuläre Permeabilität beim VILI in der Pneumokokkenpneumonie und Sepsis	66
3.6.2	Die Neutralisation von C5a bewirkt eine Reduktion des mittleren Atemwegsdruckes.....	67
3.6.3	Die Neutralisation von C5a hat keinen Einfluss auf die zelluläre Immunantwort im double-hit Modell der pneumogenen Sepsis und des VILI	68

Inhaltsverzeichnis

3.6.4 Die Neutralisation von C5a hat im Modell des beatmungsassoziierten Lungenschadens in der pneumogenen Sepsis keinen signifikanten Einfluss auf die Sekretion inflammatorischer Mediatoren	69
4 Diskussion	71
Literaturverzeichnis	78
Eidesstattliche Versicherung	89
Lebenslauf	91
Publikationsliste	92
Danksagung.....	93

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der Aktivierung des Komplementsystems modifiziert nach (44).....	24
Abb. 2 Schematische Darstellung der Bildung des Membranangriffskomplexes modifiziert nach (44).....	25
Abb. 3 Versuchsaufbau und Studienmedikationsschema	37
Abb. 4 Versuchsaufbau und Studienmedikationsschema VILI	40
Abb. 5 Versuchsaufbau und Studienmedikationsschema VILI nicht ventilierte Kontrollgruppen	41
Abb. 6 Humane C5a Spiegel in der ambulant erworbenen Pneumokokkenpneumonie	51
Abb. 7 C5a Spiegel in Plasma und BALF im Modell der murinen Pneumonie und Sepsis	53
Abb. 8 Pulmonalvaskuläre Permeabilität der Lunge	54
Abb. 9 Klinischer <i>Score</i> murine Pneumokokkenpneumonie	55
Abb. 10 Leukozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)	56
Abb. 11 Lokales Zytokinprofil in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)	57
Abb. 12 Bakterienlast in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	57
Abb. 13 Leukozyten im Vollblut	59
Abb. 14 Zytokinprofil des Blutplasmas	60
Abb. 15 Bakterienlast im Blut und in der Milz.....	61
Abb. 16 Konzentration Harnstoff im Blutplasma	62
Abb. 17 Konzentration AST im Blutplasma.....	63
Abb. 18 Immunhistochemische Färbung von Caspase 3a in der Leber.....	64
Abb. 19 Immunhistochemische <i>Scoring</i> Frequenz von Caspase 3a in der Leber.....	64
Abb. 20 Immunhistochemische Färbung von Fibrin in der Leber	65
Abb. 21 Immunhistochemische <i>Scoring</i> Frequenz von Fibrin in der Leber	65
Abb. 22 Pulmonalvaskuläre Permeabilität der Lunge	66
Abb. 23 Mittlerer Atemwegsdruck im zeitlichen Verlauf der mechanischen Beatmung	67
Abb. 24 Mittlerer Atemwegsdruck nach 6 h mechanischer Beatmung	68
Abb. 25 Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage im double-hit Modell.....	69
Abb. 26 Lokales Zytokinprofil in der bronchoalveolären Lavage (BALF).....	70

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Chemikalien und Reagenzien.....	12
Tab. 2 Medikamente.....	13
Tab. 3 Verwendete Antikörper.....	13
Tab. 4 Verwendetes Verbrauchsmaterial	14
Tab. 5 Verwendete Geräte.....	15
Tab. 6 Geräteinsatz extern.....	16
Tab. 7 Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung von Versuchstieren modifiziert nach (127).....	34
Tab. 8 Versuchsgruppen der tierexperimentellen Untersuchungen zum therapeutischen Effekt von NOX-D19 in der Pneumokokken-induzierten Pneumonie und Sepsis.....	36
Tab. 9 Versuchsgruppen der tierexperimentellen Untersuchungen zum therapeutischen Effekt von NOX-D19 im <i>double-hit</i> -Modell.....	39
Tab. 10 Patientencharakteristika und klinische Parameter der PROGRESS-Studie.....	50
Tab. 11 C5a Spiegel [nmol/L] in ausgewählten Patientengruppen	51
Tab. 12 Korrelation C5a Serumspiegel mit klinischen Parametern der PROGRESS-Studie ..	52

Abkürzungsverzeichnis

ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
APC	Allophycocyanin
AST	Aspartat-Aminotransferase
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
Cn	Komplementfaktor n
CAP	Community-acquired pneumonia
CAPNETZ	Kompetenznetzwerk „Ambulant erworbene Pneumonie“
CCL3	Chemokine C-C Motif Ligand, ehem. MIP1- α macrophage inflammatory protein 1- α
CDn	Cluster of differentiation n
CLP	Cecal ligation pucture
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
C(U)RB-65-Score	Confusion, Urea, Respiratory rate, Blood pressure
CXCL1	<i>Chemokine C-X-C Motif Ligand 1</i> ; ehemals KC Keratinocyte-derived cytokine
CXCL2	<i>Chemokine C-X-C Motif Ligand 2</i> ; ehemals MIP-2 α Macrophage inflammatory protein-2 α
C5 _{adesArg}	C5a desarginiert
C5aR	G-protein-abhängiger C5a Rezeptor
DAMP	Damage-associated molecular pattern
eCRF	electronic case report form
ELISA	Enzyme Linkes Immunosorbent Assay
et al.	et alii (und andere)
etc.	et cetera
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Foetal Calf Serum
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstofffraktion
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G-CSF	Granulocyte Colony-stimulating Factor
Glu	Glukose 5%
h	Stunde

Abkürzungsverzeichnis

HSA	Humanes Serum Albumin
I.E.	Internationale Einheit
I:E-Ratio	Inspirations- zu Expirationsverhältnis
IL-n	Interleukin-n
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KBE	Kolonie-bildende Einheit
KC	Keratinocyte Chemoattractant
KG	Körpergewicht
Ktr.	Kontrolle
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Membrane Attack Complex
MAP	<i>Mean airway pressure</i> (mittlerer Atemwegsdruck)
MASP-1 (2)	MBL-assozierte Serinprotease
MBL	Mannose-bindendes Lektin
min	Minute
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MV	Mechanische Ventilation
n	Gruppengröße
NOX-D19	Spiegelmer NOXD19
OD	Optische Dichte
PAMP	Pattern associated molecule patterns
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCT	Procalcitonin
PE	Phyoerythrin
PEEP	Positive end-experatory pressure
PEG	Polyethylenglycol
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
p.i.	post infectionem
PMN	Polymorphnuclear leukocyte
PRR	Pattern recognition receptor

(q)SOFA	quick Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment
®	Registered Trademark
ROS	Reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
PSI	Pneumonia Severity Index
sec	Sekunde
s.	siehe
SD	Standard deviation
siRNA	Small interfering Ribonucleic acid
<i>S. pneumoniae</i> (<i>S. pn.</i>)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TF	Tissue factor
TGF- β	Transforming Growth Factor β
THY	Todd Hewitt Bouillon
TLR	Toll-like receptor
™	Trademark
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VILI	Ventilator-induced lung injury
vs.	Versus
V _T	Tidalvolumen
Wt	Wildtyp

Materialliste

Tab. 1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien, Reagenzien	Hersteller
Aqua ad iniectabilia (10ml)	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
Bio-Plex Pro™ Assay	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA)
Bio-Plex® Reagent Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA)
Blutagarplatten (5% Schafblut)	BD Biosciences (Heidelberg)
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Braunol®	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
CellWash	BD Biosciences (Heidelberg)
Dnase I	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
FACS™ Lysing Solution	BD Biosciences (Heidelberg)
Foetal Calf Serum Gold	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
Harnstoff CT FS	Diagnostic Systems GmbH (Holzheim)
Human Albumin ELISA Quantation Set	Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, TX, USA)
Hyaluronidase	Sigma (Deisenhofen)
Kollagenase (Typ CLS II)	Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ, USA)
Methylviolett	Merck (Darmstadt)
Natrium-Chlorid-Lösung (0,9%)	BRAUN AG (Melsungen)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
PBS, Dulbecco's without Ca & Mg (1X)	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
Protease-Inhibitor complete™ Mini	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
RPMI 1640 500ml •PAA•E15-039	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
Thilo Tears Augengel	Alcon Pharma GmbH (Freiburg im Breisgau)
THY (Todd Hewitt-Bouillion)	BD Biosciences (Heidelberg)
TMB soluble	Merck (Darmstadt)
Tris Pufferan® ≥99,9 %	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
TRIzol Reagent	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Yeast-Extrakt (Hefeextrakt 0,5%)	BD Biosciences (Heidelberg)

Tab. 2 Medikamente

Medikamente	Hersteller
Cepetor® 1 mg/ mL	Pharma Handelsgesellschaft mbH (Burgdorf)
Dormicum® 5 mg/ 1 mL	Roche Pharma AG (Grenzach-Wyhlen)
Fentanyl® – Janssen 0,5 mg/ 10 mL	Janssen – Cilag GmbH (Neuss)
Heparin 25000 I.E., 5 mL	ratiopharm GmbH (Ulm)
Jonosteril®	Fresenius KABI Deutschland GmbH (Bad Homburg)
Ketavet Injektionslösung 100 mg/ mL	Pfizer Deutschland GmbH (Berlin)
Natriumchloridlösung, 0,9%	Fresenius Kabi Deutschland (Bad Homburg)
NOXXON D19 Lot A75886 2 mg/mL	NOXXON Pharma AG (Berlin)
NOXXON 5% Glukosevehikellösung Lot: NOX—R0180	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
Rompun Injektionslösung 2 % (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Tham Köhler 3 M Infusionslösungskonzentrat	Köhler Pharma GmbH (Alsbach-Hähnlein)

Tab. 3 Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Mouse BD Fc-Block	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse CD45, PerCP conjugated (panleukocyte marker; clone: 30-F11)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse CD16/CD32 (Fc II/IIIreceptor block; clone:2.4G2)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse Ly-6G/Ly-6C, PE conjugated (GR-1) (neutrophil marker; cloneRB6-8C5)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse F4/80, APC conjugated (alveolar macrophage marker; clone: BM8)	Caltag Laboratories (Buckingham, UK)

Tab. 4 Verwendetes Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BD Falcon™ 5 ml Polypropylene Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ Zellsieb (100 µm)	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Neoflon™ 24G	Becton Dickinson (Helsingborg)
BD Trucount™ Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafblut	BD Biosciences (Heidelberg)
Coulter Cellcounter-Gefäß	ratiolab GmbH (Dreieich)
Einmal-Impfshlingen (farblos, 1 µl)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Falcon Blue Max™ (15 mL)	BD Biosciences (Heidelberg)
Falcon Blue Max™ (50 mL)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kanülen BD Microlance™ (26 G)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kanülen BD Microlance™ 3 (27 G)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kapillarblutentnahmesystem (mit EDTA)	Kabe Labortechnik (Nümbrecht-Elsenroth)
Küvetten Nr. 67.742 10 x 4 x 45mm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Luminject® Einmalinjektionskanülen 31G	Transcodent GmbH & Co. KG (Kiel)
Mehrzweckbecher 100 mL	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Omnifix®-F 1 mL	Braun Melsungen AG, Melsungen
Parafilm	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf (Hamburg)
Platte 96 Micro U-Form #650101	Th. Geyer Berlin GmbH (Berlin)
Rotilabo®-Spritzenfilter, steril (0,45 µm)	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Reagiergefäß SafeSeal (0,5 mL; 1,5 mL)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Röhrchen Kryo Plus steril 2ml #72.379	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Serologische Pipetten (2 mL/ 5 mL/ 10 mL/ 25 mL)	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD Discardit TM II (5mL)	BD Biosciences (Heidelberg)

Tab. 5 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
ABL-800	Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
Analysewaage (Sartorius, MC 5(-OCE))	Sartorius AG (Göttingen)
Anthos ht2 Mikroplatten Photometer	Anthos Mikrosysteme GmbH (Krefeld)
Autoklav Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec GmbH (Wettenberg)
Biofuge fresco (Heraeus) Mikrozentrifuge	Kendro Laboratory Products (Hanau) Zentrifuge
Bio-Plex™ Workstation	Bio-Rad Laboratories, Inc (Kalifornien, USA)
Bio-Plex™ Millipore	Bio-Rad Laboratories, Inc (Kalifornien, USA)
Brutschrank Heraeus Typ BB 6220 O2	Kendro Laboratory Products (Osterode)
BD FACSCalibur™ (Durchflusszytometer)	BD Biosciences (Heidelberg)
Gefäßklemme	Fine Science Tools® GmbH (Heidelberg)
KERN 440-33N, Laborpräzisionswaage	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Kühlschrank (4 °C) / Gefrierschrank (-80 °C)	Kühlsysteme GmbH (Mannheim)
Magnetrührer (Variomag Electronicrührer Mono)	H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim)
Megafuge 1.0R (Heraeus) Variomag®	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Mikroplatten Photometer	Anthos Mikrosysteme GmbH (Krefeld)
Mikroskop Axioskop 2 FS MOT (mit AxioCam und LSM 5 Pascal)	Axioskop, Carl Zeiss Jena GmbH (Jena)
MiniVent Beatmungspumpe Maus	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
NanoDrop 2000	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Peristaltikpumpe Ismatec® Reglo-Analog	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH IDEX Health & Science GmbH (Wertheim)
pH-Meter	Mettler-Toledo FiveEasy pH (Gießen)
Photometer Uvikon XS	BioTek Instruments (Bad Friedrichshall)
Pulmonalkanüle für Mäuse	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Rektalsonde	Microprobe RET 3 for mouse (WPI Berlin)
Rektalsonde	Hugo Sachs Elektronik Harvard Appartus (March-Hugstetten)
Sicherheitswerkbank Hera Safe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Oszilloskop	Servomed Hellige (Saarland)
Pulsoximeters MouseOx®	Starr Life Science Corporation (Oakmont, USA)
Pulmonalisarterienkanüle	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Trachealkanüle für Mäuse	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Ultra-Turrax T 8	IKA®-Werke GmbH & CO.KG (Staufen)
Vakuumpumpe Vacusafe comfort	Integra Biosciences AG (Schweiz)
Vortex-Genie 2® Model G-560E	Scientific Industries, Inc. (USA)

Materialliste

Waage Model CS 200	Ohaus Corporation (USA)
Wärmematte	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Zählkammer nach Neubauer	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)

Tab. 6 Geräteinsatz extern

Extern	Hersteller
Biacore™ <i>Binding Assay</i>	NOXXON Pharma AG (Berlin)
Cobas®6000	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
IFCC-Test mit Pyridoxalphosphat	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

Zusammenfassung

Die ambulant erworbene Pneumonie (*community-acquired pneumonia*, CAP) stellt eine der weltweit häufigsten Infektionskrankheiten dar. *Streptococcus pneumoniae* ist der häufigste Erreger. Trotz Antibiotikatherapie weist die CAP-assoziierte pneumogene Sepsis eine hohe Mortalität auf. Eine unkontrollierte überschießende Immunreaktion trägt wahrscheinlich zum akuten Lungenversagen sowie zu extrapulmonalem Organversagen bei. Der Komplementfaktor C5a ist hierbei ein zentraler Entzündungsmediator. Auch in der Bedeutung des beatmungsassoziierten Lungenschadens (*ventilator-induced lung injury*, VILI) scheint die lokale und systemische Entzündungsreaktion eine relevante Rolle zu spielen. Sie scheint den Lungenschaden in der schweren Pneumonie zu aggravieren.

In dieser Dissertation wurde die Hypothese geprüft, dass (1) C5a Spiegel in der CAP erhöht sind und (2) sich eine Neutralisierung von C5a in der schweren Pneumonie stabilisierend auf die pulmonalvaskuläre Permeabilität und darüber hinaus protektiv hinsichtlich des Auftretens von extrapulmonalem Organversagen auswirkt.

Die Spiegel von C5a wurden aus Patientenseren der PROGRESS-Studie, einer prospektiven, multizentrischen Kohortenstudie sowie im Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie untersucht. Therapeutische Effekte der C5a Neutralisation wurden in der *S. pneumoniae*-induzierten pneumogenen Sepsis in C57BL/6N Mäusen und in einem murinen Modell des beatmungsassoziierten inflammatorischen Lungenschadens in der pneumogenen Sepsis analysiert.

Bei hospitalisierten Patienten mit CAP und im murinen Modell der schweren Pneumokokkenpneumonie wurden erhöhte C5a-Spiegel gemessen.

Die Neutralisation von C5a führte in beiden Tiermodellen zur Stabilisierung der pulmonalvaskulären Barrierefunktion. In der pneumogenen Sepsis reduzierte die Neutralisation von C5a das Ausmaß des Leberschadens, es kam zu weniger hepatozellulärer Apoptose und zu einer reduzierten Thrombogenität in der hepatischen Mikrozirkulation. Im VILI führte die Neutralisation von C5a ebenfalls zur Reduktion der pulmonalvaskulären Permeabilität.

C5a ist in der schweren CAP erhöht. Die Neutralisation von C5a schützte vor Lungen- und Leberschaden im murinen Pneumoniemodell. Daher könnte die Neutralisation von C5a in der schweren CAP eine vielversprechende Behandlungsstrategie sein, um den Verlauf der Erkrankung zu verbessern. [1]

Abstract

Community-acquired pneumonia is one of the most common infectious diseases worldwide. *Streptococcus pneumoniae* represents the most common pathogen. Despite antibiotic therapy, CAP-associated pneumogenic sepsis is characterized by a high mortality rate. An uncontrolled, overshooting immune response most likely causes lung failure and extrapulmonary organ failure. The complement factor C5a is here a major inflammatory mediator.

Additionally, the local and systemic inflammatory reaction seems to play a relevant role in the development of ventilator-induced lung injury (VILI) resulting in the aggravation of severe pneumonia.

Here, the hypothesis was investigated whether C5a levels are increased in CAP and whether neutralisation of C5a during severe pneumonia leads to stabilisation of the pulmonary vascular permeability and protects against extrapulmonary organ failure.

The C5a levels were evaluated in patient samples from the PROGRESS study, a prospective, multi-centered cohort study, and additionally investigated in a murine pneumococcal pneumonia model. Therapeutic effects of C5a neutralisation were examined in a model of *S. pneumoniae* induced pneumogenic sepsis in C57BL/6N mice as well as in a murine model of ventilator-induced lung injury during pneumogenic sepsis.

Elevated C5a levels were found in hospitalized patients with CAP and in the murine model of severe pneumococcal pneumonia. C5a neutralisation led to stabilisation of the pulmonary vascular barrier function in both animal models. During pneumogenic sepsis, C5a neutralisation reduced liver damage, with hepatocellular apoptosis and thrombogenicity in the hepatic microcirculation occurring less frequently. In addition, C5a neutralisation in the VILI model resulted in reduction of the pulmonary vascular barrier function, too.

In severe CAP, C5a levels are increased. C5a neutralisation protected against lung and liver damage in the murine model of pneumonia. Therefore, C5a neutralisation might be a promising treatment strategy in order to improve the course of severe CAP. [1]

1 Einleitung

1.1 Die ambulant erworbene Pneumonie

Die ambulant erworbene Pneumonie (*Community-acquired pneumonia*; CAP) ist eine Unterform der akuten Infektionen der Atemwege, die sich insbesondere im Lungenparenchym, den Alveolen, abspielt (2). Eine Pneumonie gilt als ambulant erworben, wenn sie frühestens 4 Wochen nach einem Krankenhausaufenthalt auftritt (3).

Die Pneumonie stellt mit einer Inzidenz für Deutschland zwischen 3,7 und 10,1 auf 1000 Erwachsene pro Jahr eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit dar (4, 5). Demzufolge erkranken in Deutschland jährlich 680.000 Menschen an einer CAP (6). Hochrisikogruppen für die Infektion mit einer CAP sind Kinder unter 5 Lebensjahren sowie ältere Menschen über 65 Lebensjahren (7).

Die Inzidenz der CAP zeigt sich deutlich altersabhängig mit 18,2 auf 1000 Personen im Alter zwischen 65 und 69 Jahren auf bis zu 52,3 auf 1000 Menschen im Alter von über 85 Jahren (8). Risikofaktoren für eine CAP sind chronische Atemwegserkrankungen, das metabolische Syndrom und die Unterbringung in Pflegeeinrichtungen (8, 9).

Die 2015 veröffentlichte Global Burden Disease-Studie gruppiert die Pneumonie auf Platz 3 der weltweit häufigsten Todesursachen ein (10). Die mittlere Mortalität der CAP beträgt 6,3% (8). Im Alter ≥ 65 Lebensjahre beträgt sie sogar 10,3% (8).

Der häufigste Erreger der CAP ist *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*, *S. pn.*) (5, 11, 12), der häufig Teil der bakteriellen Besiedlung des *Nasopharynx* ist (3). Über Mikroaspiration gelangen die Erreger vom *Nasopharynx* schließlich über das Bronchialsystem in tiefere Lungenabschnitte (13).

S. pneumoniae weist einige spezifische Virulenzfaktoren auf. Hierzu zählen beispielsweise die serotypische Polysaccharidkapsel, die Synthese und Exsudation eines Biofilms und das Zytolysin Pneumolysin (14). Hierdurch wird beispielsweise der Ziliarschlag des respiratorischen Epithels beeinträchtigt, den Pneumokokken der Zugang zu den Epitheloberflächen ermöglicht (14), die Komplementfaktorbindung und die Phagozytose gehemmt (15, 16) und intrazellulär im Monozyten-Makrophagensystem die Bereitstellung der reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) inhibiert (14).

Unter anderem durch die Aktivierung von Leukozyten, der Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Lipidmediatoren sowie der Bereitstellung von ROS wird eine Verletzung von Epithel und Endothel der Lunge erreicht (17, 18). Weiterhin führt eine überschießende

Einleitung

Immunantwort sowie eine unkontrollierte Aktivierung des Gerinnungssystems zu epitheliale Schaden der pulmonalvaskulären Barriere und erhöht damit deren Permeabilität und damit das Risiko einer Systemerkrankung (18). In 10% der in den Kliniken behandelten CAP-Fälle ist eine weitere Behandlung auf einer Intensivstation nötig. Häufige Übernahmegründe auf Intensivstationen stellen dann besonders das akute Lungenversagen und der septische Schock dar (19).

1.2 Sepsis

Der Begriff Sepsis ist definiert als eine lebensbedrohliche Organfehlfunktion als Reaktion auf eine schwere Infektion (20). Kennzeichnend ist eine dysregulierte Immunantwort gegenüber der Infektion (20). Der septische Schock ist als Untergruppe der Sepsis definiert, bei der Kreislauf-, Zell- und Stoffwechselanomalien mit einem höheren Sterblichkeitsrisiko verbunden sind (21). Im Jahr 2015 wurden in Deutschland 75.227 Todesfälle infolge einer Sepsis dokumentiert, was ca. 15% der verstorbenen, hospitalisierten Patienten ausmacht (22, 23). Weltweit, also inklusive der Länder mit Niedrigeinkommen, verstarben im Jahr 2017 11 Millionen Menschen an einer Sepsis (24). Mit 1,8 Millionen Todesfällen stellten Infektionen der unteren Atemwege 2017 die häufigste Ursache sepsisassoziierter Todesfälle dar (24).

Die häufigste Sepsis auslösende Infektion ist die Pneumonie (25).

Die parallele Aktivierung von sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Mechanismen und des Gerinnungssystems, Veränderungen metabolischer Regulationsmechanismen und Einflussnahme auf kardiovaskuläre Funktionen unterliegen der Pathophysiologie der Sepsis und des septischen Schocks (21). Das Resultat ist eine Beeinträchtigung auf der Ebene der Mikrozirkulation: Durch intravaskulären Volumenmangel infolge von Extravasation von Blutplasma und Vasoplegie sowie in einigen Fällen auftretender kardialer Insuffizienz im Sinne einer septischen Kardiomyopathie entsteht eine Dysbalance zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot, was zu einer Minderversorgung des Gewebeparenchyms führt (26–28). Das Auftreten eines Multiorganversagens resultiert aus der Folge von progressiver Gewebshypoxie (29). Darüber hinaus werden auch direkte inflammationsbedingte Zellschädigungen diskutiert (30–32).

Circa 70% der Sepsis-Fälle sind ambulant erworben (33). Die Inzidenz der infektionsassozierten Sepsisfälle in Deutschland wurde 2017 mit 136.622 Patienten bemessen (24). Auch hier spielen das Alter und die damit inbegriffenen Komorbiditäten der Patienten für die Prognose eine große Rolle (21, 34). Die frühzeitige Diagnosestellung der Sepsis sowie die Identifikation der möglichen Ursache sind für die Initiierung evidenzbasierter Therapieschritte essentiell (35).

Die Überlebenschancen einer Sepsis sind unmittelbar vom zeitnahen Beginn einer adäquaten antiinfektiven Therapie (36) und nach Möglichkeit, der chirurgischen bzw. interventionellen Sanierung des Infektherdes (37, 38). Zudem stellen Volumen- und Flüssigkeitsmanagement zur Stabilisierung der Hämodynamik einen zentralen Bestandteil des Therapieregimes der Sepsis dar: Aktuell werden von der *Surviving Sepsis Campaign* 30 mL/kg Körpergewicht (KG) an kristalloiden Lösungen *intravenös* (i.v.) innerhalb der ersten 3 Stunden empfohlen (39). Im septischen Schock kommen supportiv Katecholamine und Hydrocortison zum Einsatz (40, 41). Trotz Therapie bleibt die Mortalität des septischen Schocks hoch (42).

Spezifische adjuvante Therapien, die zielgerichtet Pathomechanismen des septischen Schocks adressieren, sind aktuell nicht verfügbar. Sie könnten aber eine Möglichkeit darstellen, das Überleben der Patienten zu verbessern. In diesem Kontext könnten neue adjunktive Therapien eine Möglichkeit darstellen, das Krankheitsbild der Sepsis effektiver zu behandeln.

1.3 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem stellt einen essentiellen Teil der angeborenen Immunantwort dar (43). Es setzt sich aus löslichen Plasmaproteinen, die sowohl im Blut als auch in Körperflüssigkeiten und Geweben zirkulieren, und membrangebundenen Rezeptoren mit regulatorischen Eigenschaften zusammen (44). Die Funktionen dieses Systems beinhalten die Eliminierung von Pathogenen, die Koordination immunologischer und inflammatorischer Prozesse, die Synchronisation von Co-Stimulationen sowie die Aktivierung weiterer immunkompetenter Zellen. Auch Abbau und Regeneration von apoptotischem Gewebe werden zum Teil durch Komplementkomponenten initiiert (43, 44).

1.3.1 Die Aktivierung der Komplementkaskade

Die Komplementfaktoren, im Folgenden C1-Cn abgekürzt, liegen meist als inaktive Vorstufen vor (45). Die Stimulation des Komplementsystems führt zu einer kaskadenartigen Aktivierung der nachgeordneten Komplementfaktoren (46, 47). Dieses Prinzip hat eine überproportionale Komplementantwort zur Folge (45). Die Spaltung der Komplementkomponenten erfolgt jeweils in die größeren b-Fragmente, welche aufgrund der Spaltung reaktive Thioestergruppen ausbilden, die sie zur kovalenten Bindung an (pathogenen) Membranoberflächen befähigen (43, 45). Ferner werden durch proteolytische Spaltung ebenso die kleineren a-Fragmente frei, die potente Chemokine darstellen (43, 45, 48). Eine besondere Rolle nimmt hier C5a ein.

Einleitung

Die Aktivierung des Komplementsystems kann auf drei möglichen Wegen erfolgen – dem klassischen Weg, dem Lektinweg und dem alternativen Aktivierungsweg, welche in Abb. 1 schematisch veranschaulicht werden.

Der klassische Aktivierungsweg

Initial erfolgt die Bindung des löslichen *Pattern recognition receptors* (PRR) C1q als Bestandteil des Komplementkomplexes C1 an seinem Liganden (47). Die Besonderheit von PRR als Komponente der angeborenen Immunantwort ist die Wiedererkennung sich wiederholender Molekülstrukturen von Pathogenen, den *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) (49, 50). Damit wird nun erstmals in der Immunreaktion zwischen Eigen- und Fremdanigen unterschieden (43). Den wichtigsten Aktivierungsmechanismus repräsentiert die Bindung von C1q an Immunglobulin M (IgM), die im Rahmen der humoralen Immunantwort synthetisiert werden (51). Des Weiteren kann C1q auch über Bindung an natürlichen Antikörpern vom IgM-Typ zur Aktivierung des klassischen Weges führen (51). Diese Bindung bewirkt eine Konformationsänderung eines weiteren Bestandteils innerhalb des C1-Komplexes, nämlich C1r. Dieser erlangt dadurch eine autokatalytische Aktivität und aktiviert infolge dessen die Komponente C1s des C1 Komplexes (52). Die hierdurch aktive Serinprotease ist in der Lage, die Komplementfaktoren C2 und C4 zu spalten (52). Durch die Spaltung von C4 zu C4a und C4b wird auf dem b-Fragment eine hoch reaktive Thioesterbindung exprimiert, die nun eine kovalente Bindung dieses Fragments an der Oberfläche der antigenwirksamen Struktur ermöglicht (52). Eine Bindung des Spaltprodukts C2b an oberflächengebundenes C4b führt anschließend zur Bildung der C3-Konvertase C4b2a (48, 52). In dieser Konstellation stellt C4b als Bestandteil der C3-Konvertase die aktive Serinprotease dar (53).

Der Lektinweg

Dieser Aktivierungsweg ist dem klassischen Weg funktionell ähnlich (44). Auch hier werden durch PRR, in diesem Fall die Mannose-bindenden Lektine (MBL), ein in der Leber synthetisiertes Akute Phase Protein, entsprechende PAMPs gebunden (54, 55). Im Falle der MBL handelt es sich bei den PAMPs zumeist um Mannose-haltige Kohlenhydratstrukturen, aber auch um natürliche IgM und ebenso apoptotische Zellen (56). Durch Bindung wird so die MBL-assoziierte-Serinprotease (MASP-1; MASP-2) des Komplexes aktiviert (52). MASP-2 ist nun befähigt, C2 und C4 zu spalten, auch hier wird wieder eine hoch reaktive Thioesterbindung generiert, die eine kovalente Bindung an pathogenen Oberflächen ermöglicht (57). Das Produkt dieses Aktivierungsweges ist ebenfalls die C3-Konvertase C4b2a (58–60).

Der alternative Aktivierungsweg

Kennzeichen dieses dritten Weges ist primär der langsame und spontane Zerfall durch Hydrolyse der C3 Komponente zu C3a sowie C3b- dem sogenannten *tick-over* (47). Wobei C3b auch hier wieder durch das Freiwerden einer Thioesterbindung die kovalente Bindung von C3b an Oberflächenstrukturen ermöglicht (43). Spontane Hydrolysen in den C3-Molekülen ($C3_{H_2O}$) bedingen eine Konformationsänderung der Moleküle und legen so neue Bindungsstellen frei, die wiederum die Bindung an die im Plasma befindlichen Komplementfaktoren B ermöglicht (61). Das Molekül $C3_{H_2O}B$ repräsentiert ein Proenzym, das von der im Plasma aktiven Serinprotease Faktor D zum aktiven Enzym $C3_{H_2O}Bb$ und dem Spaltprodukt Ba umgesetzt wird (62). Dieser Komplex stellt nun eine C3-Konvertase dar. Sie ist in der Lage, ungebundenes C3 in C3a und C3b zu spalten - C3b erhält so wiederum eine reaktive Thioestergruppe, die nun kovalent an Amino- bzw. Kohlenhydratketten von Zieloberflächen binden kann (52, 63). Hier wird nun an der Zelloberfläche weiteres Faktor B an C3b gebunden und durch Faktor D zu Ba und Bb gespalten (44, 48). Es entsteht die C3-Konvertase des alternativen Aktivierungswegs, C3bBb (43, 48).

Interessant ist, dass auch beim spontanen *tick-over* durch eine Wechselwirkung eines PRR mit einem PAMP eine positive regulatorische Reaktion erfolgt, die die Stabilität der C3-Konvertase begünstigt (48). Das im Plasma befindliche Properdin weist gegenüber C3bBb eine ausgeprägte Affinität auf. Sobald es seine Substrate erkennt, stabilisiert es die C3-Konvertase C3bBb (C3bBbP) um das 5- bis 10-fache, führt dadurch zu vermehrter Bildung von C3b und erleichtert die Bindung von C3b als Opsonin an der Zieloberfläche (64, 65, 48). Außerdem erkennt Properdin das Pathogen- oder *Damage-associated molecular pattern* (DAMP) (65), wodurch es als Trigger des alternativen Aktivierungsweges Potential bietet (64). Ricklin *et al.* spricht dem alternativen Aktivierungsweg zudem eine wichtige Rolle hinsichtlich der Bereitstellung von C5-Konvertasen zur Bildung des Membranangriffskomplex (*Membrane Attack Complex*; MAC) zu, indem hier die notwendigen C3b Moleküle gebildet werden (52).

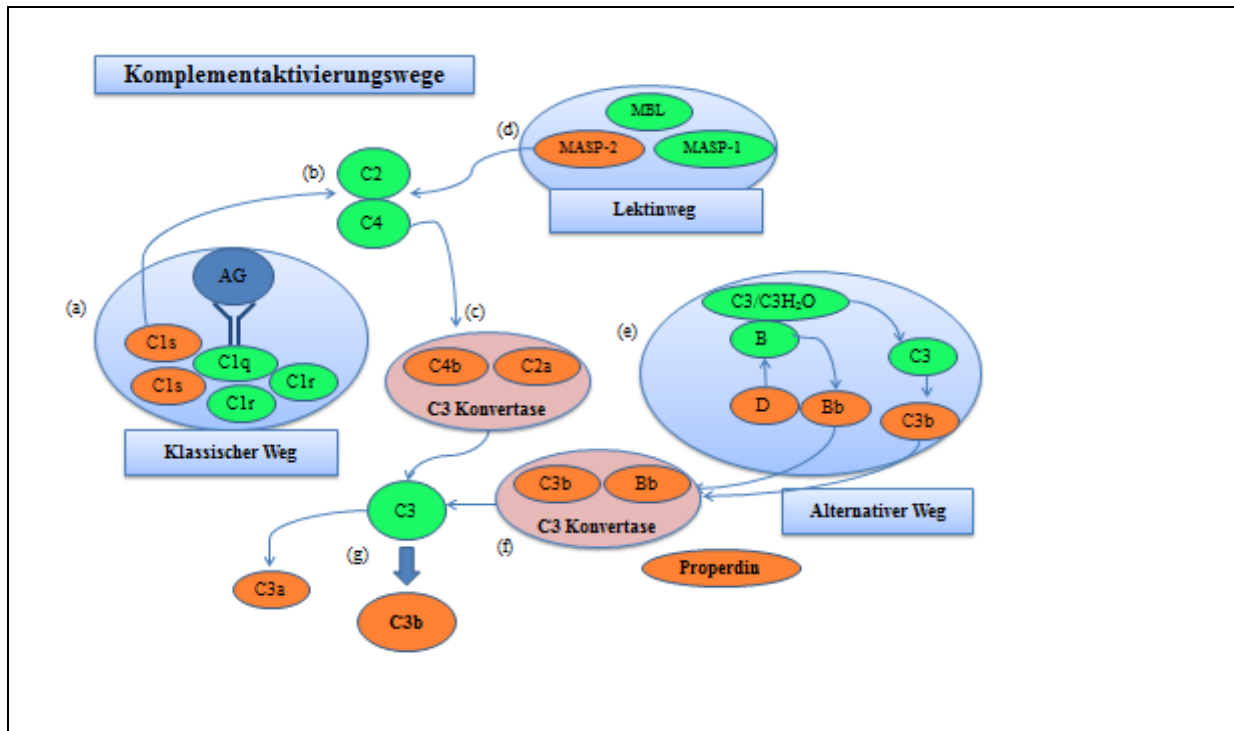


Abb. 1 Schematische Darstellung der Aktivierung des Komplementsystems modifiziert nach (44)

(a) Die Aktivierung des klassischen Weges erfolgt durch Bindung der Komplementkomponente C1q des Komplementfaktors (C) C1 an einen Antigen-Antikörper-Komplex, worauf dessen autokatalytische Eigenschaft eine zweite Komponente von C1, nämlich C1s, aktiv wird und zur Spaltung von C2 und C4 befähigt ist (b). (c) Die Spaltprodukte C2a und C4b bilden die zentrale C3 Konvertase C4b2a. (d) Der Lektinweg wird bspw. durch die Bindung des *Pattern recognition receptors* (PRR) MBL (Mannosebindendes Lektin) an mannosehaltigen Kohlenhydraten von Pathogenen induziert. Daraufhin erlangen die MBL-assoziierten Serinproteasen (MASP-1 und MASP-2) katalytische Kompetenz und vermögen ebenso C2 und C4 zu spalten (b) und die C3 Konvertase C4b2a zu generieren (c). (e, f) Der alternative Aktivierungsweg wird durch spontane Hydrolyse von C3 (*tick-over*) aktiviert. C3_{H₂O} wird durch Bindung an Faktor B (C3_{H₂O} B) zum Proenzym für die im Plasma zirkulierende aktive Serinprotease Faktor D generiert, die aus dem Komplex und weiteren C3b Spaltprodukten eine zweite Form der C3-Konvertase, C3bBb bildet. Die in (c) und (f) aktiven Konvertasen spalten nun die zentrale Komponente C3 in das Opsonin C3b, sowie das Anaphylatoxin C3a (g).

1.3.2 Der Membranangriffskomplex

Die Bildung der einzelnen Komplementkomponenten zum Membranangriffskomplex (*Membrane Attack Complex*; MAC) charakterisiert die eigentliche Funktion des Komplementsystems (66). Die Bildung der C5-Konvertase wird durch kovalente Bindung von C3b an C4b2a und C3bBb erreicht (67). Es entstehen C3b₂Bb und C4b2a3b, womit sich die Substratspezifität vom Komplementfaktor C3 auf den Komplementfaktor C5 verlagert (67). Diese C5-Konvertase spaltet nun C5 in C5a, ein potentes Anaphylotoxin im Rahmen der Komplementkaskade sowie C5b, dem initialen Faktor der Polymerisation eines MACs (52, 68). C5b bindet nun zunächst C6 und erfährt dadurch eine Konformationsänderung (52, 68). Hierdurch wird die Ausbildung eines lipophilen Bereichs bewirkt, mit dessen Hilfe es dem Komplex möglich ist, sich in die Lipiddoppelschicht der Zielzelle vorzuschieben (52, 68). An C6 bindet C7 und das ermöglicht

die Bindung von C8 (52, 68). C8 setzt sich aus C8 β und C8 α - γ zusammen, wobei C8 β die Bindung an C5b ermöglicht und C8 α - γ den hydrophoben Teil, der sich ebenso in die Lipiddoppelschicht vorschiebt, darstellt (52, 68). Nun kommt es zur Oligomerisation von 10 bis 16 Einheiten C9, die sich zirkulär um den initialen Komplex anordnen und so eine Pore, den MAC formieren (69, 70). Dieser bricht die Lipidmembran der Bakterien auf und führt so, wahrscheinlich aufgrund einer osmotischen Instabilität aufgrund des Austritts periplasmatischer Proteine der Bakterien via MAC-Pore, zur Lyse des Bakteriums (71).

Abb. 2 veranschaulicht die Bildung des MAC schematisch.

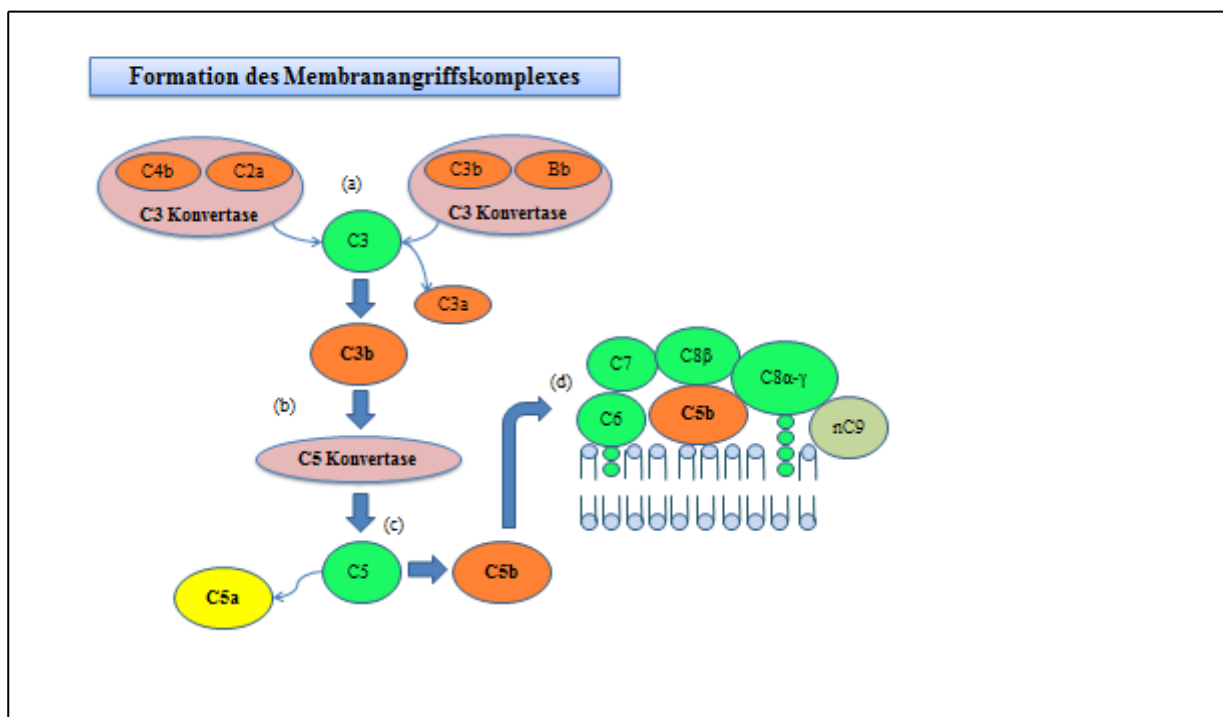


Abb. 2 Schematische Darstellung der Bildung des Membranangriffskomplexes modifiziert nach (44)

(a) Die C3 Konvertasen C4b2a und C3bBb spalten den Komplementfaktor C3 in das Anaphylatoxin C3a und das Opsonin C3b. (b) Durch kovalente Bindung des Spaltprodukts C3b an die C3 Konvertasen entstehen die C5 Konvertasen C4b3b2a und C3b₂Bb, wodurch sich die Affinität des Enzymes von C3 auf C5 verschiebt. (c) Die Spaltung von C5 bewirkt die Freisetzung des hochpotenten Anaphylatoxins C5a und stellt die entscheidende Komponente für die Bildung des Membranangriffskomplexes C5b her. (d) C5b bindet an C6, durch dessen Konformationsänderung erlangt der Komplex lipophile Eigenschaften und schiebt sich in die Biomembran des Pathogens vor. An C6 bindet C7 und bietet so eine Bindungsstelle für den Komplementfaktor C8 β . Die lipophile Komponente C8 α - γ schiebt sich ebenfalls in die Membran des Pathogens. Über die nun folgende Oligomerisation von C9 sowie deren zirkuläre Anordnung am initialen Komplex C5b678 formiert sich die finale Pore des Membranangriffskomplexes (MAC).

Einleitung

1.3.3 Die Rolle des Komplementspaltproduktes C5a

Der Komplementfaktor C5a bzw. C5a_{desArg} ist ein hochpotentes Anaphylatoxin (72, 73). Durch Bindung an seine entsprechenden Rezeptoren C5a-Rezeptor R1 (C5aR1) und C5aR2 werden verschiedene proinflammatorische Signalwege induziert (74, 75, 30, 76–79).

In der frühen Phase der Sepsis werden diese Rezeptoren vermehrt exprimiert, was zu einer chemotaktischen Stimulation der polymorphkernigen Leukozyten (*Polymorphonuclear leukocyte*; PMN) führt (52, 80, 81). Die Interaktion von C5a an C5aR1 induziert die Synthese weiterer proinflammatorischer Zytokine, z.B. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) (82), generiert ROS und trägt so massiv zur Gewebsschädigung bei (31, 80). [1]

Ein weiterer Pathomechanismus von C5a ist durch Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel der direkte Einfluss auf die Erhöhung der vaskulären Permeabilität (83–86). Zudem ist C5a wesentlich an der Dysregulation der Hämostase im septischen Geschehen beteiligt (87, 88). C5a induziert den prokoagulatorischen Gewebsfaktor *tissue factor* (TF) (89–91) und hemmt durch eine gesteigerte Synthese von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) fibrinolytische Regulationsmechanismen (92–94).

Beim kritisch kranken Patienten führen dauerhaft hohe C5a Konzentrationen in der Spätphase der Sepsis über eine Anergie der PMN, aber auch über eine verstärkte Apoptose von B- und T-Zellen zur Immunparalyse (30, 31). [1]

Das Anaphylatoxin C5a stellt in der dysregulierten Immunantwort eine wichtige Schnittstelle dar und bietet adjuvanten Therapien der CAP ein potentielles Zielmolekül.

In verschiedenen experimentellen Modellen werden die Rolle von C5a sowie protektive Effekte der C5a/C5aR-Hemmung thematisiert (76, 95–97). Keshari *et al.* zeigten im tierexperimentellen Modell organprotektive Effekte und eine reduzierte Mortalität im *E. coli* Sepsismodell durch Hemmung der Spaltung von C5 (98). Jedoch gehen C5 Defekte mit einem erhöhten Risiko für Infektionen mit Meningokokken (99) und einer erhöhten Bakterienlast einher (98). Hoehlig *et al.* entwickelten schließlich das enantiomere L-RNA-Aptamer NOX-D20, das hochspezifisch an C5a bindet und damit die Synthese des Membranangriffskomplexes gewährleistet (31, 100). Im Modell der Zaekumligatur und Punktion zeigte sich eine Abschwächung der Inflammation und Reduktion der vaskulären Permeabilität nach Gabe von NOX-D20 (100).

In der vorliegenden Arbeit wird die Hemmung von C5a mittels Neutralisierung durch das weiterentwickelte enantiomere L-RNA-Aptamer NOX-D19 erreicht. Hierbei handelt es sich um ein gespiegeltes L-RNA Aptamer der Länge von 44 Nukleotiden, mit einer Affinität für murines C5a bzw. C5a_{desArg}, im picomolaren Bereich. Damit wird eine hochspezifische Inhibierung der C5a-C5a-Rezeptor-Achse erreicht (101).

1.4 Der beatmungsassoziierte Lungenschaden

Unter beatmungsassoziiierter Lungenschädigung (*Ventilator-induced lung injury*; VILI) versteht man die Schädigung der Lunge infolge einer Inflammationsreaktion, die aufgrund von Dehnungsreizen unter mechanischer Beatmung (*mechanical ventilation*; MV) auftritt (102, 103). Daher spricht man in diesem Zusammenhang von Biotrauma (104, 105). Maßgeblich auslösender Faktor sind unangemessen hohe Tidalvolumina (V_T) (106). Die Reduktion der Tidalvolumina gilt als bisher effektivster Parameter, um die Mortalität beatmeter Patienten mit akutem Lungenversagen (*Acute respiratory distress syndrome*; ARDS) zu senken (107–112). Durch Dehnung werden physikalische Reize in biochemische sowie molekulare Signale umgewandelt, was als Mechanotransduktion bezeichnet wird (113–115). Ein Pathomechanismus beispielsweise ist die Expression des Wachstumsfaktors *Transforming Growth Factor* β (TGF- β), wodurch die Permeabilität der pulmonalvaskulären Barriere erheblich erhöht und eine Translokation von intravasaler Flüssigkeit, Zytokinen und PMN ins Lungeninterstitium bewirkt wird (116–119). Neben einem Lungenödem entwickeln Patienten mit VILI aufgrund der systemischen Inflammation extrapulmonale Organschäden (120, 107, 103, 121, 122). Ranieri *et al.* zeigten in ihrer Arbeit einen direkten Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von beispielsweise Leber- und Nierenversagen und dem Vorkommen der septischen Kardiomyopathie mit inadäquater mechanischer Beatmung (122).

Kommen zur Pathophysiologie des VILI begleitende Faktoren wie eine schwere Pneumonie hinzu, erhöht sich die pulmonalvaskuläre Permeabilität dramatisch, was unsere Arbeitsgruppe in einem vorherigen Modell bereits gezeigt hat (121).

Die Störung der pulmonalvaskulären Permeabilität stellt einen zentralen Mechanismus in der Pneumonie und im VILI dar (121). Da auch eine Aktivierung des Komplementsystems in der mechanischen Beatmung beschrieben ist (105, 119, 123) kann C5a als Anaphylatoxin eine entscheidende Rolle als *Target* einnehmen. Bisher wurde C5a in dieser Konstellation noch nicht untersucht, daher wäre die Auswirkung einer zielgerichteten Neutralisation von C5a im VILI bei Pneumonie von hohem Interesse.

1.5 Hypothese und Ziel dieser Arbeit

Für die schwere CAP sowie die mit ihr assoziierte pneumogene Sepsis gibt es noch keine nachweislich wirksamen adjuvanten Therapien. Hyperinflammation ist ein zentraler Pathomechanismus in der Entstehung von Lungenschaden, VILI und septischem Organversagen in der Pneumonie. C5a als Anaphylatoxin mit mannigfaltiger Verstrickung in der überschießenden Immunreaktion könnte ein potentiell *Target* darstellen. Ziel dieser Dissertation ist es, dies zu überprüfen und einen wichtigen Forschungsbeitrag in der Behandlung der schweren Pneumonie zu leisten.

Es wurden folgende Hypothesen untersucht:

- (1) Die Serumkonzentration von C5a ist bei Patienten mit Pneumonie erhöht.
- (2) Die Serumkonzentration von C5a korreliert mit der Krankheitsschwere der CAP und stellt einen neuen prognostischen Faktor dar.
- (3) Die Neutralisation von C5a stellt in der CAP und pneumogenen Sepsis ein potentiell adjuvantes Therapietarget dar:
 - (3.1) Die Neutralisation von C5a moduliert die Inflammationsantwort.
 - (3.2) Die Neutralisation von C5a hat eine barriereprotektive Wirkung in der murinen Pneumokokkenpneumonie.
 - (3.3) Die Neutralisation des Komplementfaktors C5a schützt vor extrapulmonalem Organversagen.
- (4) Die Neutralisation von C5a bewirkt eine Reduktion von beatmungsassoziiertem Pulmonalschaden.

2 Material und Methoden

2.1 Klinische Studie

Die Quantifizierung der C5a Konzentration in humanen Seren mittels ELISA (s. Abschnitt 2.17) erfolgte aus Serumproben, die vom Kompetenznetzwerk „Ambulant erworbene Pneumonie“ CAPNETZ (Carl-Neuberg-Str. 1; 35625 Hannover) zur Verfügung gestellt wurden. CAPNETZ verfügt seit seiner Gründung 2001 als multizentrische Stiftung mit seither circa 12.000 eingeschlossenen Patienten über eine umfangreiche Daten- sowie Biobank. In CAPNETZ prospektiv erfasst werden Patienten mit einer Röntgen-Thorax gesicherten Diagnose der ambulant erworbenen Pneumonie (124). Weitere Einschlusskriterien sind ein Alter von ≥ 18 Jahren sowie das Vorliegen eines der folgenden Kriterien: positive Anamnese für Fieber $\geq 38,3$ °C, Dyspnoe, Husten, purulentes Sputum oder ein positiver Auskultationsbefund. Ausschlusskriterien sind eine aktive Tuberkulose, Immundefizienz oder das Vorliegen einer nosokomialen Infektion (125). Die Hospitalisierung dieser Patienten erfolgte entsprechend ihres CRB-65 Scores, die Behandlung vollzog sich leitliniengerecht (124). Alle Patientendaten wurden in standardisierten elektronischen *case report forms* (eCRF) erfasst. Die PROGRESS-Studie ist eine der von CAPNETZ organisierten prospektiven, multizentrischen Kohortenstudie zur Identifizierung genetischer und molekularer Marker und umfasst circa 3000 eingeschlossene Patienten (126). Die Datenerhebungen der PROGRESS-Studie wurden von der Ethikkommission der Universität Jena unter der Registrierungsnummer 2403-10/08 bewilligt. Die Entnahme der Proben sowie Erfassung der Patientendaten erfolgte innerhalb von 48 h nach Diagnosestellung.

Dieser Dissertation wurden 395 Patientenserum zur retrospektiven Auswertung zur Verfügung gestellt, die in den Jahren 2009 bis 2014 zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses gewonnen wurden.

Vergleichend wurden 24 Seren gesunder Probanden untersucht, die im Rahmen von Routinekontrollmessungen anonymisierter Blutspender im Zeitraum 2009 bis 2012 gewonnen wurden. Deren Datenverarbeitung wurde von der lokalen Ethikkommission bewilligt.

Vorab erfolgte eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten, ihrer gesetzlichen Vertreter bzw. der Probanden der gesunden Kontrollgruppe.

2.2 Aufbereitung der L-RNA Aptamere

Die L-RNA Aptamere sowie die 5%-ige Glukosevehikellösung wurden von der NOXXON Pharma AG (Dr. Axel Vater; Max-Dohrn-Str. 8-10, 10589 Berlin) bezogen. Die L-RNA Aptamere (Lot A75886), NOX-D19 genannt, wurden bei ≤ -20 °C in einer Konzentration von 2 mg/mL in steril filtrierter, endotoxinfreier 5%-iger Glukoselösung für Injektionszwecke (B. Braun Melsungen AG, Heidelberg) gelagert. Die Konzentration wurde von NOXXON UV-absorptionsspektroskopisch verifiziert. Die Verarbeitung und Aufbewahrung der Lösungen erfolgte entsprechend den Anweisungen der NOXXON Pharma AG. Der Hersteller gibt eine Stabilität der L-RNA Aptamere über 5 Auftau- und Einfrierperioden an. Für die Versuchsserien wurde die Lösung bei Raumtemperatur, ohne Zuführung weiterer Wärmeenergie von außen, aufgetaut und anschließend gevortext.

Basierend auf vorherigen Studienergebnissen der Firma NOXXON Pharma AG wurde eine Konzentration der Spiegelmere NOX-D19 von 20 mg/kg Körpergewicht (KG) gewählt (100). Für die Berechnung der notwendigen Konzentration wurde das mittlere Gewicht eines Versuchstieres auf 22 g festgelegt. Unter Sterilbedingungen wurden 220 μ L der Stammlösung in ein Eppendorfgefäß (SafeSeal Reagiergefäß 0,5 mL, Sarstedt, Nümbrecht) aliquotiert. Unter Beachtung des Totvolumens des Spritzenstempels befanden sich 350 μ L Gesamtvolumen in den Aliquots.

Für die Kontrollgruppe wurden entsprechend den oben genannten Bedingungen 350 μ L der Vehikellösung, bestehend aus 5%-iger Glukoselösung für Injektionszwecke (B. Braun; Lot NOX-R0180), aliquotiert. Alle so befüllten Eppendorfgefäße wurden bei -20 °C bis zu den jeweiligen Infektionsdurchgängen aufbewahrt.

2.3 Herstellung der Nährmedien

Die Anzucht der Pneumokokken für die Infektionsserien erfolgte in einem speziell angesetzten Nährmedium. Hierfür wurden 30 g Bacto™ Todd Hewitt-Bouillon (THY, BD Bioscience, Heidelberg) mit 5 g Bacto™ Technischem Hefeextrakt (THY, BD Bioscience, Heidelberg) in 1 L destillierten Wasser mittels eines Magnetrührers (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim) in Lösung gerührt. Anschließend wurde die klare goldgelbe Lösung in verschraubbare Laborflaschen gefüllt und bei 115 °C für 10 min autoklaviert. Des Weiteren wurde diesem Nährmedium für die Erregeranzucht 10% fetales Kälberserum (FCS, PAA Laboratories GmbH, Österreich) zugesetzt, welches zuvor auf Vorrat aufbereitet wurde. FCS wurde zunächst bei 56 °C

für 30 min hitzeinaktiviert. Dieser Schritt war beispielsweise zur Einschränkung etwaiger Komplementbindungsaktivität von Bedeutung. Anschließend wurde das FCS unter der Sterilbank (Herasafe™, Thermo Fisher Scientific, USA) in 50 mL Falcons (Falcon®, Corning Science México S.A. de C.V., México) aliquotiert und bei –20 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Für den Ansatz des Anzuchtmediums wurde dieses entsprechend vorbereitete FCS aufgetaut und steril gefiltert (Rotilabo® Spritzenfilter Carl Roth GmbH + CO, KG Karlsruhe). Die nun vorrätige gebrauchsfertige Lösung konnte bei –4 °C gelagert werden.

2.4 Herstellung eines Stammstocks

Für die Versuchsreihe wurde zunächst ein neuer Arbeitsstock aus dem Stammstock *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 3 NCTC („National Collection of Type“) 7978 angelegt. Hierfür wurden auf Columbia-Blutagarplatten, mit 5% Schafblutzusatz (BD Bioscience, Heidelberg), jeweils 3 Verdünnungsausstriche mittels steriler Einwegimpfösen (1 µL Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) angelegt. Die Agarplatten wurden über einen Zeitraum von 9 bis 10 h im Brutschrank in feuchter 5%-iger CO₂-Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden mehrere Einzelkolonien mit einer Impföse abgetragen und erneut in Reinkultur mit mehreren Verdünnungsausstrichen auf Blutagarplatten aufgebracht und nochmals über einen Zeitraum von 9 bis 10 h im Brutschrank inkubiert. Schließlich wurden alle Einzelkolonien mit einem angefeuchteten sterilen Wattestäbchen abgetragen und mit 1,5 mL Gefriermedium, bestehend aus 80% sterilem Todd-Hewitt + 0,5% Yeast (THY) und 20% Glycerol, resuspendiert und in einem Kryoröhrchen (Mikrovette®, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) bei –80 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.5 Anzucht Pneumokokken für die Versuchsserien

Für die Einzelversuche wurde der beschriebene Arbeitsstock mittels steriler Einwegimpfösen (1 µL Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) auf Columbia-Blutagarplatten ausgestrichen und über 9 bis 10 h im Brutschrank unter feuchter 5%-iger CO₂ Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden mehrere Einzelkolonien mit sterilem Wattestäbchen abgenommen und in einem zuvor hergestellten Nährmedium, bestehend aus 18 mL THY und 2 mL fetalem Kälberserum, resuspendiert. Die Anzahl der in das Medium eingeführten Pneumokokken ist durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm mittels Photometer (UVIKON xs, Biotek Instruments, Bad Friedrichshall) gegen einen Leerwert aus Nährmedium bestimmt worden und wurde bei einer optischen Dichte (OD) von 0,03 bis 0,04 eingestellt. Das Medium wurde anschließend im Was-

Material und Methoden

serbad bei 37 °C für weitere 2 h inkubiert. In Vorversuchen wurde eine entsprechend reproduzierbare Wachstumskurve durch Kontrollmessungen in 30-minütigem Abstand erstellt, so dass in allen Folgeversuchen das Wachstum in der exponentiellen Phase, die sich bei einer OD von 0,3 bis 0,4 befand, durch 10 minütige Zentrifugation bei 3100 rpm (Megafuge® 1.0R Heraeus Instruments GmbH, Hanau) unterbrochen wurde. Eine OD von 0,1 entsprach hier einer Bakterienkonzentration von $1 \cdot 10^8$ koloniebildenden Einheiten (KBE). Durch Ermittlung des Anfangsvolumens sowie Messung des Zentrifugatvolumens wurde unter Einbeziehung der jeweilig gemessenen OD in mehreren Verdünnungsschritten mit sterilem PBS (Dulbecco's without Ca & Mg (1X) PAA Laboratories GmbH, Österreich) eine Infektionsdichte von $5 \cdot 10^6$ KBE/mL hergestellt. Die Bakterienkonzentration wurde in jeder Infektionsserie durch Ausplattierung einer Kontrollplatte mit Hilfe einer entsprechenden Verdünnungsreihe überprüft. Die Ablesung erfolgte nach 24-stündiger Bebrütung bei oben genannten Konditionen.

2.6 Versuchstiere und Tierhaltung

In der NOXXON Versuchsreihe wurden 8 bis 10 Wochen alte weibliche Wildtyp (wt)-Mäuse des Stammes C57Bl/6N mit einem mittleren Körpergewicht von 18 bis 22 g verwendet. Diese Tiere wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) eigens für Tierversuche gezüchtet. Eine entsprechende Genehmigung für die Versuchsdurchführung war vom LAGeSo Berlin unter der Nummer A 0290/11 erfolgt.

Die Tiere wurden unter Beachtung des Tierschutzgesetzes und der Richtlinien der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde) in speziell ventilierten Käfigsystemen mit Filterdeckel (Typ II-L, Ehret, Emmendingen, Deutschland) gehalten. Diese waren mit sterilem Standardeinstreu sowie sterilisiertem Nestbaumaterial ausgelegt. Pelletfutter und Wasser wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Käfige befanden sich in einem für Infektionsversuche zugelassenen Raum für versuchsbezogene Tierhaltung der Medizinischen Klinik (G0114/01 und ZH167).

Hier war ein 12-stündiger Tag-Nacht-Wechsel durch eine Zeitschaltuhr gewährleistet. Die Temperatur wurde zwischen 20 bis 24 °C und die relative Luftfeuchtigkeit bei 45 bis 65% konstant gehalten und täglich kontrolliert. Des Weiteren wurden die Tiere in die entsprechenden Versuchsgruppen randomisiert und in dieser Formation strikt separiert von den jeweils anderen Gruppen gehalten.

2.7 Infektion der Versuchstiere

Für den Infektionsvorgang wurden die Tiere unter der Sterilbank aus dem Käfig genommen, alle Arbeitsschritte erfolgten in streng steriler Vorgehensweise. Vor Versuchsbeginn wurde die

Körpertemperatur mittels einer speziellen Rektalsonde für Mäuse (Microprobe RET 3 for mouse, WPI Berlin) gemessen und das Körpergewicht in einem entsprechend vorbereiteten Wägebehälter bestimmt. Schließlich wurden die Tiere für den Infektionsvorgang analgosediert. Hierfür wurde ein Gemisch, bestehend aus 80 mg/kg KG Ketamin (Ketavet Injektionslösung 100mg/mL, Pfizer, Berlin) und 25 mg/kg KG Xylazin (Rompun 2% Injektionslösung, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) in isotonischer Kochsalzlösung (Natriumchloridlösung, 0,9%; Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg) als Trägerlösung, verwendet und der Maus intraperitoneal verabreicht. Bis zum Erreichen einer ausreichenden Sedierungstiefe wurden die Tiere reizgemindert aufbewahrt. Anschließend wurden die Tiere aus der Aufbewahrung genommen.

Die Sedierungstiefe wurde mittels Bauchhaut- und Zwischenzehenreflex überprüft. Anschließend wurde die in Abschnitt 2.2 beschriebene Studienmedikation entsprechend der Versuchsgruppzugehörigkeit (s. Tab. 8) *intraperitoneal (i.p.)* appliziert. Danach wurde den Tieren zum Schutz der Kornea Thilo-Tears® Augengel (Alcon Pharma GmbH, Freiburg) auf die Augen aufgetragen und sie wurden für den Infektionsschritt an einer besonderen Haltevorrichtung an ihren oberen Schneidezähnen fixiert. Nun erfolgte die Applikation der in Abschnitt 2.5 hergestellten Bakteriensuspension. Hier wurde jedem Tier pro Nasenloch 10 µL dieser Suspension verabreicht, was einer Infektionsdosis von $5 \cdot 10^6$ KBE/mL entsprach. Die Kontrollgruppe wurde in gleicher Weise sediert, anstelle der Bakteriensuspension wurden dann jeweils 10 µL PBS (Dulbecco's without Ca & Mg (1X) PAA Laboratories GmbH, Österreich) pro Nasenloch appliziert. Abschließend wurden die Tiere wieder in ihre Käfige verbracht und während der Aufwachphase für 1 h unter Rotlicht gewärmt. Hiernach wurden die Käfige wieder in den Tierstall gebracht.

2.7.1 Beobachtungsinstrumente der Pneumokokkenpneumonie

Der klinische Verlauf der Pneumokokkenpneumonie wurde mittels Messung von Körpergewicht und Temperatur zum Zeitpunkt der Infektion sowie ab 24 h *post infectionem (p.i.)* in 12-stündigem Abstand wiederholt gemessen und dokumentiert. Des Weiteren wurden die Tiere entsprechend den Empfehlungen des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter in ihrem Verhalten und ihrem Allgemeinzustand beobachtet und in einem entsprechenden *Scoresheet* zur Einschätzung infizierter Tiere beurteilt. Beobachtungspunkte waren beispielsweise der Grad der Aktivität, Trink-, Fress- sowie Sozialverhalten und Änderungen der Atmung (s. Tab. 7). Diese Parameter wurden auf einer Skala von 0 (fehlend); 1 (vorhanden) und 2 (schwer) bewertet und addiert. Im Falle eines schweren Krankheitsbildes vor Erreichen des sachlichen

Material und Methoden

Versuchsendpunktes, musste der Versuchsleiter informiert und der Versuch entsprechend den Abbruchkriterien der Tierschutzbeauftragten mittels intraperitonealer Applikation von 160 mg/kg KG Ketamin und 75 mg/kg KG Xylazin und anschließender zervikaler Dislokation abgebrochen werden.

Tab. 7 Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung von Versuchstieren modifiziert nach (127)

Tiernummer: Versuchsbeginn: Ausgangsgewicht:	
Tag seit Versuchsbeginn:	
<u>Symptome</u>	Kat.
<u>Keine Symptome</u>	A
<u>Beobachtung in Ruhe im Käfig</u>	
Tier isoliert sich	A
Struppiges/ ungepflegtes Fell	A
Aufgetriebener Leib	A
Kot abweichend in Farbe, Konsistenz	A
Atmung normal (A); beschleunigt, flach (B); schwerfällig, stark pumpend (C)	A/B/C
Schmerzen (gekrümmte Haltung oder Leib aufgezogen, Laufen auf Zehenspitzen)	B
Krustige Belege am Augenrand; eingesunkene, trübe Augen	B
Blässe (Augen, Ohren)	B
Blut an Körperöffnungen, Blut an Kot	B
Krämpfe, Torkeln	B
Paresen	B
Paralysen (Tier kann aus eigener Kraft Wasser und Futter nicht mehr erreichen)	C
<u>Beim Umsetzen</u>	
Verletzung/ Hautveränderungen	A
Fehlstellung der Zähne	A
Reaktionsminderung auf äußere Reize	A
Ruhelosigkeit	A
<i>Circling</i>	A
Stelzgang	A
Lokale äußere sichtbare Infektionen	A
Abszesse	B
Leib hart oder gespannt	B
Stehende Hautfalten	B
Ödembildung	B

Automutilation	B
Schmerzen beim Anfassen	B
Moribund	C
Leib hart und aufgetrieben	C
<u>Körpertemperaturbestimmung [°C]</u>	
Hypothermie	B
<u>Körpermassebestimmung [m]</u>	
Ungewöhnliche Zunahme	B
Abnahme von 10% oder mehr im Vergleich zur Körpermasse von nichtinfizierten Kontrollgruppen	B
Abnahme von 20% oder mehr im Vergleich zur Körpermasse von nichtinfizierten Kontrollgruppen	C

Die Versuchstiere wurden zweimal täglich entsprechend der in der Tabelle dargestellten Kriterien beurteilt. Die Kriterien A-C dienen der Identifizierung schwer kranker Tiere mit der Konsequenz, Tiere der Symptomenschwere C unverzüglich schmerzlos mittels einer Überdosierung an Ketamin und Xylazin über intraperitoneale Injektion zu töten. Symptome der Kategorie B in Kombination mit Torkeln, Schmerzen oder Blässe erzwangen ebenfalls die sofortige Tötung. Bei Symptomen der Kategorie A wurde das Tier weiter beobachtet.

2.7.2 Einschlusskriterien für das Vorliegen einer Pneumokokkenpneumonie

Als Einschlusskriterien für das Vorliegen einer Pneumonie beim Versuchstier wurden eine Körpertemperatur von $< 36\text{ °C}$ und eine Gewichtsabnahme von $\geq 10\%$ innerhalb von 24 h definiert.

2.8 Applikation von humanem Serumalbumin

Einen wichtigen Teil dieser Dissertation stellt die Untersuchung der Störung der alveolokapillären Schrankenfunktion dar. Hierfür wurde ein humaner Proteinmarker, das humane Serumalbumin (HSA), verwendet. Den Tieren wurde entsprechend der Versuchsprotokolle in Abschnitt 2.9.2 und 2.10.2 zu einem definierten Zeitpunkt 1 mg pyrogenfreies HSA in sterilem 0,9%-igen NaCl diluiert (Human Albumin Baxter 200 g/L, Baxter AG, Wien) *i.v.* verabreicht. Die Dosis wurde auf ein Volumen von 75 μL in eine 1 mL Spritze aufgezogen. Aufgrund von Unterschieden bezüglich des Applikationsortes sowie weiteren Prozederes wird die HSA-Gabe in den Abschnitten 2.9.3 und 2.10.3 gesondert aufgeführt.

2.9 Neutralisation von C5a im Modell der murinen pneumogenen Sepsis

2.9.1 Versuchsgruppen

Die Infektionsversuche wurden entsprechend der in Tab. 8 aufgeführten Versuchsgruppen durchgeführt.

Tab. 8 Versuchsgruppen der tierexperimentellen Untersuchungen zum therapeutischen Effekt von NOX-D19 in der Pneumokokken-induzierten Pneumonie und Sepsis

Infektion	Studienmedikament	n	Behandlungszeitpunkt t [h] <i>p.i.</i>	Versuchsendpunkt t [h] <i>p.i.</i>
PBS Scheininfektion	Glu	13	0	24
<i>S. pneumoniae</i>	Glu	13	0	24
<i>S. pneumoniae</i>	Glu	13	0; 24	48
<i>S. pneumoniae</i>	NOX-D19	13	0	24
<i>S. pneumoniae</i>	NOX-D19	13	0; 24	48

Transnasal mit *S. pneumoniae* infizierte C57Bl/6N Versuchstiere erhielten zum Zeitpunkt null (Versuchsbeginn) die Behandlung mit Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. einer 5%-igen Glukoselösung (Glu). Die Tiere mit dem Versuchsendpunkt 24 h *post infectionem* (*p.i.*) wurden einmal zum Infektionszeitpunkt entsprechend ihrer Gruppenzuordnung behandelt. Versuchstiere mit dem Versuchsendpunkt bei 48 h erhielten ihre Studienmedikation zweimal: zum Infektionszeitpunkt und 24 h *p.i.* Eine weitere Gruppe wurde ebenfalls transnasal mit *S. pneumoniae* infiziert und jeweils zum Infektionszeitpunkt bzw. zum Infektionszeitpunkt und 24 h *p.i.* mit einer 5%-igen Glukosekontrolllösung (Glu), die in der Wirkstoffgruppe als Vehikellösung genutzt wird, behandelt. Eine PBS-kontrollinfizierte Gruppe, der ausschließlich die 5%-ige Glukosebehandlung zukam, wurde ebenfalls untersucht. Der Versuchsendpunkt dieser Gruppe wurde auf 24 h *p.i.* festgelegt (s. Abb. 3). Weitere Abkürzungen: n Gruppengröße.

2.9.2 Studiendesign

Die Behandlung der Tiere erfolgte jeweils zum Zeitpunkt der Infektion, was in der veranschaulichenden Abb. 3 dem Zeitpunkt $t = 0$ h entspricht. Hierfür wurden die Spiegelmeraliquots unmittelbar vor der Infektion aus dem Gefrierschank genommen, bei Raumtemperatur aufgetaut, vorsichtig gevortext und in eine 1 mL Spritze (Omnifix®-F 1 mL, Braun Melsungen AG, Melsungen) aufgezogen. Es wurde ein Volumen von 220 μ L *i.p.* appliziert. Entsprechend der Versuchsgruppenzuordnung erhielten die Tiere nach Applikation des Analgosedativums und Wägung das Spiegelmer NOX-D19 oder die 5%-ige Glukosekontrolllösung. Daraufhin wurden die Tiere wie in Abschnitt 2.7 beschrieben, infiziert.

Das Modell der murinen pneumogenen Sepsis wurde in 2 Entnahmezeitpunkten untersucht. Der erste Versuchsendpunkt befand sich bei 24 h *p.i.* In dieser Gruppe erfolgte die *i.v.* Gabe der HSA-Lösung zum Zeitpunkt 23 h *p.i.* Ein weiterer Endpunkt wurde für 48 h nach Infektion festgelegt. Diese Gruppe erhielt eine zweite *i.p.*-Applikation der Studienmedikation zum Zeitpunkt 24 h. Die Gabe von HSA bei den Tieren mit dem Versuchsendpunkt bei 48 h erfolgte zum Zeitpunkt 47 h nach Infektion. Die Versuche wurden zum Zeitpunkt 24 h, bzw. 48 h entsprechend der Gruppenzuordnung beendet. Abb. 3 veranschaulicht das Infektions- und Behandlungsschema sowie die HSA-Applikationszeitpunkte der Gruppen.

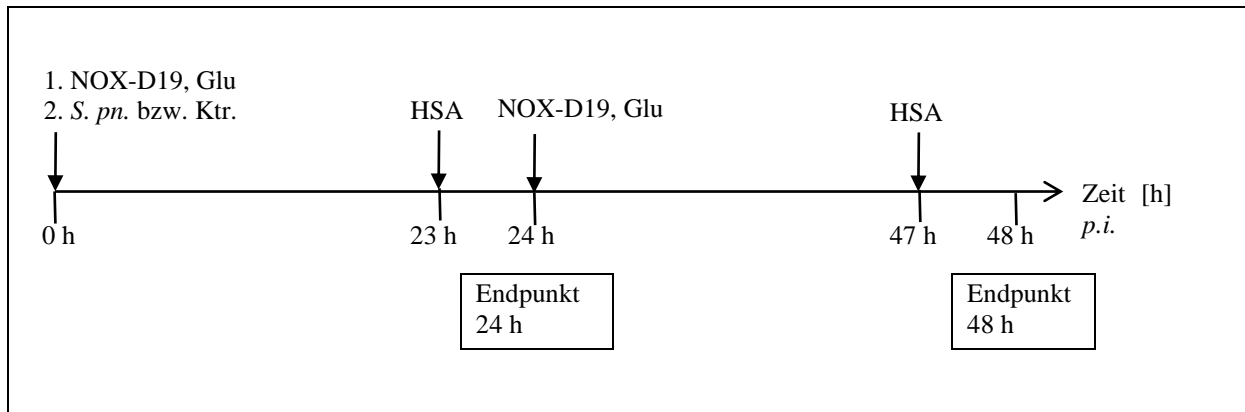


Abb. 3 Versuchsaufbau und Studienmedikationsschema

C57Bl/6N-Versuchstiere erhielten zum Zeitpunkt null (Versuchsbeginn) die Behandlung mit Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG), bzw. einer 5%-igen Glukoselösung (Glu). Darauffolgten wurden die Tiere mit $5 \cdot 10^6$ KBE *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Kontrollinfizierte Tiere (Ktr.) erhielten eine transnasale Kontrollinfektion mit PBS. Versuchstieren mit dem Versuchsendpunkt 24 h wurde zum Zeitpunkt 23 h *p.i.* intravenös HSA appliziert und der Versuch nach 1 h beendet. Mäuse, die 48 h *p.i.* untersucht wurden, erhielten ihre jeweilige Behandlung ein zweites Mal zum Zeitpunkt 24 h *p.i.* Die HSA-Gabe erfolgte 47 h *p.i.* Weitere Abkürzungen: HSA humanes Serumalbumin, *p.i.* post infectionem.

2.9.3 Präparation und Probengewinnung

Zum Zeitpunkt 23 h *p.i.* erfolgte für die spätere Erfassung der pulmonalvaskulären Barrierestörung die Applikation von 1 mg HSA in die Schwanzvene. Hierfür wurden die Tiere einzeln in eine eigens dafür vorgesehene Fixiervorrichtung verbracht, die den Zugang zur Schwanzvene ermöglichte. Anschließend wurde der Schwanz mittels einer Rotlichtlampe in einem Abstand von 15 cm für 1 min hyperämisiert und schließlich mit einer 26G-Kanüle (Braun Melsungen AG, Melsungen) punktiert. Dann wurde das HSA appliziert und die Tiere wieder zurück in den Käfig gesetzt. Zum Versuchsendpunkt erfolgte bei jedem Tier nochmals Wägung und Temperaturmessung sowie klinische Beurteilung des aktuellen Status. Anschließend wurde das Tier durch *i.p.* Applikation von 90 μ L Narkosegemisch, bestehend aus 1,6 mg Ketamin (Ketavet Injektionslösung 100mg/mL, Pfizer, Berlin) und 0,5 mg Xylazin (Rompun 2% Injektionslösung, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) analgosediert. Nach einer mittleren Wirkdauer von 5 bis 10 min wurde die Narkosetiefe durch den Zwischenzehenreflex getestet, dann konnte das Tier ventralseitig mit Braunol® 7,5% (B. Braun, Melsungen) steril abgewaschen werden. Anschließend wurde das Versuchstier in Rückenlage auf einer Unterlage aus Styropor fixiert. Über einen medianen Hautschnitt am Hals erfolgte die Freilegung der Trachea. Unterhalb des Larynx wurde zirkulär um die Trachea eine Ligatur vorgelegt. In dieser Höhe erfolgte eine quer verlaufende Inzision zwischen den Knorpelspannen, um die Trachea für den Intubationsschritt mit einer Trachealkanüle (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) zu eröffnen. Die Tracheal-

Material und Methoden

kanüle konnte nun mit der vorgelegten Ligatur befestigt werden. Die Beatmung des Tieres erfolgte mittels eines Beatmungsgerätes für Kleinnager (MiniVent, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) mit einem V_T von 150 μL bei einer Atemfrequenz von 150/min. Hieraufhin wurde durch eine mediane Laparotomie die Bauchhöhle eröffnet, durch Querlaparotomie das *Ligamentum falciforme* aufgesucht und an dessen Verlauf cranial zur Leber das Diaphragma eröffnet. Nun konnten mit einer 27G-Kanüle (BD Mircrolance™ 3, 27G, BD Bioscience, Heidelberg) 50 μL Heparin, das entsprach 625 I.E. (25.000 I.E./mL, Ratiopharm 1:1 mit 0,9%-iger Natriumchloridlösung, Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg) in den rechten Ventrikel des Herzens injiziert werden. Nach einer Zirkulationszeit von 2 min wurde die *Vena renalis sinister* freigelegt und mit der gleichen 27G-Kanüle punktiert. Die Kanülenspitze wurde vorsichtig Cava-wärts geschoben, anschließend wurde das Blut vorsichtig aus dem Blutkreislauf in die aufgesetzte 1 mL Spritze (Omnifix®-F 1 mL, Braun Melsungen AG, Melsungen) aspiriert, was zu einem sofortigen Tod des Versuchstieres, durch Eintritt eines Herz-Kreislaufstillstandes, führte. Schließlich konnte das Diaphragma vollständig vom Rippenbogen abpräpariert und der Thorax durch mediane Sternotomie eröffnet werden. Die Thoraxhälften wurden für eine bessere Übersicht der Organe seitlich fixiert. Es erfolgte die Darstellung der herznahen Arterien durch Abpräparation des Thymus. Nach Abtrennung der Herzspitze und Eröffnung beider Herzventrikel wurde eine Pulmonalisarterienkanüle (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) über den rechten Ventrikel in die *Arteria pulmonalis* vorgeschoben und mittels einer zuvor dorsal um die *Arteria pulmonalis* positionierten Ligatur fixiert. So wurde das pulmonale Gefäßbett *post mortem* durch einminütige Spülung mit steriler eisgekühlter 0,9%-iger Natriumchloridlösung (Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg) und einem Fluss von 1 mL/min, aufrechterhalten durch eine Pumpe (Perestaltikpumpe, Ismatec® Reglo-Analog, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH) blutleer gespült. Anschließend konnte nach Diskonnection vom Beatmungsgerät die bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) über die Trachealkanüle durchgeführt werden. So wurden beide Lungenhälften zweimal mittels 800 μL eiskaltem PBS mit Zusatz eines Proteaseinhibitors (Complete™ Mini, Roche Diagnostics GmbH Mannheim) langsam gespült. Anschließend wurden Lunge, Leber, Milz, Nieren und *Ileum* sorgsam und steril entnommen. Alle Proben wurden bis zum Präparationsende auf Eis zwischengelagert und anschließend zügig hintereinander verarbeitet. Eine Niere sowie die Organe Leber und *Ileum* wurden teils in 4%-iges Formaldehyd verbracht und kühl gelagert, teils bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ für weitere Untersuchungszwecke eingefroren.

2.10 Neutralisation von C5a im *double-hit* Modell der pneumogenen Sepsis und beatmungsassoziierten Lungenschaden

2.10.1 Versuchsgruppen

Die Versuche des *double-hit*-Modells, also die Untersuchung des therapeutischen Effektes von NOX-D19 im beatmungsassoziierten Lungenschaden in einer Pneumokokken-induzierten Pneumonie und Sepsis wurden in den Versuchsgruppen entsprechend der Tab. 9 durchgeführt.

Tab. 9 Versuchsgruppen der tierexperimentellen Untersuchungen zum therapeutischen Effekt von NOX-D19 im *double-hit*-Modell

Infektion	Studienmedikament	n	Behandlungszeitpunkt t [h]	Ventilation für t = 6 h	Versuchsendpunkt
PBS Schein-Infektion	<i>Baseline</i> Glu	5	23 h	nicht ventiliert	30 h
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Baseline</i> Glu	5	23 h	nicht ventiliert	30 h
PBS Schein-Infektion	Glu	11	23 h	ventiliert	30 h
<i>S. pneumoniae</i>	Glu	11	23 h	ventiliert	30 h
<i>S. pneumoniae</i>	NOX-D19	11	23 h	ventiliert	30 h

Untersuchung der Neutralisation von C5a im Modell des beatmungsassoziierten Lungenschadens bei Vorliegen einer pneumogenen Sepsis. Transnasal mit $5 \cdot 10^6$ KBE *S. pneumoniae* infizierte, bzw. PBS-kontrollinfizierte C57Bl/6N Versuchstiere erhielten zum Zeitpunkt 23 h *post infectionem* (*p.i.*) die Behandlung mit dem Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. einer 5%-igen Glukoselösung (Glu). Zum Zeitpunkt 24 h *p.i.* wurden die Versuchstiere für eine Dauer von 6 h am MiniVent® ventiliert. Es wurden 2 nicht-ventilierte Kontrollgruppen (*Baseline*) mitgeführt. Eine *Baseline*-Gruppe wurde transnasal PBS-kontrollinfiziert, eine weitere *Baseline*-Gruppe mit *S. pneumoniae*. Die Therapie aller Gruppen erfolgte zum Zeitpunkt t= 23 h. Die finale Untersuchung erfolgte für alle Versuchstiere zum Zeitpunkt t= 30 h *p.i.* (s. Abb. 4, Abb. 5). Weitere Abkürzungen: n Gruppengröße.

2.10.2 Studiendesign

Die Versuchstiere der Beatmungsexperimente wurden entsprechend Abschnitt 2.7 mit $5 \cdot 10^6$ KBE *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert bzw. PBS-kontrollinfiziert. Gemäß ihrer Versuchsgruppenzuordnung erhielten sie zum Zeitpunkt 23 h *p.i.* die jeweilige NOX-D19 (20 mg/kg KG) oder 5%-ige Glukoselösung. PBS-infizierte Tiere erhielten ausschließlich 5% Glukose. Exakt 24 h nach Infektion wurden die Tiere, wie in Abschnitt 2.9.3 beschrieben, präpariert. Nach einem initialen Rekrutierungsmanöver mit einem Atemwegsdruck von 35 cmH₂O über die Dauer von 5 sec schloss sich die MV über einen Zeitraum von 6 h an. Die Beatmungsparameter wurden auf ein V_T von 12 mL/kg KG, einer Atemfrequenz von 120/min, einen positiven endexpiratorischen Druck (*positive end-expiratory pressure*; PEEP) von 2 cmH₂O, einem Inspirations:Expirationsverhältnis (I:E Ratio) von 1:1, und einer

Material und Methoden

inspiratorischen Sauerstofffraktion (FiO_2) von 0,75 festgelegt. 90 min vor Erreichen des Versuchsendpunktes erfolgte die HSA-Gabe carotidal. 5 min vor Versuchsende schloss sich ein erneutes Rekrutierungsmanöver an. Zum Zeitpunkt 30 h *p.i.* wurde der Versuch schließlich beendet, es folgte die finale Präparation. In dieser Versuchsreihe wurden zudem nicht-ventilierte Tiere mitgeführt, deren Versuchsendpunkt sich ebenfalls bei 30 h *p.i.* befand. Sie wurden ebenfalls *S. pneumoniae*- bzw. PBS-infiziert, erhielten allerdings beide zum Zeitpunkt 23 h *p.i.* eine 5% Glukose-Kontrollbehandlung. Nach Beurteilung der Klinik wurden sie zum Zeitpunkt 24 h *p.i.* zunächst zurück in den Käfig verbracht, erhielten 29 h und 20 min nach Infektion 1 mg HSA und zum Zeitpunkt 30 h *p.i.* die abschließende Präparation sowie Rekrutierungsmanöver. Abb. 4 und Abb. 5 stellen den zeitlichen Verlauf dieses Versuchsaufbaus dar.

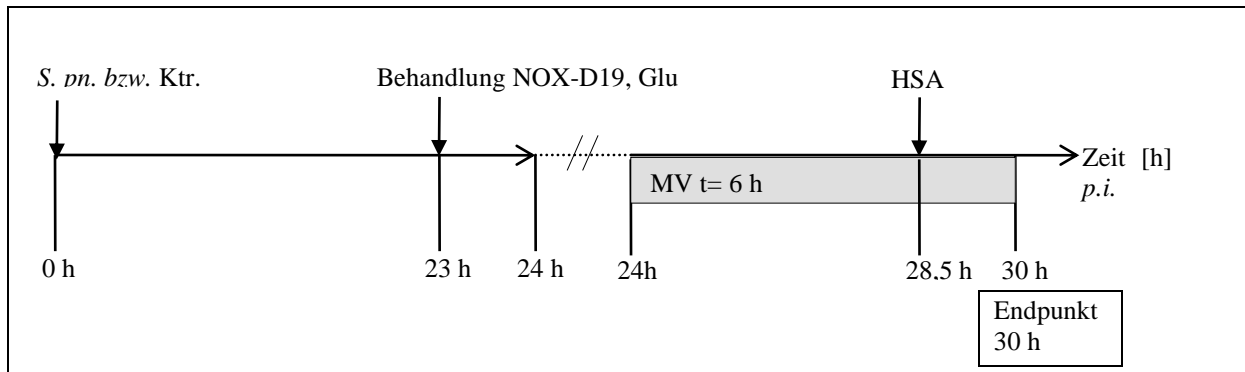


Abb. 4 Versuchsaufbau und Studienmedikationsschema VILI

Untersuchung der Neutralisation von C5a im Modell des beatmungsassoziierten Lungenschadens bei Vorliegen einer Pneumokokken-induzierten Pneumonie. C57Bl/6N-Versuchstiere erhielten zum Versuchsbeginn (0 h) transnasal $5 \cdot 10^6$ KBE *S. pneumoniae* (*S.pn.*), bzw. eine PBS-Kontrollinfektion (Ktr.). Zum Zeitpunkt 23 h *p.i.* wurden die Tiere mit dem Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG), bzw. mit einer 5%-igen Glukoselösung (Glu) behandelt. 24 h *p.i.* wurden die Versuchstiere für eine Dauer von 6 h am MiniVent® ventilert. (Parameter: Tidalvolumen= 12 mL/kg KG, Atemfrequenz= 120/min, *positive end-expiratory pressure* (positiver end-expiratorischer Druck; PEEP)= 2 cm H₂O, inspiratorische Sauerstofffraktion FiO_2 = 0,7). Die HSA-Applikation erfolgte 90 min vor Versuchsende, der Versuchsendpunkt wurde auf 30 h *p.i.* festgelegt. Abkürzungen: HSA humanes Serumalbumin, MV *mechanical ventilation*, mechanische Beatmung, *p.i. post infectionem*.

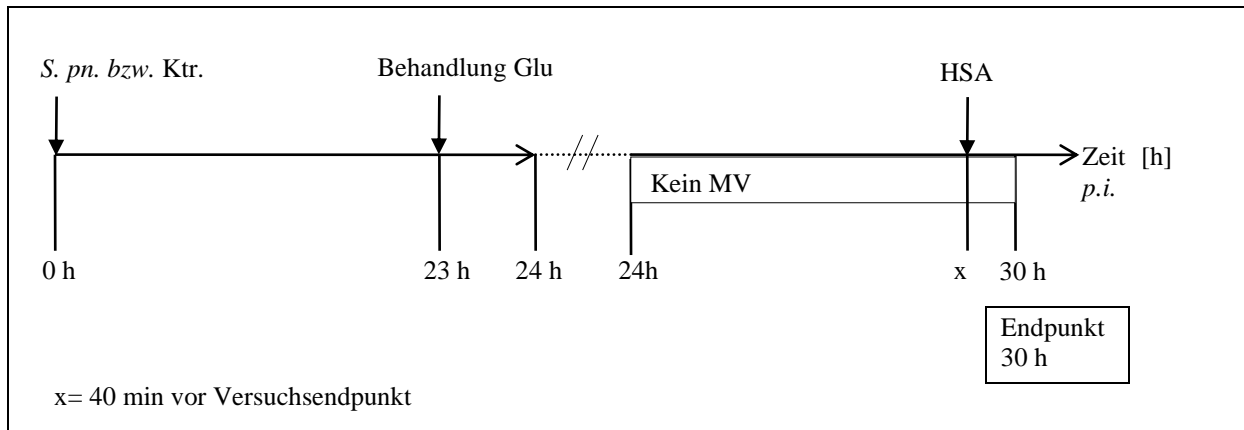


Abb. 5 Versuchsaufbau und Studienmedikationsschema VII nicht ventilierte Kontrollgruppen
 Untersuchung der Neutralisation von C5a im Modell des beatmungsassoziierten Lungenschadens bei Vorliegen einer Pneumokokken-induzierten Pneumonie. Darstellung der nicht-ventilierten Kontrollgruppen (*Baseline*). C57Bl/6N Versuchstiere erhielten zum Versuchsbeginn 0 h transnasal $5 \cdot 10^6$ KBE *S. Pneumoniae* (*S.pn.*) bzw. eine PBS-Kontrollinfektion (Ktr.). Zum Zeitpunkt 23 h p.i. wurden die Tiere mit einer 5%-igen Glukoselösung (Glu) behandelt. Die Ventilation entfiel für diese Tiere. 40 min (x) vor Versuchsende wurde HSA appliziert, der Versuchsendepunkt wurde auf 30 h p.i. festgelegt. Abkürzungen: HSA humanes Serumalbumin, MV *mechanical ventilation*, mechanische Beatmung, p.i. *post infectionem*.

2.10.3 Kalibration, Präparation, Parameter Beatmung und Probengewinnung

Zum Zeitpunkt 23 h p.i. wurden das Körpergewicht sowie mittels Rektalsonde für Mäuse (Microprobe RET 3 for mouse, WPI Berlin) die Körpertemperatur des Versuchstieres bestimmt. Daraufhin wurde das Tier entsprechend seiner Versuchsgruppenzuordnung (Abschnitt 2.10.1) via *i.p.* Injektion mit der entsprechenden Studienmedikation behandelt und nochmals zurück in den Tierkäfig verbracht. Exakt 24 h p.i. erhielt das Tier über *i.p.* Applikation ein Narkosegemisch, bestehend aus 0,05 mg/kg KG Fentanyl (Fentanyl® Janssen 0,5 mg/10 mL, Janssen-Cilag GmbH, Neuss), 5 mg/kg KG Midazolam (Dormicum® 5 mg/ 1 mL, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen) und 0,5 mg/kg KG Medetomidin (Cepetor® 1 mg/mL, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf). Das Versuchstier wurde bis zum Erreichen einer ausreichenden Sedierungstiefe in einem speziellen Behälter lichtgeschützt und reizgemindert aufbewahrt. Die Narkosetiefe wurde anhand des Bauchhaut- sowie Zwischenzehenreflexes evaluiert. Zu Beginn der Präparation wurde das Tier in Rückenlage auf einer Wärmematte (Hugo Sachs Elektronik Havard Appartus, March- Hugstetten) platziert und mit Klebestreifen fixiert. Über eine mit der Wärmematte gekoppelte rektale Temperatursonde (Hugo Sachs Elektronik Havard Appartus, March-Hugstetten) erfolgte eine kontinuierliche Messung der Körpertemperatur und stetige Gegenregulation der Wärmematte zur Erhaltung einer stabilen Körpertemperatur bei 37 °C. Das Tier wurde am Hals mit Braunol® 7,5% (B. Braun, Melsungen) steril abgewaschen. Hier erfolgte ein medianer Hautschnitt und nun schloss sich die Präparation der Trachea, deren

Material und Methoden

Inzision und die intratracheale Intubation mit einer Trachealkanüle (Hugo Sachs Harvard Appartus, March-Hugstetten) an. Das Versuchstier wurde nun von einem speziellen Beatmungsgerät für Kleinstnager (Minivent®, Hugo Sachs Harvard Apparatus, March-Hugstetten) ventiliert. Beginnend mit einem Rekrutierungsmanöver durch schrittweise Erhöhung des PEEP auf 35 cmH₂O für einen Zeitraum von 5 sec, wurden kollabierte Lungenareale eröffnet, die inspiratorische Kapazität und die I:E Ratio der Lunge auf einen bestmöglichen Ausgangspunkt gebracht. Nun wurden die so genannten *Snap Shots* durchgeführt, um die Ausgangswerte der Kompartimentparameter, und zwar die *Compliance*, *Resistance* sowie die *Elastance* für den Versuchsdurchgang zu erfassen. Hierunter sind die Lungendehnbarkeit, der Atemwegswiderstand und der Lungenretraktionsdruck zu verstehen. Die Kalibrierung der Druck-Volumen-Kurve wurde anschließend durchgeführt, um eine mögliche Spontanatmung des Versuchstieres zu erkennen und durch Vertiefung der Sedierung zu vermeiden. Außerdem konnte so der mittlere Atemwegsdruck [cmH₂O] kontinuierlich mitgemessen werden. Sämtliche Kalibrierungsschritte erfolgten nach Herstellerangaben. Anschließend wurde das Tier mit einem Tidalvolumen von 12 mL/kg KG, einer Atemfrequenz von 120/min, einem PEEP von 2 cmH₂O, einer I:E Ratio von 1:1, und einem FiO₂ von 0,75 ventiliert. Zur Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen Flüssigkeitsverlust durch u. a. *Perspiratio insensibilis*, insbesondere über Atmung und Wundflächen oder durch Harnproduktion, wurde eine kontinuierliche Infusion eines Puffers, bestehend aus 9,75 mL Jonosteril® (Fresenius KABI Deutschland GmbH, Bad Homburg) und 0,25 mL Tham Köhler (Tham Köhler 3 M Infusionslösungskonzentrat, Köhler Pharma GmbH, Alsbach - Hähnlein) mit einer Infusionsrate von 350 µL/h gewährleistet. Diese erfolgte über einen in der *Arteria carotis communis sinister* verbrachten Katheter (Luminject® Einmalinjektionskanülen, 31G, Kiel). Hierfür wurde das Gefäßbett freipräpariert, eine Ligatur *distal* der *A. carotis communis*, in Nähe der Carotisgabel, festgezogen und eine lose Ligatur weiter proximal vorgelegt. Mit einer Gefäßklemme (Fine Science Tools® GmbH, Heidelberg) wurde die Carotis nahe ihres Abgangs reversibel verschlossen, um eine Inzision im distalen Bereich, unterhalb der festgezogenen Ligatur ohne Blutverlust durchführen zu können. Hierüber wurde nun die Kathetervorrichtung vorgeschoben und mit der vorgelegten Ligatur fixiert, die Gefäßklemme wurde gelöst. Über diesen Katheter wurde neben kontrollierter Infusion die Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks (Servomed Hellige Oszilloskop; Saarland) ermöglicht. Die Narkoseaufrechterhaltung erfolgte über einen *i.p.* Katheter (BD Neoflon™ 24G, Becton Dickinson, Helsingborg) der mittels Minilaparotomie in der Medianlinie des Abdomens angelegt wurde und damit eine kontinuierliche sowie atraumatische Applikation ermöglichte. Zur Ver-

meidung eines Harnstaus wurde die Harnblase unter zu Hilfenahme einer 24G Venenverweilkanüle (BD Neoflon™, Becton Dickinson, Helsingborg) urethral katheterisiert und der Harn bilanziert. Für die Messung der peripheren Sauerstoffsättigung sowie der Herzfrequenz wurde die Messsonde des Pulsoximeters (MouseOx®, Starr Life Science Corporation, Oakmont, USA) an der Schwanzbasis des Tieres befestigt. Nach Abschluss der Präparation wurden die o. g. Rekrutierungsmanöver nochmals durchgeführt und das Tier anschließend für 6 h, entsprechend den o. g. Einstellungen, ventiliert. Die Parameter mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz, periphere Sauerstoffsättigung, die o. g. Kompartimentparameter *Compliance*, *Elastance* und *Resistance* sowie der mittlere Atemwegsdruck wurden in 10-minütigem Abstand erfasst und dokumentiert. Die Narkosetiefe wurde kontinuierlich anhand Änderungen von Herzfrequenz und Blutdruck sowie auch durch Kontrolle des Zwischenzehenreflexes überwacht. Bei Bedarf erfolgte eine Vertiefung der Narkose durch Nachinjektion des Narkosegemisches mit einer Konzentration von 1/3 der Ausgangsdosis (30 µL). Des Weiteren wurden 2 h nach Versuchstart nochmals 20 µL und anschließend alle 45 min 20 µL des Gemischs verabreicht. 10 min vor Versuchsendpunkt wurden dem Tier nochmals 50 µL Narkosemedikation appliziert, um eine sichere Narkosetiefe zu erreichen. 90 min vor Versuchsendpunkt wurde dem Versuchstier 1 mg HSA in 75 µL 0,9% NaCl über den Carotiskatheter verabreicht und 5 min vor Versuchsende 100 µL Heparin (Heparin 5000 IE/mL), dies entsprach 50 IE intraarteriell, über den gleichen Zugangsweg injiziert. Anschließend wurde das Tier exakt 6 h nach Beginn der Ventilation durch vollständige Blutentnahme über den Carotiskatheter getötet. Das Blut wurde in einer 1 mL Spritze zunächst auf Eis zurückgestellt. Abschließend wurden nochmals o. g. Rekrutierungsmanöver durchgeführt. Nun schloss sich, mit kleineren Änderungen, die in Abschnitt 2.9.3 beschriebene Präparation an. Das Versuchstier wurde median laparotomiert, durch Querlaparotomie das *Ligamentum falciforme* aufgesucht, um das Diaphragma für das Lungengewebe atraumatisch zu eröffnen und vom Rippenbogen abzupräparieren. Schließlich wurde der Thorax durch mediane Sternotomie eröffnet, die Thoraxhälften seitlich fixiert. Es erfolgte die Darstellung der herznahen Arterien durch Thymektomie. Nach Abtrennung der Herzspitze und Eröffnung beider Herzventrikel wurde eine Pulmonalisarterienkanüle (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) über den rechten Ventrikel in die *Arteria pulmonalis* vorgeschoben und mittels einer zuvor dorsal um die *Arteria pulmonalis* positionierten Ligatur fixiert. So wurde das pulmonale Gefäßbett *post mortem* durch einminütige Spülung mit steriler eisgekühlter 0,9%iger Natriumchloridlösung (Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg) und einem Fluss von 1 mL/min, aufrechterhalten durch eine Pumpe (Peristaltikpumpe, Ismatec® Reglo-Analog, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH) blutleer gespült. Im Unterschied zur Präparation bei den

Material und Methoden

Pneumonieversuchen wurde nun der linke Hauptbronchus mit einer Ligatur versehen, die linke Lunge abgetrennt und in sterilem PBS und schließlich bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für weitere DNA-Extraktionsschritte im Rahmen anderer Projekte aufbewahrt. Anschließend konnte nach Diskonnektion vom Beatmungsgerät die BAL über die Trachealkanüle durchgeführt werden. Die rechte Lungenhälfte wurde nun 4 Mal mit $400\text{ }\mu\text{L}$ eiskaltem PBS mit Zusatz des Proteaseinhibitors (Complete™ Mini, Roche Diagnostics GmbH Mannheim) unter Vorsicht gespült. Die weitere Organentnahme erfolgte entsprechend Abschnitt 2.9.3.

2.11 Leukozytendifferenzierung

2.11.1 Quantifizierung der Gesamtleukozytenzahl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die BALF wurde nach ihrer Gewinnung in zweimal je 5 mL Polypropylen Round-Bottom Tubes (BD Biosciences, Heidelberg) verbracht und bei 2200 rpm , 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Die Überstände wurden behutsam unter Schonung des Zellpellets abpipettiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für weitere Verarbeitungsschritte eingefroren. Die Pellets wurden jeweils mit $450\text{ }\mu\text{L}$ resuspendiert und mit 1 mL PBS gepoolt. Aus dieser Suspension wurden $5\text{ }\mu\text{L}$ Probe entnommen und mit dem gleichen Volumen Methylviolett (Merck, Darmstadt) gefärbt. Hieraus wurde eine Neubauer Zählkammer (Bright Line, LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf) befüllt. Unter dem Mikroskop (Axioskop, Zeiss Deutschland) wurden bei 40-facher Vergrößerung $4\cdot 16$ Kleinstquadrate ausgezählt. Die Verdünnungsschritte wurden mit der Berechnungsformel [Zählergebnis $\div (4 \cdot 2 \cdot 10.000)$] berücksichtigt und so die Gesamtleukozytenzahl berechnet. Anschließend erfolgte die Umrechnung auf die Zellzahl/mL.

2.11.2 Fluorescence-activated cell sorting (FACS) in der BALF

Für die durchflusszytometrische Messung der Leukozytensubpopulationen wurden 300.000 Zellen gefärbt. Durch Entnahme des entsprechenden Volumens aus der Gesamtleukozytensuspension konnten diese gewonnen werden. Die Leukozyten wurden mit PBS überschichtet und so einem Waschvorgang unterzogen. Die Leukozytensuspension wurde schließlich bei 1500 rpm bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet resuspendiert und mit $2\text{ }\mu\text{L}$ Fc-Block (BD Biosciences, Heidelberg), das entspricht einer Konzentration für $1\cdot 10^6$ Zellen, für 10 min auf Eis abgedunkelt inkubiert. In dieser Zeit wurde der Mastermix, bestehend aus je $3\text{ }\mu\text{L}$ fluoreszenzmarkierten Antikörpern (von BD Biosciences, Heidelberg) GR-1 Phycoerythrin-konjugiert (PE), CD45 Peridinin-Chlorophyll-Protein-konjugiert (PerCP), CD3 Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und F4-80 Allophycocyanin-konjugiert

(APC) in ein 5 mL Polystyren Round-Bottom Tube (BD Biosciences, Heidelberg) vorgelegt. Die Fc-gebundenen Zellen wurden anschließend direkt zum Mastermix hinzugegeben, vorsichtig gevortext und auf Eis lichtgeschützt für 30 min inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Zellen mit 500 µL einer formaldehydhaltigen Lösung (FACSTM Lysing Solution, 1X, BD Biosciences, Heidelberg) für 10 min auf Eis dunkel inkubiert, was zur Fixierung des Farbstoffes führte. Schließlich wurden die Reaktionsgefäße mit Cell Wash (BD Biosciences, Heidelberg) aufgefüllt, so dass ca. 0,5 bis 1 cm Abstand zum Gefäßrand bestand und erneut bei 1500 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand erneut dekantiert. Die Zellpellets wurden nun mit 500 µL Cell Wash resuspendiert und konnten anschließend am BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, Heidelberg) durchflusszytometrisch gemessen werden.

2.11.3 Quantifizierung der Gesamtleukozytenzahl im Blut

Die Leukozytenzahl im Blut wurde mittels BD Trucount™ Tubes (Becton, Dickinson and Company; BD Biosciences; San Jose; USA) gemäß der BD-Vorgaben bestimmt. Die Röhren wurden mit einem weiteren Mastermix aus Antikörpern, bestehend aus jeweils 5 µL der fluoreszenzmarkierten Antikörper (von BD Biosciences, Heidelberg) GR-1 Phycoerythrin-konjugiert (PE), CD3 Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), CD19 Allophycocyanin (APC) sowie je 60 µL Blutprobe befüllt und abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 20 min wurden 450 µL BD-Lyse (FACSTM Lysing Solution, 1X, BD Biosciences, Heidelberg) hinzugegeben und es wurde erneut für 10 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Schließlich wurde die Zellsuspension gut gevortext und für die Messung am BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, Heidelberg) in ein 5 mL Polystyren Round-Bottom Tube (BD Biosciences, Heidelberg) überführt.

2.12 Bestimmung der Bakterienlast

Im Projekt wurde die Bakterienlast in der BALF, im Blut und auch in der Milz bestimmt. Blut und BAL konnten nach der Gewinnung sofort weiterverarbeitet werden. Hier wurde unter streng sterilen Bedingungen eine Verdünnungsreihe mittels PBS in den Verdünnungsstufen 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10.000 angelegt. Die Verdünnungen und eine unverdünnte Probe wurden anschließend in einem Volumen von je 10 µL auf separaten Columbia Blutagarplatten mit 5% Schafblut dünn ausplattiert.

Die Milz wurde nach Entnahme zunächst in einem Counter-Gefäß mit sterilem PBS befüllt auf Eis aufbewahrt. Nach Präparationsende wurde die Milz samt PBS-Lösung durch ein BD Fal-

Material und Methoden

con™ Zellsieb (100 µm, BD Bioscience, Heidelberg) fein zerdrückt. Die nun vorliegende Suspension wurde mit weiterem PBS auf ein Gesamtvolumen von 20 mL aufgefüllt. Anschließend wurde aus diesem Spezimen nun die oben beschriebene Verdünnungsreihe hergestellt, die wie beschrieben weiter ausplattiert werden konnte.

Nach einer Inkubation von 18 h bei 37 °C und 5% CO₂ konnten die koloniebildenden Einheiten (KBE) ausgezählt werden. In die Auswertung kamen die Blutplatten, auf denen weniger als 50 KBE/Platte wuchsen. Unter Beachtung des vorherigen Verdünnungsschrittes sowie des Probenvolumens wurde dann die entsprechende Bakterienlast berechnet.

2.13 Quantifizierung der Zytokine

Das proinflammatorische Zytokinprofil wurde sowohl im Blut als auch in der BALF mittels Bio-Plex Pro™ Assays (Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA) gemessen. Sowohl im Modell der murinen Pneumonie als auch im Modell des beatmungsassoziierten Lungenschadens wurden die Zytokine CXCL1 (*Chemokine C-X-C Motif Ligand 1*; ehem. *KC keratinocyte-derived cytokine*), CCL3 (*Chemokine C-C Motif Ligand*, ehem. *MIP1- α macrophage inflammatory protein 1- α*), IL-1 β , IL-6, G-CSF (*growth colony-stimulating factor*) sowie IL-10 mittels Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Gruppe I und CXCL2 (ehem. *MIP2- α macrophage inflammatory protein 2- α*) mittels Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Gruppe II gemessen.

Nach Gewinnung der BALF wurde diese bei 1.011 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß bei –80 °C bis zur Durchführung des Bio-Plex Pro™ Assays aufbewahrt.

Das Blut wurde unmittelbar nach Probengewinnung mit 1.520 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und das Plasma im Folgenden in ein 0,5 mL Eppendorfgefäß bei –80 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Standardverdünnungen und Handhabung der Proben sowie sämtliche Arbeitsschritte erfolgten streng nach den Anleitungen der Herstellerfirma. Die Messung wurde schließlich am Bio-Plex Array Reader (Bio-Rad Laboratories, Inc, Kalifornien, USA) vorgenommen. Die Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung des zugehörigen Handbuches Version 4.2.2.

2.14 Beurteilung der pulmonalvaskulären Permeabilität

Der Funktionsverlust der Blut-Luft-Schranke wurde anhand eines Konzentrationsquotienten, gebildet aus der Albuminkonzentration in der BALF und entsprechender Konzentration im Blutplasma, abgeleitet. Hierfür wurde den Versuchstieren, wie in den Abschnitten 2.9.3 und

2.10.3 beschrieben, 1 mg HSA *i.v.* appliziert. Zur Durchführung des ELISAs wurden entsprechende Proben nun auf Eis aufgetaut und mittels human Albumin ELISA Quantation Set (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) entsprechend den Herstellerangaben verarbeitet. Alle Standards und Proben wurden in Doppelbestimmung aufgetragen und schließlich gemittelt. Die optische Messung bei 450 nm erfolgte mittels Anthos Mikroplatten Photometer (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) sowie zugehöriger Software WinRead (Anthos, Krefeld). Die Auswertung wurde mit Hilfe der Standardkurve unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungen durchgeführt.

2.15 Laborchemische Messung von AST und Harnstoff

Die Parameter Aspartat-Aminotransferase (AST) und Harnstoff stellen wichtige Messgrößen zur Beurteilung eines Organschadens, auch im Rahmen der Sepsis, dar (30). Die AST wurde durch das Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH im Routine-Labor mittels IFCC-Tests mit Pyridoxalphosphat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) am Cobas®6000 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bestimmt.

Harnstoff wurde mittels kolorimetrischen Testsystems mit Endpunktbestimmung Urea CT FS (Diagnostic Systems GmbH, Holzheim) gemessen. Die Durchführung des Tests erfolgte entsprechend den Herstellerangaben, die Werte wurden in Doppelbestimmung und bei einer optischen Dichte von 578 nm mittels Photometer (UVIKON xs, Biotek Instruments, Bad Friedrichshall) gegen den Leerwert gemessen. Anschließend wurde der Mittelwert berechnet.

2.16 Immunhistochemische Färbung der Leber

Im Rahmen der Endpräparation der Versuchstiere wurden die Leberproben in 4%-igem Formaldehyd fixiert. Die weitere Verarbeitung wurde von Prof. Dr. med. Thomas Tschernig (Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Kirrberger Str. 100, 66424 Homburg/Saar) vorgenommen. Die Gewebeproben wurden in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden 2 µm dünne Schnitte gewonnen. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Färbung von Fibrin und Caspase 3a sowie die Gegenfärbung mittels Hämalun. Klassifiziert wurden die immunhistochemischen Färbungen nach einem Punktesystem: 0= keine Färbung, 1= positive Färbung.

2.17 Quantifizierung des Komplementfaktors C5a

Die Quantifizierung des murinen Komplementfaktors C5a bzw. C5a_{desArg} wurde mittels Biacore™ basiertem *Binding Assay* (Biacore 2000 instrument; GE Healthcare, Munich, Germany) aus heparinisiertem, murinen Plasma durchgeführt.

Die Quantifizierung des humanen Komplementfaktors C5a bzw. C5a_{desArg} erfolgte aus den Patientenseren mittels ELISA (human C5a ELISA kit HK349; Hycult, Uden, Netherlands). Beide Testsysteme wurden durch die NOXXON Pharma AG (Dr. Axel Vater; Max-Dohrn-Str. 8-10; 10589 Berlin) durchgeführt.

2.18 Statistische Analyse

Sämtliche statistische Datenanalysen wurden mittels GraphPad Prism® 6.05 (Graphpad Software Incorporated, San Diego, California, USA) durchgeführt. Die Daten wurden als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung oder Boxplots inkl. Median, Quartilen und der Datenausreißer, markiert durch offene Kreise, angegeben. Als primärer Endpunkt wurde die Lungenpermeabilität definiert, alle anderen Parameter wurden als sekundäre Endpunkte festgelegt. Zur statistischen Analyse der Gruppen wurde der *two-tailed* Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni Korrektur für nicht normal verteilte Daten herangezogen. Signifikanzen wurden bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen. Für die statistische Analyse von mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen wurde der *one-way* ANOVA-Test sowie die Korrektur nach Sidak für multiple Vergleiche verwendet. Auch hier wurden Signifikanzen bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen. Entsprechende Verfahren sind in den Graphen des Ergebnisteils vermerkt.

Die C5a Spiegel der PROGRESS-Studie wurden mittels *two-tailed* Mann-Whitney-U-Test mit denen der gesunden Probanden verglichen und die Hodges-Lehmann-Mediandifferenz und ihr 95%-iges Konfidenzintervall berechnet. C5a Werte innerhalb der Patientengruppe wurden mittels *two-tailed* T-Test verglichen. Mittels gemischter linearer Modellanalyse wurden zufällige Fehler über den Studienzeitraum (Batch-Effekt) eliminiert. Für Korrelationen wurde die Rangkorrelation nach Spearman, inklusive Bonferroni Korrektur, verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Die ambulant erworbene Pneumokokkenpneumonie führt zu erhöhten Konzentrationsspiegeln des Anaphylatoxins C5a

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Konzentrationsspiegel des Komplementfaktors C5a und C5a_{desArg} aus humanen Seren bestimmt. Es wurden insgesamt 395 Patienten mit ambulant erworbener Pneumokokkenpneumonie eingeschlossen. Die Charakteristika der Patienten der PROGRESS-Studie sind in Tab. 10 dargestellt.

Das Alter der Patienten betrug im Median 62 Jahre, mit einem Interquartilenabstand von 46 bis 73 Jahren. 66% der Patienten waren männlichen Geschlechts.

In der ambulant erworbenen Pneumonie bestanden erhöhte Serumspiegel des Komplementfaktors C5a im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (s. Abb. 6). Dabei erreichte die erkrankte Gruppe Konzentrationsspiegel von 6,3 nmol/L [3,9-10,0]; Median [25-75% Interquartilenabstand], verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe, die Konzentrationen von 4,5 nmol/L [3,8-6,6], Median [25-75% Interquartilenabstand] aufwies.

Es konnten keine Unterschiede der C5a Konzentrationen zwischen Patienten mit oder ohne MV gefunden werden. Zudem bestand keine Korrelation der C5a-Spiegel mit der klinischen Krankheitsschwere, gemessen an den in Tab. 10 und Tab. 12 genannten Scores, bzw. dem Vorkommen von Sepsis oder septischen Schock (s. Tab. 11). Dennoch zeigte sich eine positive Korrelation der C5a Spiegel mit den Konzentrationen von C-reaktiven Protein (CRP), Procalcitonin (PCT) und IL-6 (s. Tab. 12).

Tab. 10 Patientencharakteristika und klinische Parameter der PROGRESS-Studie

Parameter/Charakteristika	Progress Patienten (n=395)	Gesunde Kontrollen (n=24)
Mittleres Alter, Jahre, (Median), (IQA)	62 (46-73)	58 (53-62)
Geschlecht, männlich/weiblich	237/158	12/12
CRP, mg/L, Median (IQA)	174 (97.7-249)	
Leukozyten, Zellen/nL, Median (IQA)	11.7 (9-16.6)	
Harnstoff, mmol/L, Median (IQA)	6 (4.15-8.8)	
PCT, ng/mL, Median (IQA)	0.3 (0.115-3.14)	
Klinikaufenthalt, Tage, Median (IQA)	8 (6-12)	
Klinik, ja/nein, Anzahl n		
Verwirrtheit	30/285	
Atemfrequenz > 30 Atemzüge/min	69/194	
PaO ₂ /FiO ₂ , mmHg, Median (IQR)	252 (190-322)	
Mechanische Ventilation, j/n, n	25/291	
Systolischer Blutdruck < 90 mmHg bzw. Diastolischer Blutdruck < 60 mmHg, j/n, n	83/304	
Vorherige Antiinfektiva, j/n, n	57/338	
CRB-65, 0/1/2/3/4, n	153/168/58/15/1	
CURB-65, 0/1/2/3/4, n	130/124/90/39/11/1	
PSI, 1/2/3/4/5, n	86/91/82/92/44	
SOFA, Median (IQR)	3 (2-4)	
Sepsis (SOFA ≥ 2), j/n, n	314/81	
Septischer Schock, j/n, n	8/387	
Multilobuläre Infiltrate, j/n, n	170/219	

Die Kohorte der PROGRESS-Studie umfasste Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie, die fortlaufend innerhalb 48 h nach Diagnosestellung und Klinikeinweisung eingeschlossen wurden. Klinische Daten waren nicht von allen Patienten verfügbar: Verwirrtheit (315/395), Atemfrequenz > 30/min (263/395), mechanische Ventilation (316/395), systolischer Blutdruck < 90 mmHg oder diastolischer Blutdruck < 60 mmHg (387/395), multilobuläre Infiltrate (389/395).

Abkürzungen: CRP C-reaktives Protein, C(U)RB-65 *confusion, urea, respiratory rate, blood pressure*, Alter ≥ 65 Lebensjahre, IQA Interquartilenabstand, PCT Procalcitonin, PSI *Pneumonia Severity Index*, SOFA *Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment*. [1]

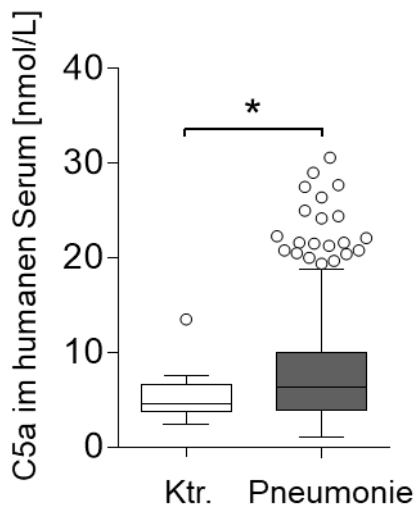


Abb. 6 Humane C5a Spiegel in der ambulant erworbenen Pneumokokkenpneumonie

C5a sowie C5a_{desArg} wurden in 395 Seren von Patienten mit CAP (*Community-acquired pneumonia*) mittels Biacore™ basiertem *Binding Assay* bestimmt. Vergleichend wurde C5a, bzw. C5a_{desArg} von 24 gesunden Probanden untersucht (Ktr. Kontrolle). Die Seren der CAP Patienten wurden innerhalb von 48 h nach Diagnosestellung bis zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses in die prospektive, multizentrische PROGRESS-Studie gewonnen. Die Kontrollseren stammten aus Routinekontrollblutentnahmen anonymisierter Blutspender. Die Daten sind in Form von Box-Plots dargestellt mit Median, Interquartilabstand und Spannweite ohne Ausreißer (offene Kreise). (* $p < 0,05$; Mann-Whitney U-Test). [1]

Tab. 11 C5a Spiegel [nmol/L] in ausgewählten Patientengruppen

Parameter	Ja	Nein	p-Wert
MV	4,49 (3,52-6,91)	6,59 (4,11-9,97)	0,063
Geschlecht männlich	5,97 (3,88-8,99)	6,92 (4,41-11,0)	0,072
Sepsis (SOFA ≥ 2)	6,39 (4,14-9,63)	5,87 (3,88-9,33)	0,25
Septischer Schock	6,44 (4,42-8,42)	6,30 (4,02-9,65)	0,87

C5a sowie C5a_{desArg} wurden in 395 Seren von von Patienten mit CAP (*Community-acquired pneumonia*) mittels Biacore™ basiertem *Binding Assay* bestimmt. Die Seren der Patienten wurden innerhalb von 48 h nach Diagnosestellung bis zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses in die prospektive, multizentrische PROGRESS-Studie gewonnen. Angegeben sind die Daten als Median sowie 25-75% Interquartilabstand. (*two-tailed T-Test*). [1]

Tab. 12 Korrelation C5a Serumspiegel mit klinischen Parametern der PROGRESS-Studie

Funktion Atmung/Gasaustausch	
PaO ₂ /FiO ₂ Ratio	$\rho=0,0158$; $p=0,754$
Atemfrequenz min	$\rho=0,879$; $p=0,109$
Atemfrequenz max	$\rho=0,057$; $p=0,368$
Mechanische Ventilation	$\rho=-0,113$; $p=0,0439$
Extrapulmonale Organfunktion	
GCS	$\rho=0,0351$; $p=0,486$
Kreatinin	$\rho=0,00533$; $p=0,916$
Bilirubin	$\rho=0,0704$; $p=0,163$
Thrombozyten min	$\rho=-0,158$; $p=0,0016$
Mittlerer arterieller Blutdruck	$\rho=-0,118$; $p=0,0219$
Katecholamine	$\rho=-0,051$; $p=0,312$
Laktat	$\rho=0,105$; $p=0,217$
Negativer BE	$\rho=-0,0349$; $p=0,602$
Parameter Inflammation	
PCT	$\rho=0,195$; $p=9,22 \cdot 10^{-5}$
CRP	$\rho=0,307$; $p=4,67 \cdot 10^{-10}$
Leukozyten	$\rho=0,0655$; $p=0,202$
Leukozyten min	$\rho=0,0248$; $p=0,625$
Leukozyten max	$\rho=0,062$; $p=0,221$
Lymphozyten	$\rho=0,0314$; $p=0,635$
Monozyten	$\rho=-0,0411$; $p=0,534$
Neutrophile Granulozyten	$\rho=0,143$; $p=0,2$
Unreife Granulozyten	$\rho=0,239$; $p=0,0549$
Eosinophile Granulozyten	$\rho=-0,0884$; $p=0,195$
Basophile Granulozyten	$\rho=0,00869$; $p=0,9$
IL-6	$\rho=0,254$; $p=3,01 \cdot 10^{-7}$
IL-8	$\rho=0,136$; $p=0,00666$
IL-10	$\rho=0,157$; $p=0,0017$
Körpertemperatur T min	$\rho=0,0678$; $p=0,189$
Körpertemperatur T max	$\rho=0,116$; $p=0,0238$
Klinische Charakteristika	
CRB-65	$\rho=0,0481$; $p=0,340$
CURB-65	$\rho=0,0136$; $p=0,788$
PSI	$\rho=-0,0744$; $p=0,140$
SOFA	$\rho=0,0226$; $p=0,654$
Alter	$\rho=-0,0787$; $p=0,118$

Die Kohorte der PROGRESS-Studie umfasst Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie, die fortlaufend innerhalb 48 h nach Diagnosestellung und Klinikeinweisung eingeschlossen wurden. Es wurden entsprechende klinische Parameter und Charakteristika erhoben und mit den C5a Serumspiegeln korreliert. Angegeben sind der Spearman Korrelationskoeffizient ρ sowie entsprechende p-Werte. Fett markierte Werte zeigen nach Bonferroni Korrektur signifikante Korrelationen.

Abkürzungen: BE *Base excess*, CRP C-reaktives Protein, GCS *Glasgow Coma Scale*, IL Interleukin, max maximum, min minimum, PCT Procalcitonin. [1]

3.2 Die Pneumokokkenpneumonie mit pneumogener Sepsis führt zu einem signifikanten Anstieg der C5a Spiegel

Innerhalb von 24 h *p.i.* stiegen die Konzentrationen für C5a sowohl im Blutplasma als auch in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) (s. Abb. 7), verglichen zur PBS-kontrollinfizierten Gruppe, an. Die maximalen Konzentrationen für C5a bestanden 24 h *p.i.* und nahmen 48 h *p.i.* wieder ab. Nach 48 h zeigten sich im Plasma dennoch weiterhin erhöhte Werte von C5a, verglichen zur Kontrollgruppe.

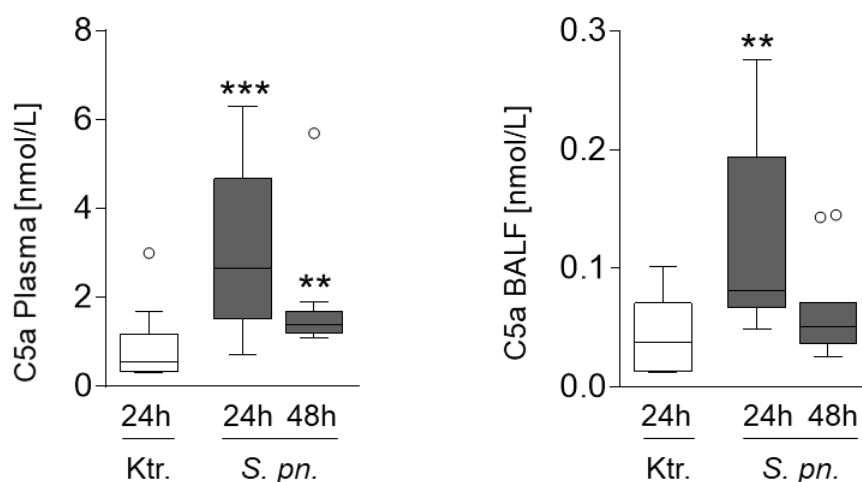


Abb. 7 C5a Spiegel in Plasma und BALF im Modell der murinen Pneumonie und Sepsis

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S.pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h erhielten die Versuchstiere 5% Glukoselösung *intraperitoneal*, sie wurden zum Zeitpunkt 24 h *post infectionem* (*p.i.*) untersucht. Mäuse, die 48 h *p.i.* untersucht wurden, erhielten ihre Behandlung ein zweites Mal zum Zeitpunkt 24 h *p.i.* Mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS) kontrollinfizierte und kontrollbehandelte Tiere (Ktr.) erhielten ebenfalls zum Infektionszeitpunkt eine Behandlung mit 5% Glukoselösung, sie wurden 24 h *p.i.* untersucht. Die Konzentrationsbestimmung von C5a sowie C5a_{desArg} aus Plasma und der (BALF) erfolgte 24 und 48 h *p.i.* in *S. pn.* infizierten 5% Glukose kontrollbehandelten Versuchsgruppen und der PBS-kontrollinfizierten Versuchsgruppe. Die Daten sind in Form von Box-Plots dargestellt mit Median, Interquartilabstand und Spannweite ohne Ausreißer (offene Kreise). (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ vs. PBS-Kontrolle; Mann-Whitney U-Test mit Bonferroni Korrektur für multiple Vergleiche). [1]

3.3 Die Pneumonie als lokale Inflammation

3.3.1 Die Neutralisation des Komplementfaktors C5a führt in der Pneumokokkenpneumonie zu einer Reduktion der pulmonalvaskulären Permeabilität

Die Pneumokokkenpneumonie bedingt eine Schädigung des funktionellen Lungengewebes auf mikrovaskulärer und epithelialer Ebene. Die Quantifizierung des Schadens erfolgte durch die Ermittlung des Quotienten aus der Konzentration von HSA in der BALF und der entsprechenden Konzentration im Plasma. Die Schädigung des Lungengewebes geht mit einer Erhöhung der pulmonalvaskulären Permeabilität einher und spiegelt sich im Anstieg des Quotienten wider. Innerhalb von 24 h nach Infektion war bereits ein minimaler Defekt der pulmonalvaskulären Barriere zu verzeichnen. 48 h *p.i.* zeigte sich eine ausgeprägte Hyperpermeabilität in der kontrollbehandelten infizierten Gruppe. Die Behandlung mit dem L-RNA Aptamer NOX-D19 führte nach 48 h zu einer Reduktion der pulmonalvaskulären Permeabilität (s. Abb. 8).

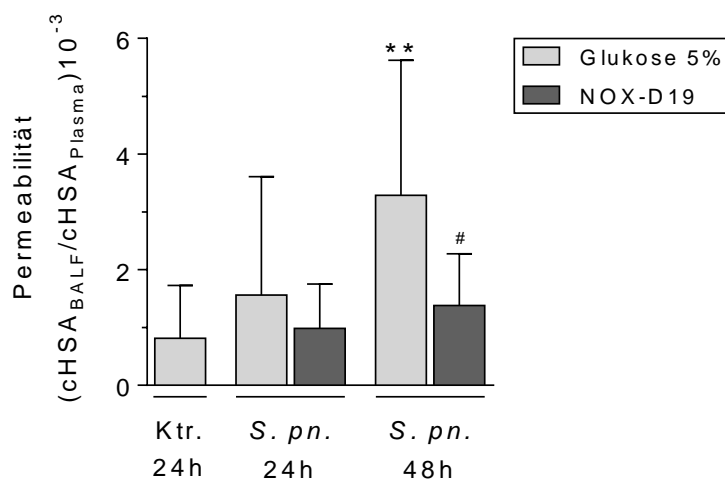


Abb. 8 Pulmonalvaskuläre Permeabilität der Lunge

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das L-RNA Aptamer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intraperitoneal*. Es wurde eine PBS-kontrollinfizierte, 5% Glukose behandelte Gruppe mitgeführt. Die *intravenöse* Applikation von humanem Serumalbumin (HSA) erfolgte 23 h oder 47 h *p.i.* Die Konzentration von HSA wurde zu den Versuchsendpunkten 24 h und 48 h per ELISA im Blutplasma und in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) gemessen. Der Quotient aus der HSA Konzentration in der BALF ($cHSA_{BALF}$) und der HSA Konzentration im Plasma ($cHSA_{Plasma}$) wurde als Marker für die pulmonalvaskuläre Permeabilität berechnet. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (** $p < 0,01$ vs. PBS-Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. *S. pneumoniae*-infizierte, glukosebehandelte Gruppe; *one-way* ANOVA und Korrektur für multiples Testen nach Sidak). [1]

3.3.2 Die Neutralisation des Komplementfaktors C5a reduziert die Krankheitsschwere der murinen Pneumokokkenpneumonie

Mit NOX-D19 behandelte, infizierte Tiere zeigten einen deutlich gebesserten Allgemeinzustand, gemessen am klinischen Score (s. Abb. 9).

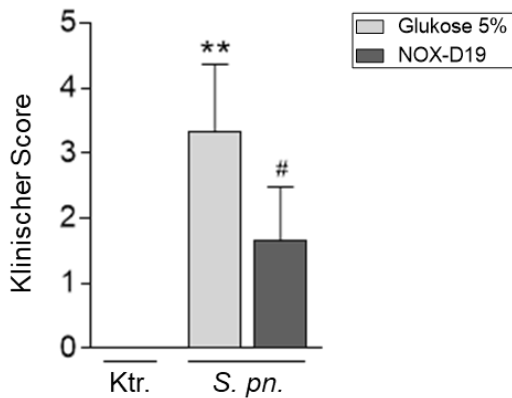


Abb. 9 Klinischer Score murine Pneumokokkenpneumonie

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das L-RNA Aptamer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intraperitoneal*. Es wurde eine PBS-kontrollinfizierte, 5% Glukose behandelte Gruppe mitgeführt.

Die spezifischen klinischen Symptome wie das Aktivitätsniveau, das Trink-, Fress- sowie Sozialverhalten und die Änderung der Atmung wurden auf einer Skala von 0 (fehlend); 1 (vorhanden) und 2 (schwer) zum Zeitpunkt 24 h *p.i.* (Ktr. Kontrolle) und 48 h *p.i.* (*S. pn.* infizierte Tiere) bewertet.

Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (** $p < 0,01$ vs. PBS-Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. *S. pneumoniae*-infizierte, glukosebehandelte Gruppe; *multiple* Mann-Whitney U-Tests mit Bonferroni Korrektur). [1]

3.3.3 Die Neutralisation des Komplementfaktors C5a hat keinen Einfluss auf die Rekrutierung der Leukozyten ins Lungenparenchym

Die murine Pneumokokkenpneumonie führt über Rekrutierung von Leukozytensubpopulationen zu einer massiven lokalen Entzündungsreaktion. Bereits zum Zeitpunkt 24 h *p.i.* wurden in der BALF infizierter Tiere erhöhte Leukozytenzahlen nachgewiesen (s. Abb. 10). Den größten Anteil hierunter stellten die polymorphkernigen Leukozyten (*Polymorphonuclear leukocyte*; PMN) dar. Der relative Anteil der Lymphozyten und Makrophagen war 24 h *p.i.* entsprechend vermindert. Die Behandlung mit dem L-RNA Aptamer NOX-D19 hatte keinen Einfluss auf die lokale Leukozytenrekrutierung.

Ergebnisse

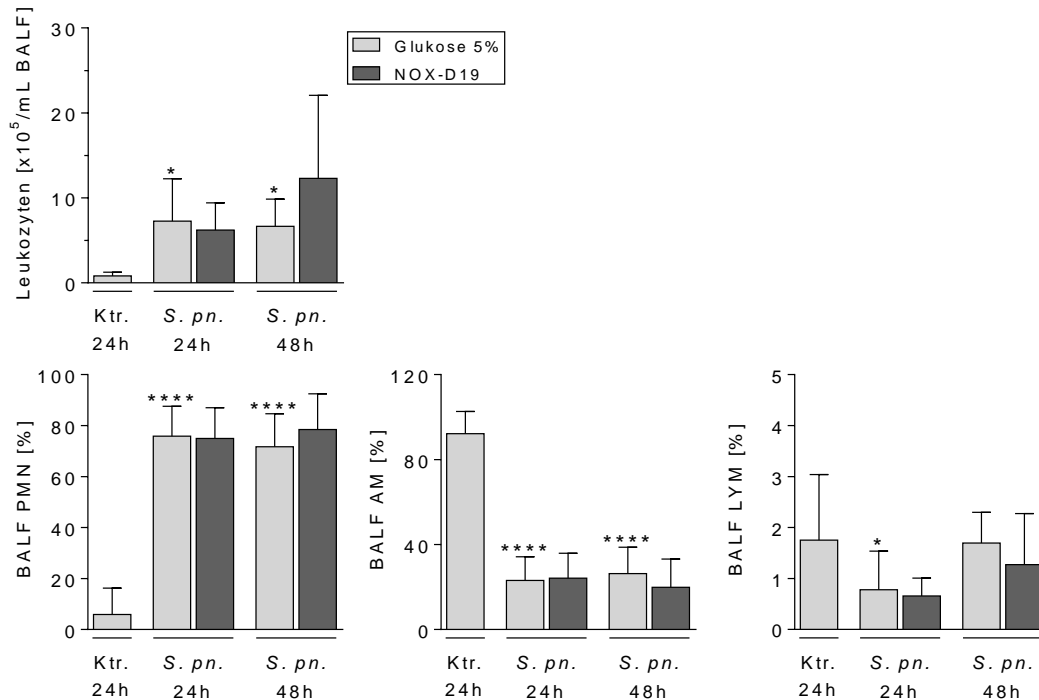


Abb. 10 Leukozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das L-RNA Aptamer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intraperitoneal*. Es wurde eine PBS-kontrollinfizierte, 5% Glukose behandelte Gruppe mitgeführt. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgte zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h mittels FACS-Analyse in der BALF. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (**** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$ vs. PBS-Kontrolle; *one-way* ANOVA und Korrektur für multiples Testen nach Sidak). Abkürzungen: AM Alveolarmakrophagen, LYM Lymphozyten, PMN *Polymorphonuclear leukocyte* Neutrophile Granulozyten. [1]

3.3.4 Die Neutralisation von C5a zeigt keinen Einfluss auf die Immunantwort

C5a repräsentiert ein potentes Anaphylatoxin, das auf nukleärer Ebene zu einer gesteigerten Expression und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen führt. Im Rahmen der murinen Pneumokokkenpneumonie wurden für alle erhobenen Zytokine erhöhte Konzentrationen im Vergleich zur PBS-kontrollinfizierten Gruppe gemessen (s. Abb. 11). Es bestanden keine Unterschiede zu infizierten mit Glukose behandelten und infizierten NOX-D19 behandelten Tieren.

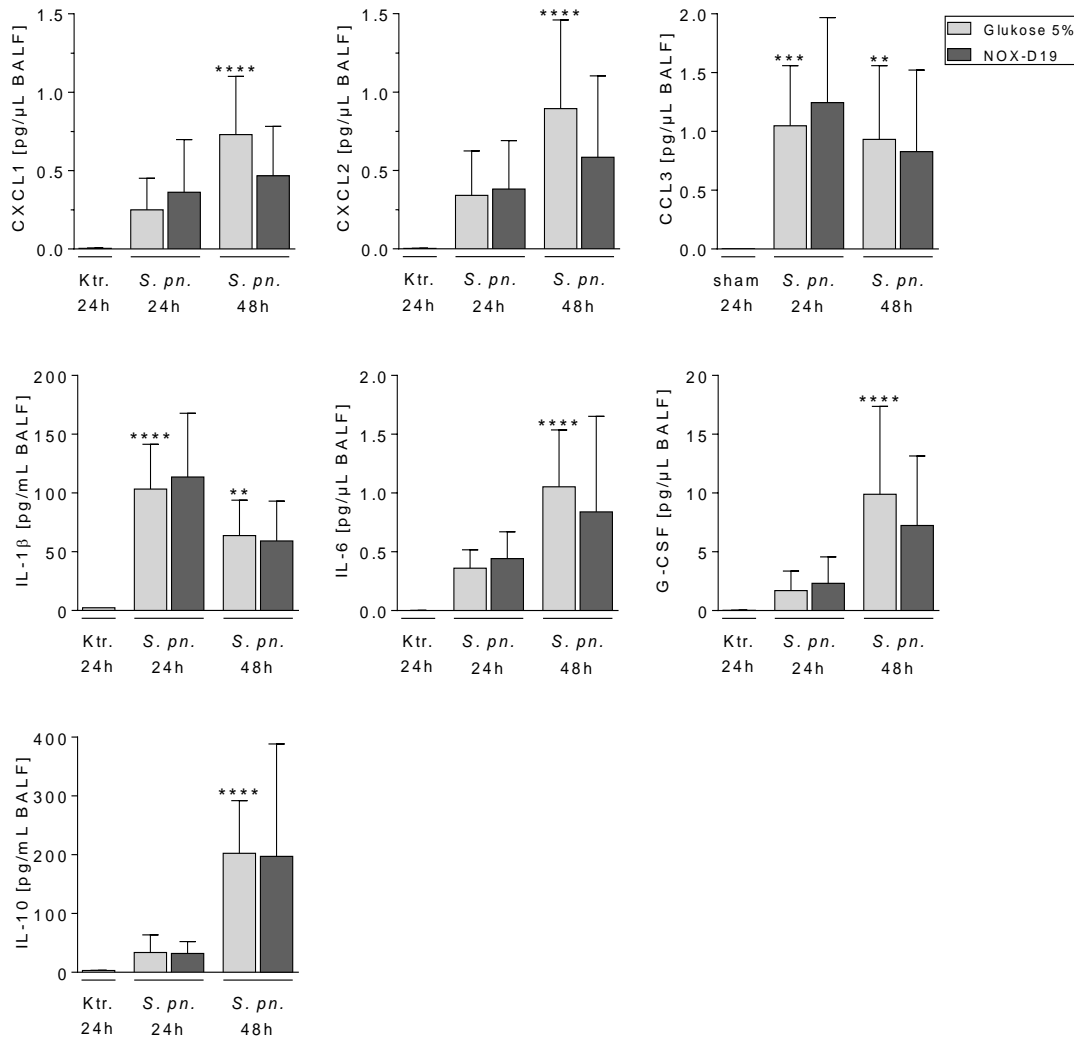


Abb. 11 Lokales Zytokinprofil in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das L-RNA Aptamer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intraperitoneal*. Es wurde eine PBS-kontrollinfizierte, 5% Glukose behandelte Gruppe mitgeführt. Die Quantifizierung der Zytokinkonzentrationen in der BALF zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nach Infektion erfolgte mittels Bio-Plex Pro™ Assay. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ vs. PBS-Kontrolle; *one-way* ANOVA und Korrektur für multiples Testen nach Sidak). Abkürzungen: CCL, CXCL Chemokinligand, IL Interleukin, G-CSF *growth colony-stimulating factor*. [1]

3.3.5 Die Neutralisation von C5a führt in der Pneumokokkenpneumonie zu keiner Änderung der lokalen Bakterienlast

Die Behandlung mit der Studienmedikation NOX-D19 hatte keinen Einfluss auf die lokale Bakterienlast Pneumokokken-infizierter Tiere (s. Abb. 12).

Ergebnisse

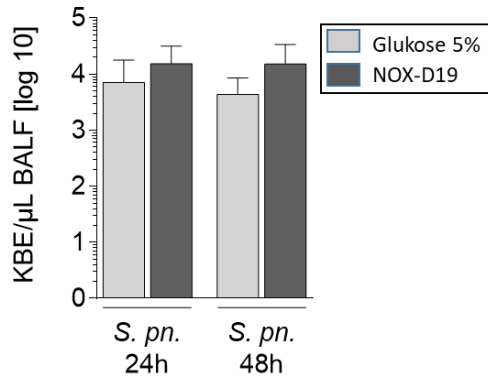


Abb. 12 Bakterienlast in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das L-RNA Aptamer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intraperitoneal*. Die Bestimmung der Bakterienlast erfolgte für die *S. pn.*-infizierten Tiere jeweils nach 24 h und 48 h. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (*one-way* ANOVA und und Korrektur für multiples Testen nach Sidak). Abkürzungen: KBE Kolonie-bildende Einheit. [1]

3.4 Pneumonie als systemische Inflammation

3.4.1 Die Neutralisation von C5a zeigt keinen Einfluss auf die systemische zelluläre Immunantwort

Die Pneumokokkenpneumonie ist nicht nur auf ein lokales Entzündungsgeschehen begrenzt, sondern aggraviert als systemische Immunreaktion das klinische Bild. Innerhalb von 48 h nach Infektion zeigte sich in Form einer Reduktion der absoluten Gesamtleukozytenzellzahl das Bild einer septikämischen Leukozytopenie (s. Abb. 13). In der NOX-D19 behandelten Gruppe wurden tendenziell höhere Gesamtleukozytenzellzahlen gemessen, jedoch zeigten sich in allen Leukozytensubpopulationen letztlich keine Unterschiede zwischen kontrollbehandelten und NOX-D19 behandelten Tieren.

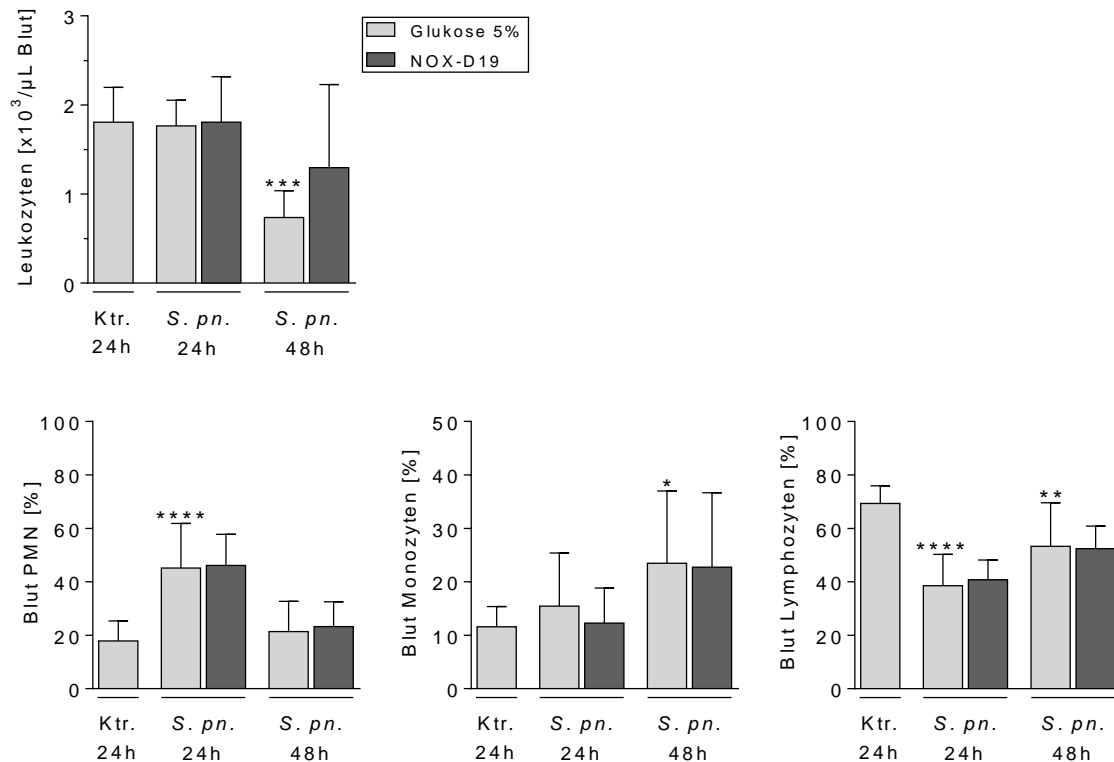


Abb. 13 Leukozyten im Vollblut

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intraperitoneal*. Es wurde eine PBS-kontrollinfizierte, 5% Glukose behandelte Gruppe mitgeführt. Die Differenzierung der Leukozyten aus dem Vollblut erfolgte zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h mittels FACS-Analyse. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ vs. PBS-Kontrolle; *one-way ANOVA* und Korrektur für multiples Testen nach Sidak). Abkürzungen: PMN *Polymorphonuclear leukocyte* Neutrophile Granulozyten. [1]

3.4.2 Die Neutralisation von C5a bewirkt eine Reduktion systemischer G-CSF-Levels

Eine durch Pneumokokken induzierte CAP stellt ebenso eine Systemerkrankung mit Aktivierung einer systemischen Inflammation dar. Aus diesem Grund erfolgte die Quantifizierung der Zytokine CXCL1, CXCL2, CCL3, IL-1 β , IL-6, G-CSF und IL-10 ebenfalls im Blutplasma (s. Abb. 14). Sie wurde mittels Bio-Plex Pro™ Assay zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h durchgeführt. Es zeigten sich signifikante Anstiege aller genannten Zytokine 48 h *p.i.* in den kontrollbehandelten, infizierten Tieren ($p < 0,001-0,0001$). Des Weiteren zeigten sich für die Zytokine CXCL1, CXCL2, CCL3, IL-1 β , IL-6 und IL-10 tendenziell reduzierte Level durch C5a Neutralisation. Für G-CSF wurden 48 h *p.i.* signifikant reduzierte Konzentrationsspiegel im Vergleich zu kontrollbehandelten, infizierten Tieren gemessen ($p < 0,001$).

Ergebnisse

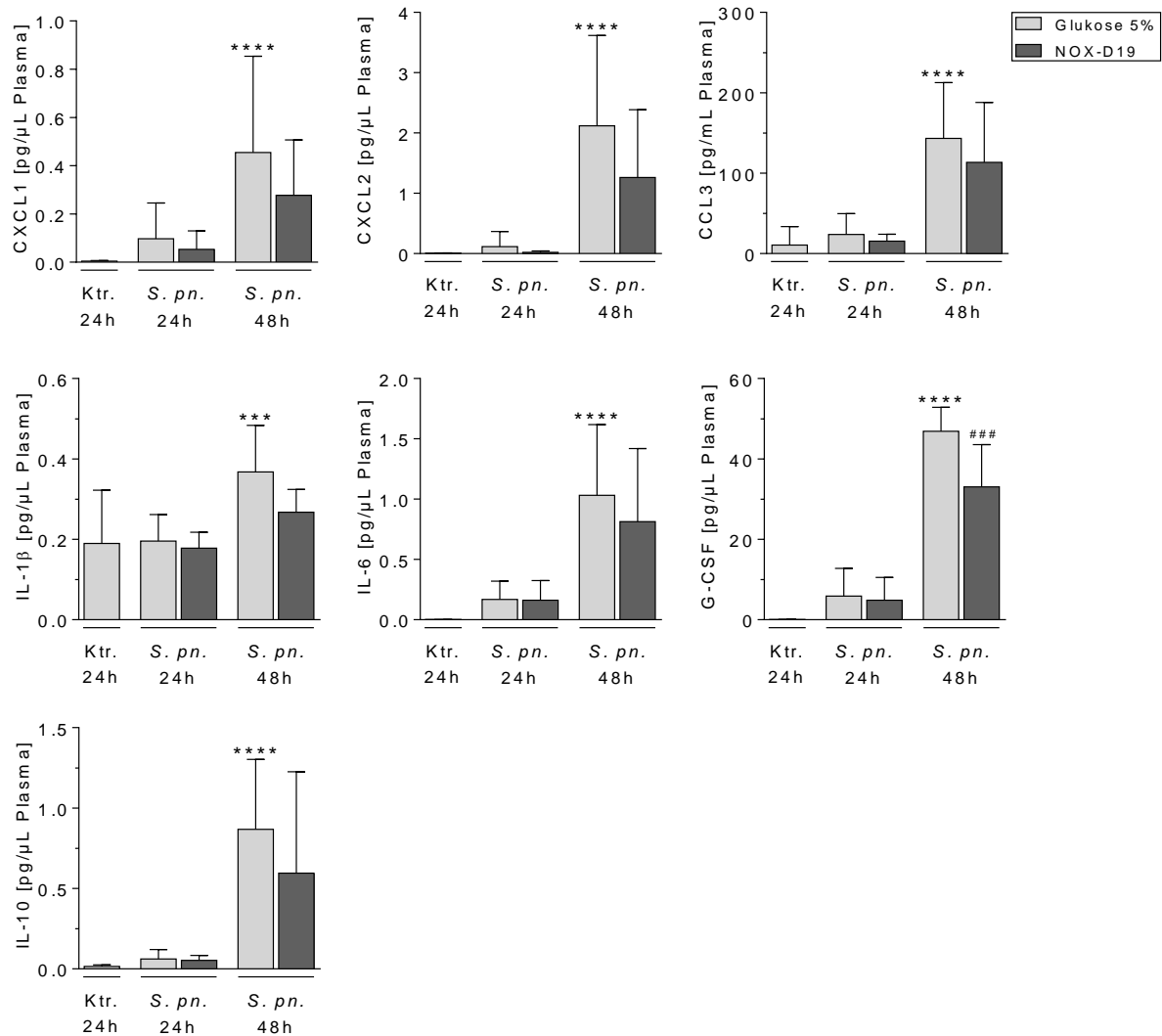


Abb. 14 Zytokinprofil des Blutplasmas

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intraperitoneal*. Es wurde eine PBS-kontrollinfizierte, 5% Glukose behandelte Gruppe mitgeführt. Die Quantifizierung der Zytokinkonzentrationen im Blutplasma erfolgte mittels Bio-Plex Pro™ Assay zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nach Infektion. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (**** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$ vs. PBS-Kontrolle; ### $p < 0,001$ vs. *S. pn.* infizierte, glukosekontrollbehandelte Gruppe; *one-way* ANOVA und Korrektur für multiples Testen nach Sidak). Abkürzungen: CCL, CXCL Chemokinligand; IL Interleukin, G-CSF *growth colony-stimulating factor*. [1]

3.4.3 Die Neutralisation von C5a hat keinen Effekt auf die bakteriämische Absiedlung der Pneumokokken

Die entzündungsbedingte Schädigung der pulmonalvaskulären Barriere ermöglicht ebenso eine bakterielle Absiedlung nach extrapulmonal. Es erfolgte die Quantifizierung der Streptokokken im Blut und in der Milz (s. Abb. 15). Die Bakterienlast im Blut sowie in der Milz wurde durch die Therapie mit NOX-D19 nicht beeinflusst.

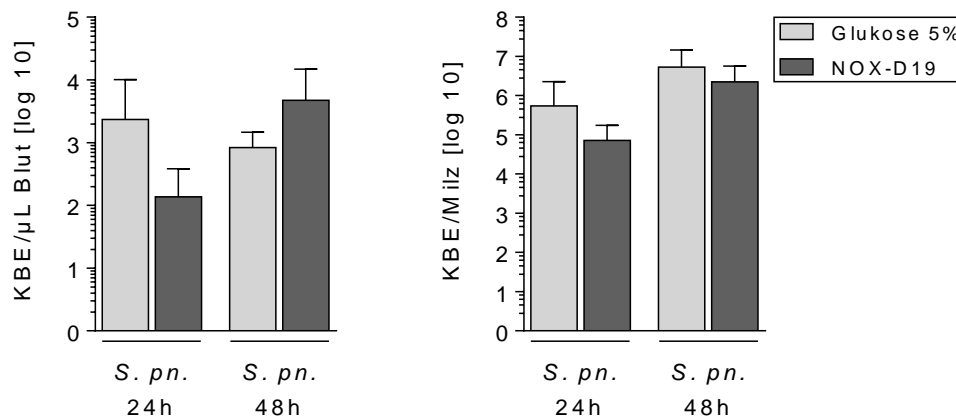


Abb. 15 Bakterienlast im Blut und in der Milz

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intraperitoneal*. Die Bestimmung der Bakterienlast erfolgte für die *S. pn.*-infizierten Tiere jeweils nach 24 h und 48 h aus dem Vollblut (A) sowie in der Milz (B). Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (*one-way* ANOVA und Korrektur für multiples Testen nach Sidak). Abkürzungen: KBE Kolonie-bildende Einheit. [1]

3.5 Extrapulmonaler Organschaden

Im septischen Geschehen kommt es im klinischen Verlauf der pneumogenen Sepsis zur Entwicklung eines Multiorganversagens. Daher wurde die Wirkung der C5a Neutralisation auf renaler und hepatischer Ebene untersucht. Zur Ermittlung des renalen Organschadens erfolgte die Quantifizierung des Nierenretentionsparameters Harnstoff (HST) aus murinem Plasma 24 h und 48 h *p.i.* (s. Abb. 16). Mit der Quantifizierung von Aspartataminotransferase (AST) wurde der hepatozelluläre Schaden auf mitochondrialer Ebene (s. Abb. 17) erfasst und mittels immun-histochemischer Färbung von Caspase 3a histologisch dargestellt (s. Abb. 18 und Abb. 19). Des Weiteren wurde der Effekt der C5a Neutralisation auf das hämostaseologische System untersucht und durch Anfärbung von Fibrin im Leberschnitt visualisiert (s. Abb. 20 und Abb. 21).

3.5.1 Die Neutralisation von C5a hat keinen Einfluss auf akutes Nierenversagen

In der pneumogenen Sepsis kam es zu einem signifikanten Anstieg von HST im Plasma (s. Abb. 16) ($p < 0,01$), die Neutralisation von C5a zeigte bezüglich des Nierenversagens keinen protektiven Effekt.

Ergebnisse

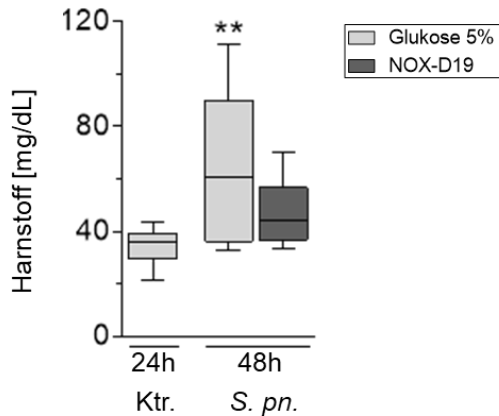


Abb. 16 Konzentration Harnstoff im Blutplasma

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intraperitoneal*. Es wurde eine PBS-kontrollinfizierte, 5% Glukose behandelte Gruppe mitgeführt (Ktr.). Die Quantifizierung der Harnstoff Konzentrationen im Blutplasma wurde zu den Zeitpunkten 24 h (nur Kontrollgruppe) und 48 h *p.i.* durchgeführt. Die Daten sind in Form von Box-Plots, *inclusive* Median sowie Interquartilabstand, dargestellt. (** $p < 0,01$ vs. Kontrolle; Mann-Whitney U-Test mit Bonferroni Korrektur für multiple Vergleiche). [1]

3.5.2 Die Neutralisation von C5a wirkt protektiv auf das Entstehen eines Leberversagens

Die pneumogene Sepsis führte 48 h *p.i.* zu einem Anstieg der AST-Level im Plasma ($p < 0,0001$) (s. Abb. 17) und markiert damit eine ausgedehnte Leberschädigung. Durch die Neutralisation von C5a zeigten sich reduzierte Konzentrationen für AST ($p < 0,05$). Konsistent hierzu zeigte sich im Leberparenchym 48 h *p.i.* das Bild einer ausgeprägten Apoptose, dargestellt durch Caspase 3a positive Färbung (s. Abb. 18). Bei NOX-D19 behandelten Tieren war diese nicht mehr nachweisbar. In Abb. 20 zeigt sich zudem, dass durch NOX-D19 eine Ausfällung von Fibrin im Mikrozirkulationssystem ausblieb, wohingegen sich in Schnitten unbehandelter infizierter Tiere deutlich Fibrin positive Areale zeigten. Die immunhistochemische Scoring Frequenz zeigen die jeweiligen Abb. 19 und Abb. 21.

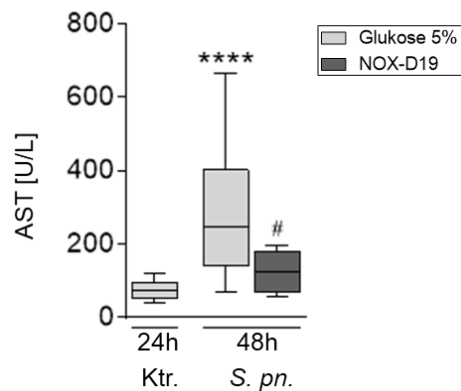


Abb. 17 Konzentration AST im Blutplasma

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intraperitoneal*. Es wurde eine PBS-kontrollinfizierte, 5% Glukose behandelte Gruppe mitgeführt (Ktr.). Die Quantifizierung der AST-Konzentrationen im Blutplasma wurde zu den Zeitpunkten 24 h (nur Kontrollgruppe) und 48 h *p.i.* durchgeführt. Die Daten sind in Form von Box-Plots, *inclusive* Median sowie Interquartilabstand, dargestellt. (**** $p < 0,0001$ vs. Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. *S. pneumoniae*-infizierte, glukosekontrollbehandelte Gruppe; Mann-Whitney U-Test mit Bonferroni Korrektur für multiple Vergleiche). [1]

Ergebnisse

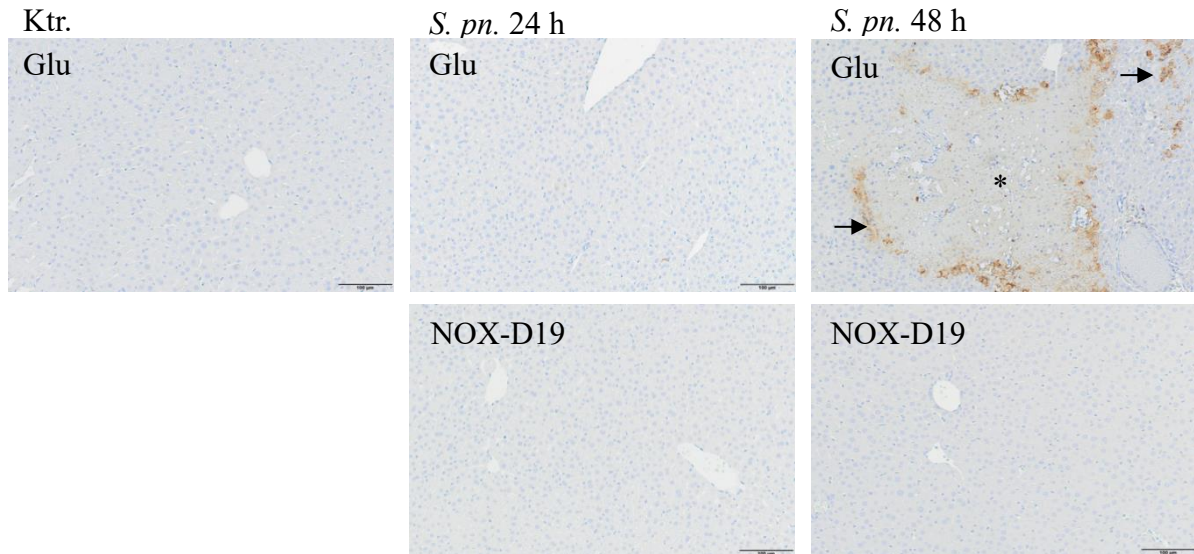


Abb. 18 Immunhistochemische Färbung von Caspase 3a in der Leber

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intrapertoneal*. Es wurde eine PBS-kontrollinfizierte, 5% Glukose behandelte Gruppe mitgeführt (Ktr.). Die Leberproben wurden 24 h bzw. 48 h *p.i.* gewonnen. Die immunhistochemische Markierung von Caspase 3a stellt sich durch rötlichbraune Färbung dar (Pfeil), zentrale Nekrosebereiche sind exemplarisch durch ein Sternchen (*) markiert. Maßstabsbalken: 100 μ m. [1]

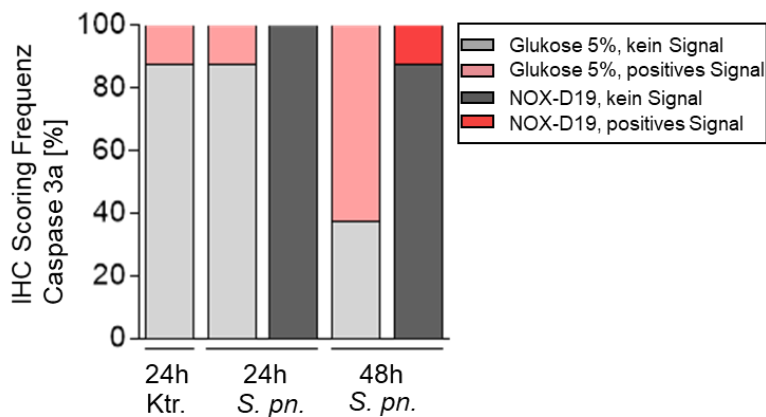


Abb. 19 Immunhistochemische Scoring Frequenz von Caspase 3a in der Leber

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intrapertoneal*. Es wurde eine PBS-kontrollinfizierte, 5% Glukose behandelte Gruppe mitgeführt (Ktr.). Die Leberproben wurden 24 h bzw. 48 h *p.i.* gewonnen. Die Gewebe wurden immunhistochemisch gefärbt und bewertet (0, kein Signal; 1, positives Signal). Die Daten sind als gestapelte Balken dargestellt. [1]

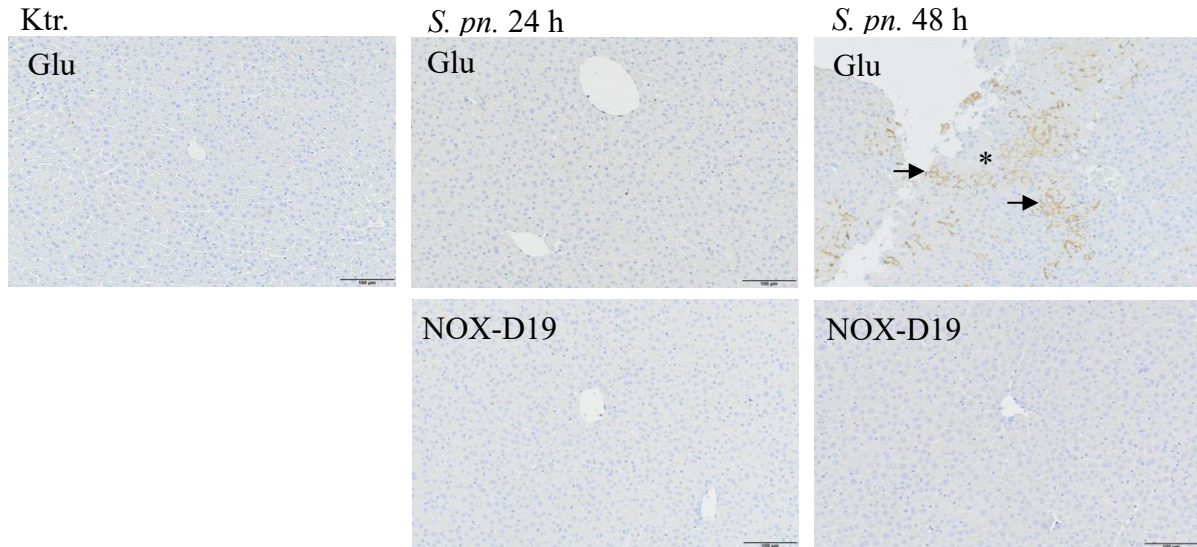


Abb. 20 Immunhistochemische Färbung von Fibrin in der Leber

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intraperitoneal*. Es wurde eine PBS-kontrollinfizierte, 5% Glukose behandelte Gruppe mitgeführt (Ktr.). Die Leberproben wurden 24 h bzw. 48 h *p.i.* gewonnen. Die immunhistochemische Markierung von Fibrin stellt sich durch rötlichbraune Färbung dar, (Pfeil), zentrale Nekrosebereiche sind exemplarisch durch ein Sternchen (*) markiert. Maßstabsbalken: 100 μ m. [1]

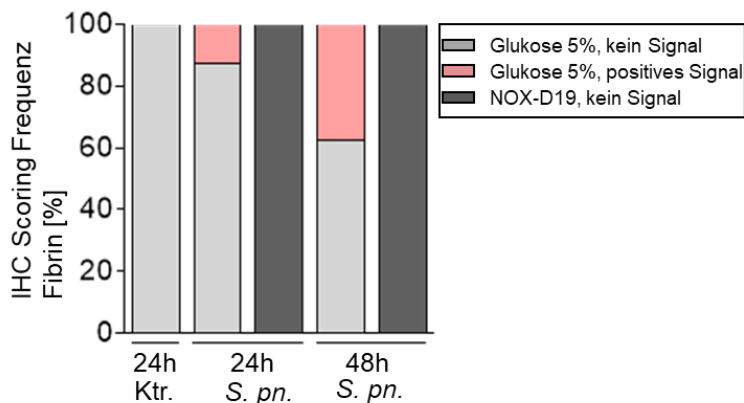


Abb. 21 Immunhistochemische Scoring Frequenz von Fibrin in der Leber

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert. Zum Infektionszeitpunkt 0 h und 24 h *post infectionem* (*p.i.*) erhielten die Versuchstiere das Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) bzw. 5%-ige Glukoselösung *intraperitoneal*. Es wurde eine PBS-kontrollinfizierte, 5% Glukose behandelte Gruppe mitgeführt (Ktr.). Die Leberproben wurden 24 h bzw. 48 h *p.i.* gewonnen. Die Leberproben wurden 24 h bzw. 48 h *p.i.* gewonnen. Die Gewebe wurden immunhistochemisch gefärbt und bewertet (0, kein Signal; 1, positives Signal). Die Daten sind als gestapelte Balken dargestellt. [1]

3.6 Neutralisation von C5a im Modell des beatmungsassoziierten Lungenschadens (VILI) in der Pneumokokkenpneumonie und Sepsis

3.6.1 Die Neutralisation von C5a stabilisiert die pulmonalvaskuläre Permeabilität beim VILI in der Pneumokokkenpneumonie und Sepsis

Die invasive Beatmung führt bei Vorliegen einer pneumogenen Sepsis zu einer zusätzlichen Schädigung der pulmonalvaskulären Barriere. Dies wurde mittels Messung von humanem Serumalbumin in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und dem Blutplasma und anschließender Bildung des Quotienten quantifiziert. (s. Abb. 22) Unter der invasiven Beatmung zeigte sich ein deutlicher Anstieg der pulmonalvaskulären Permeabilität ($p < 0,01$) im Vergleich zu nicht beatmeten Tieren. Die Neutralisation von C5a bewirkte eine signifikante Reduktion der Hyperpermeabilität im *double-hit*-Modell ($p < 0,01$).

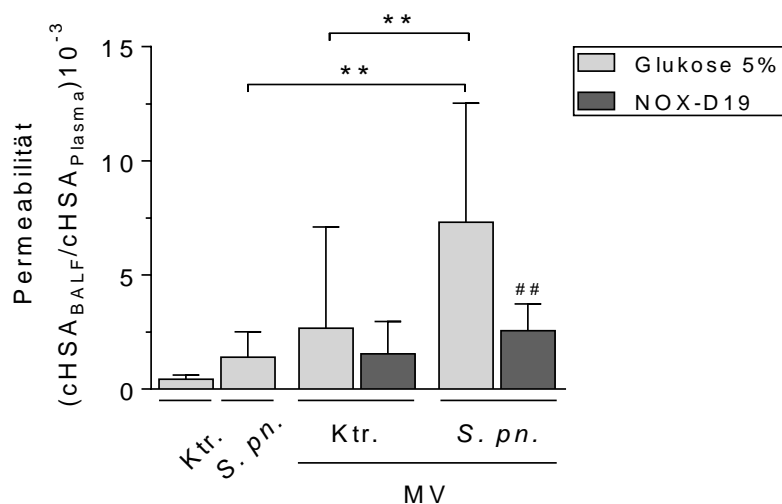


Abb. 22 Pulmonalvaskuläre Permeabilität der Lunge

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert bzw. mit PBS kontrollinfiziert (Ktr.) und 23 h *post infectionem* (*p.i.*) mit NOX-D19 (20 mg/kg KG) oder 5% Glukose *intraperitoneal* behandelt. Die Versuchstiere wurden 24 h *p.i.* für eine Dauer von 6 h einer invasiven Beatmung am MiniVent® unterzogen (Parameter: Tidalvolumen= 12 mL/kg KG, Atemfrequenz= 120/min, positiver end-expiratorischer Druck (*positive end-expiratory pressure* PEEP)= 2 cmH₂O, inspiratorische Sauerstofffraktion $FiO_2 = 0,7$). Es wurden zwei nicht-ventilierte Kontrollgruppen mitgeführt. Der Versuchsendpunkt wurde auf 30 h *p.i.* festgelegt. 90 min vor Versuchsende wurde HSA *intravenös* appliziert. Die Konzentration von HSA wurde 30 h *p.i.* per ELISA im Blutplasma und in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) gemessen. Der Quotient aus der HSA Konzentration in der BALF (cHSA_{BALF}) und der HSA Konzentration im Plasma (cHSA_{Plasma}) wurde als Marker für die pulmonalvaskuläre Permeabilität berechnet. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (** $p < 0,01$ vs. angezeigte Gruppe; ## $p < 0,01$ vs. *S. pneumoniae*-infizierte, glukosekontrollbehandelte Gruppe; *one-way* ANOVA und Korrektur für multiples Testen nach Sidak). Abkürzungen: HSA humanes Serumalbumin, MV *mechanical ventilation* (invasive Beatmung). [1]

3.6.2 Die Neutralisation von C5a bewirkt eine Reduktion des mittleren Atemwegsdrucks

Invasive Beatmung und vor allem die volumenkontrollierte Beatmung bedingt durch die Reorganisation des Lungengewebes, insbesondere durch Entwicklung eines Lungenödems, einen Anstieg des mittleren Atemwegsdrucks (MAP). In Abb. 23 wird der MAP im zeitlichen Verlauf der invasiven Beatmung visualisiert, es zeigte sich bei infizierten und beatmeten Tieren ein frühzeitiger Anstieg. Bei kontrollinfizierten, beatmeten Tieren war der Anstieg des MAP deutlich verzögert.

In Abb. 24 wird der MAP nach 6 h Ventilation veranschaulicht. Die Daten zeigten, dass die Neutralisation von C5a in der pneumogenen Sepsis bei invasiver Beatmung zu einer Reduktion des Atemwegsdruckes im Vergleich zu unbehandelten Tieren führte ($p < 0,05$).

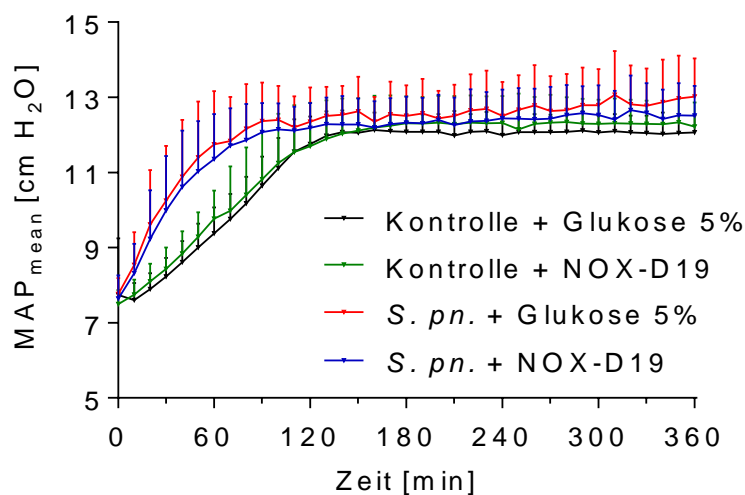


Abb. 23 Mittlerer Atemwegsdruck im zeitlichen Verlauf der mechanischen Beatmung

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert bzw. mit PBS kontrollinfiziert. Die Tiere erhielten zum Zeitpunkt 23 h *post infectionem* (*p.i.*) das Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) oder eine Kontrollbehandlung mit 5% Glukoselösung. Die Versuchstiere wurden 24 h *p.i.* für eine Dauer von 6 h einer invasiven Beatmung am MiniVent® unterzogen (Parameter: Tidalvolumen= 12 mL/kg KG, Atemfrequenz= 120/min, positiver end-expiratorischer Druck (*positive end-expiratory pressure* PEEP)= 2 cmH₂O, inspiratorische Sauerstofffraktion $FiO_2 = 0,7$). Der Versuchsendpunkt wurde auf 30 h *p.i.* festgelegt. Der mittlere Atemwegsdruck (MAP) wurde in 10-minütigen Abständen erfasst. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben. [1]

Ergebnisse

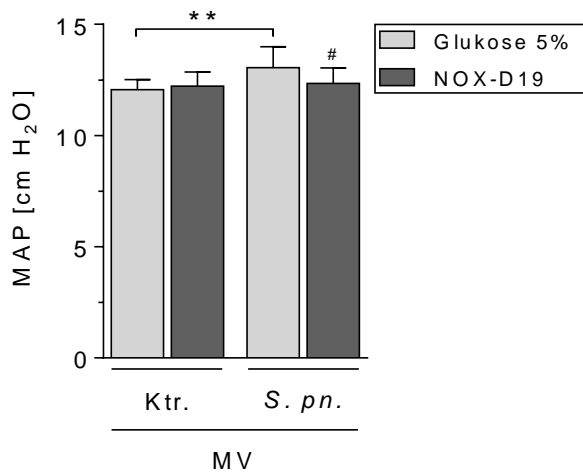


Abb. 24 Mittlerer Atemwegsdruck nach 6 h mechanischer Beatmung

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert bzw. mit PBS kontrollinfiziert. Die Tiere erhielten zum Zeitpunkt 23 h *post infectionem* (*p.i.*) das Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) oder eine Kontrollbehandlung mit 5% Glukoselösung. Die Versuchstiere wurden 24 h *p.i.* für eine Dauer von 6 h einer invasiven Beatmung am MiniVent® unterzogen (Parameter: Tidalvolumen= 12 mL/kg KG, Atemfrequenz= 120/min, positiver end-expiratorischer Druck (*positive end-expiratory pressure* PEEP)= 2 cmH₂O, inspiratorische Sauerstofffraktion $FiO_2 = 0,7$). Der Versuchsendpunkt wurde auf 30 h *p.i.* festgelegt. Veranschaulicht werden die mittleren Atemwegsdrücke (*mean airway pressure* MAP) zum Zeitpunkt $t = 6$ h invasiver Beatmung. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (** $p < 0,01$ vs. PBS-Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. *S. pneumoniae*-infizierte, glukosekontrollbehandelte Gruppe; *one-way* ANOVA und Korrektur für multiples Testen nach Sidak). [1]

3.6.3 Die Neutralisation von C5a hat keinen Einfluss auf die zelluläre Immunantwort im *double-hit* Modell der pneumogenen Sepsis und des VILI

Die Quantifizierung sowie Differenzierung der Leukozytenpopulationen wurde 30 h *p.i.* mittels FACS-Analyse aus der BALF durchgeführt.

In der pneumogenen Sepsis führt eine zusätzliche invasive Beatmung über Endothelzellaktivierung zu einer vermehrten Extravasation und Rekrutierung von Leukozyten ins Lungenparenchym. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich im *double-hit* Modell ein deutlicher Anstieg der Gesamtleukozytenzahl ($p < 0,001$) sowie der der Anzahl neutrophiler Granulozyten (Abb. 25). Die Neutralisation von C5a hatte jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl sowie Verteilung der Leukozytenpopulationen.

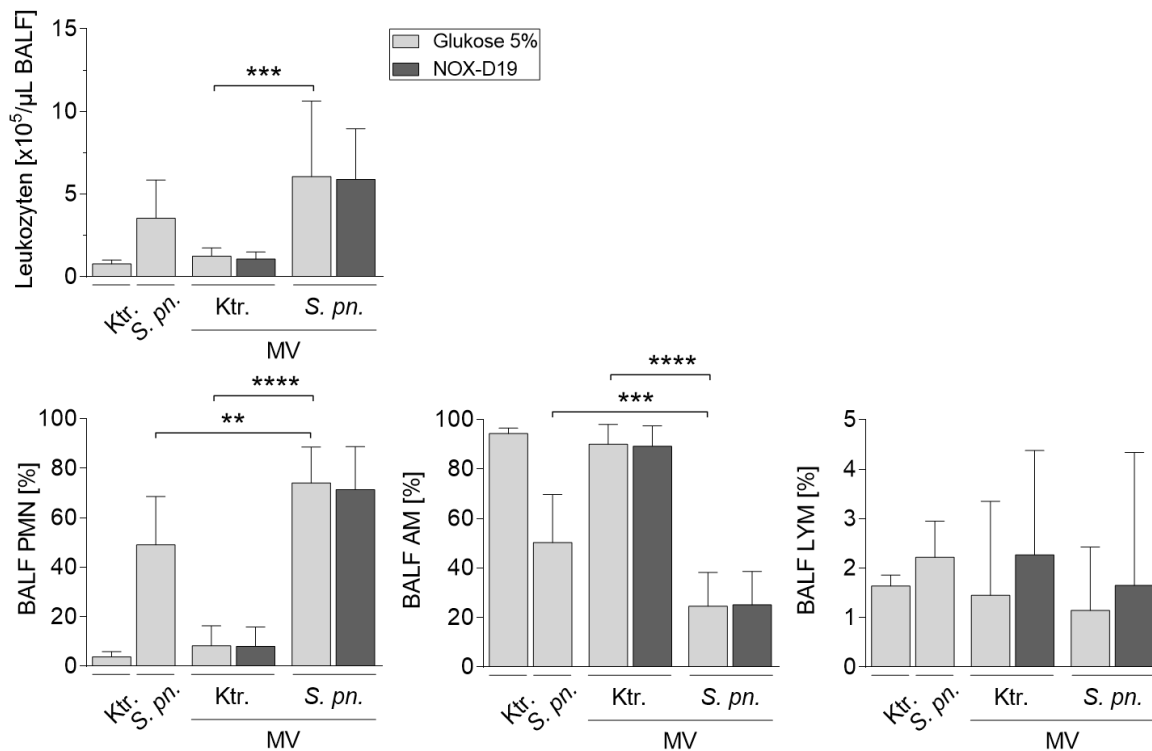


Abb. 25 Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage im double-hit Modell

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae* *S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert bzw. mit PBS kontrollinfiziert. Die Tiere erhielten zum Zeitpunkt 23 h *post infectionem* (*p.i.*) das Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) oder eine Kontrollbehandlung mit 5% Glukoselösung. Die Versuchstiere wurden 24 h *p.i.* für eine Dauer von 6 h einer invasiven Beatmung am MiniVent® unterzogen (Parameter: Tidalvolumen= 12 mL/kg KG, Atemfrequenz= 120/min, positiver end-expiratorischer Druck (*positive end-expiratory pressure* PEEP)= 2 cmH₂O, inspiratorische Sauerstofffraktion FiO₂= 0,7) Es wurden zwei nicht-ventilierte Kontrollgruppen mitgeführt. Der Versuchsendpunkt wurde auf 30 h *p.i.* festgelegt. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgte zum Zeitpunkt 30 h mittels FACS-Analyse. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ vs. angezeigte Gruppe; *one-way* ANOVA und Korrektur für multiples Testen nach Sidak). Abkürzungen: AM Alveolarmakrophagen, LYM Lymphozyten, MV *mechanical ventilation* (invasive Beatmung), PMN *Polymorphonuclear leukocyte* Neutrophile Granulozyten. [1]

3.6.4 Die Neutralisation von C5a hat im Modell des beatmungsassoziierten Lungenschadens in der pneumogenen Sepsis keinen signifikanten Einfluss auf die Sekretion inflammatorischer Mediatoren

In dieser Dissertation wurde der Zusammenhang der C5a-Neutralisation bei invasiver Beatmung im Modell der Pneumokokken-induzierten Pneumonie und Sepsis auf das lokale proinflammatorische Zytokinprofil untersucht (s. Abb. 26). Die Quantifizierung der Zytokine CXCL1, CCL3, IL-6, G-CSF und IL-10 erfolgte mittels Bio-Plex Pro™ Assays zum Zeitpunkt 30 h aus der BALF.

Ergebnisse

Im *double-hit* Modell zeigte sich nach 30 h ein signifikanter Anstieg aller gemessenen Zytokine ($p < 0,05$ - $0,0001$). Die Neutralisation von C5a führte zu signifikant niedrigeren CCL3 Konzentrationen bei beatmeten, *S. pn.* infizierten Tieren im Vergleich zu 5% Glukose behandelten Tieren ($p < 0,05$). Weitere Zytokine wurden durch NOX-D19 nicht beeinflusst.

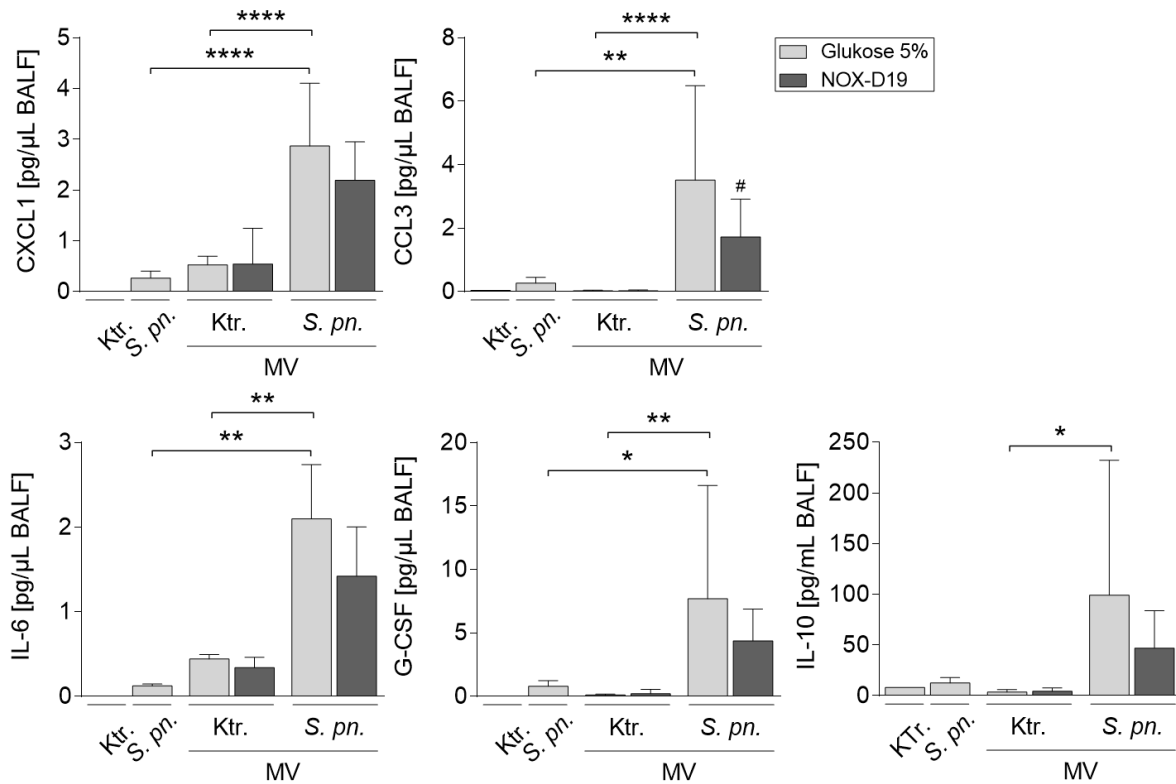


Abb. 26 Lokales Zytokinprofil in der bronchoalveolären Lavage (BALF)

C57Bl/6N Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ KBE *Streptococcus pneumoniae S. pn.* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) transnasal infiziert bzw. mit PBS kontrollinfiziert. Die Tiere erhielten zum Zeitpunkt 23 h *post infectionem (p.i.)* das Spiegelmer NOX-D19 (20 mg/kg KG) oder eine Kontrollbehandlung mit 5% Glukoselösung. Die Versuchstiere wurden 24 h *p.i.* für eine Dauer von 6 h einer mechanischen Beatmung am MiniVent® unterzogen (Parameter: Tidalvolumen= 12 mL/kg KG, Atemfrequenz= 120/min, positiver end-expiratorischer Druck (*positive end-expiratory pressure* PEEP)= 2 cmH₂O, inspiratorische Sauerstofffraktion FiO₂= 0,7) Es wurden zwei nicht-ventilierte Kontrollgruppen mitgeführt. Der Versuchsendpunkt wurde auf 30 h *p.i.* festgelegt. Die Quantifizierung der ZytokinKonzentrationen aus der BALF zum Zeitpunkt 30 h nach Infektion erfolgte mit dem Bio-Plex Pro™ Assay. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (**** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ vs. angezeigte Gruppe; # $p < 0,05$ vs. *S. pn.* infizierte, glukosekontrollbehandelte Gruppe; *one-way* ANOVA und Korrektur für multiples Testen nach Sidak). Abkürzungen: CCL, CXCL Chemokinligand; IL Interleukin, G-CSF *growth colony-stimulating factor*, MV *mechanical ventilation* (invasive Beatmung). [1]

4 Diskussion

Die schwere CAP birgt das Risiko schwerwiegender, intensivpflichtiger klinischer Verläufe. Trotz suffizienter Antibiotikatherapie und supportiven intensivmedizinischen Maßnahmen sind komplikative Verläufe wie die des akuten Lungenversagens und der damit verbundenen pneumogenen Sepsis häufig und gehen mit einer hohen Mortalität einher. Eine potentiell schädigende Entzündungsantwort ist ein wichtiger Bestandteil der Pathophysiologie dieser Erkrankung. Neue adjunktive Therapiestrategien, die diesen Pathomechanismus lokal und systemisch adressieren, könnten den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen. C5a ist ein potentes proinflammatorisches Molekül, das auch direkte schädigende Wirkung auf die vaskuläre Barrierefunktion hat (83–86). Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit C5a Spiegel in Patienten mit CAP analysiert und der Effekt der Neutralisierung des Anaphylatoxins C5a mittels des L-RNA-Aptamers NOX-D19 in einem Mausmodell der schweren Pneumokokkenpneumonie untersucht.

Als zentrales Ergebnis dieser Arbeit zeigten sich erhöhte Wirkspiegel des Anaphylatoxins C5a sowohl in der humanen CAP als auch im murinen CAP Modell.

Die Neutralisation von C5a mittels des L-RNA-Aptamers NOX-D19 wirkte sich protektiv auf pneumonieassoziierten Lungen- und sepsisassoziierten Leberschaden aus. Damit könnte die spezifische Neutralisation von C5a einen Ansatzpunkt adjunktiver Therapiestrategien in der schweren CAP darstellen. [1]

Unsere Untersuchungen der PROGRESS-Seren zeigten erhöhte C5a Spiegel bei Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie (CAP). Die Serumproben wurden von Patienten, die aufgrund ihrer schweren CAP hospitalisiert wurden, innerhalb von 48 h nach Diagnosestellung gewonnen. Übereinstimmend mit den Analysen aus Patientenseren zeigten sich im Frühstadium der schweren murinen Pneumokokkenpneumonie erhöhte C5a Spiegel. Im Verlauf der Erkrankung nahmen die Spiegel ab.

Vergleichbare Studien zeigten entweder verminderte (128, 129) oder gleichbleibende C5a Spiegel (130). So fanden beispielsweise Gressner *et al.* bei kritisch Kranken, die an einem Multiorganversagen litten oder sich bereits im septischen Schock befanden, signifikant verminderte Spiegel für C5a. Nebenbei bemerkt war die pneumogene Sepsis in dieser Studie hierfür die häufigste infektiöse Ursache und zeigte im Stadium der Sepsis die niedrigsten C5a Spiegel (128). Aber auch kritisch Kranke mit abdominalem Fokus wiesen bei Gardianli *et al.* verminderte Spiegel für C5a auf (129). Dies ist durchaus nicht widersprüchlich, da die Messung der C5a Spiegel dieser Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf, teilweise bei Vorliegen

Diskussion

des septischen Schocks, erfolgte. Dagegen befanden sich unsere Messzeitpunkte in einem früheren Erkrankungsstadium der Pneumonie. Der C5a Spiegel scheint folglich zu Beginn einer schweren Erkrankung erhöht zu sein und fällt schließlich wieder ab.

Gressner *et al.* interpretierten die Ergebnisse deutlich niedriger C5a Spiegel bei septischen Patienten im Vergleich zu kritisch kranken Patienten ohne Sepsis durch einen hohen Verbrauch an Komplementfaktoren als mögliche Ursache (128). Eine mögliche Erklärung für den Verbrauch von Komplementfaktoren lieferten Fang YY *et al.*: C5a wird nach der Bindung an seinem Rezeptor C5aR1 internalisiert (80). Das zeigte die Untersuchung der Rezeptorexpression von C5aR2 auf PMN von Patienten mit beginnender Sepsis sowie Patienten mit schwerer Sepsis bis hin zum septischen Schock. Fang YY *et al.* fanden eine zur Schwere der Sepsis korrelierende reduzierte Rezeptorexpression von C5aR2 auf der Zelloberfläche der PMN sowie eine erhöhte Expression der internalisierten Rezeptoren C5aR2intra (131). Im anhaltenden inflammatorischen Milieu scheint darüber hinaus ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen klinischem Outcome und C5aR-Expression zu bestehen (80).

Trotz tendenziell niedriger C5a Spiegel im fortgeschrittenen Verlauf der Sepsis hat C5a weiterhin biologische Relevanz. Denn die Exposition von C5a führt zur Anergie immunkompetenter Zellen. So wiesen Huber-Lang *et al.* den Funktionsverlust der PMN durch Einschränkung der Chemotaxis nach (29), Riedemann *et al.* beschreiben eine Störung der Phagozytose sowie der Synthese von ROS (132) und wiesen auf eine gesteigerte Apoptose der Thymozyten im C5a Milieu hin (133).

Unsere Subgruppenanalysen der PROGRESS-Daten von Patienten mit einer CAP und pneumogenen Sepsis zeigten keine Korrelation zur Krankheitsschwere (s. Tab. 11 und Tab. 12). Diese wurde anhand üblicher Scores wie CRB-65, SOFA, PSI etc. klassifiziert. Zudem standen die C5a Spiegel auch in keinem Zusammenhang zur hämodynamischen und respiratorischen Stabilität der Patienten. Des Weiteren korrelierten die C5a Spiegel auch nicht mit dem Gesamtüberleben der Patienten (Daten nicht gezeigt). Damit ergab sich aus unseren Korrelationsanalysen kein Hinweis darauf, dass C5a als Biomarker für die Diagnose oder Prognose der CAP Potential hat, was aber nicht ausschließt, dass C5a auch im Verlauf der CAP biologische Relevanz hat.

Die vorliegende Arbeit zeigte sowohl bei Patienten der PROGRESS-Studie mit CAP als auch in unserem Tiermodell der frühen murinen Pneumokokkenpneumonie erhöhte Wirkspiegel von C5a sowohl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit als auch im Blutplasma. Um die therapeutische Relevanz der C5a Neutralisation als mögliches adjunktives Therapieziel zu prüfen,

wurden 2 murine Modelle der schweren Pneumokokkenpneumonie untersucht. In beiden Modellen wurden die Mäuse transnasal mit *S. pneumoniae* infiziert. Die gewählte Infektionsdosis von $5 \cdot 10^6$ KBE führte im ersten Pneumoniemodell innerhalb von 24 h zu einer schweren Pneumonie und nach 48 h zu einer pneumogenen Sepsis mit der Entwicklung von Lungen- sowie Organversagen (134–136).

Als zweites Tiermodell wurde ein Modell der schweren beatmungspflichtigen Pneumokokkenpneumonie angewandt. In diesem sehr komplexen Tiermodell wird das klinisch relevante Szenario des beatmeten Patienten mit Pneumonie-assoziiertem Lungenversagen simuliert (121, 137). Wie beschrieben addieren sich hier die Effekte des Pneumonie-assoziierten Lungenversagens mit der schädigenden Wirkung der Überdruckbeatmung.

Die Neutralisation des Anaphylatoxins erfolgte mittels des L-RNA-Aptamers NOX-D19. Die Therapiedosis von 20 mg/kg KG wurde basierend auf vorangegangenen Studien gewählt, so dass von einer effizienten Neutralisierung des Anaphylatoxins C5a ausgegangen werden kann (100).

NOX-D19 ist gegenüber murinem L-C5a hochaffin (100), bindet spezifisch an C5a_{desArg} wie auch an C5a (101) und ist, aufgrund seiner L-Aptamerstruktur wie auch aufgrund der PEGylierung (PEG; Polyethylenglycol), durch seine Stabilität gegenüber Plasmanukleasen gekennzeichnet (100, 138). Das L-RNA-Aptamer NOX-D19 bietet den großen Vorteil, das gesamte Molekül zu umgeben und damit zu inaktivieren, denn für das Molekül C5a ist eine sterische Bindungsspezifität an seinem G-Protein-gekoppelten Rezeptor bekannt (31, 139). So legten beispielsweise Ward *et al.* 2010 eine Verbesserung des 10 Tage Gesamtüberlebens von 23% in unbehandelten Tieren auf 83% bis zu 90% bei CLP-ligierten Ratten (*caecum ligation puncture* = Punktion des Zäkums nach vorheriger Ligatur) nach Immunisierung mit IgG Antikörpern gegen C5a nahe, die in der mittleren bis C-terminalen Region von C5a binden, gegenüber denen, die mit IgG Antikörpern behandelt wurden, die am N-terminalen Ende von C5a binden (30).

Bei der Neutralisation des gesamten C5 Moleküls, durch Eculizumab beispielsweise, treten vermehrt Infektionen mit *Neisseria meningitidis* auf (140). Durch die gezielte Neutralisation von C5a soll dieser negative Effekt vermieden werden, da so die Aktivität von C5b nicht gehemmt und die Bildung des MAC gewährleistet wird (31, 81).

Diese Dissertation untersuchte die Effekte der Neutralisation des Komplementfaktors C5a durch NOX-D19 als mögliches Adjuvanz in der Therapie der CAP ohne Einfluss einer antibiotischen Therapie und belegte protektive Effekte auf die pulmonalvaskuläre Hyperpermeabilität sowie auf die sepsisbedingte akute Leberschädigung.

Diskussion

C5a ist im inflammatorischen Milieu an der Rekrutierung von PMN beteiligt (52, 76, 81, 98). Die Neutralisierung von C5a hatte in unseren Modellen keinen Einfluss auf die zelluläre Inflammationsantwort, insbesondere nicht auf die Rekrutierung der PMN. Schlussfolgernd scheint der Einfluss von C5a auf die Rekrutierung der PMN nicht die Erklärung des beobachteten protektiven Effektes von C5a auf die pulmonalvaskuläre Permeabilität zu sein.

C5a trägt durch Effekte an Endothelzellen unmittelbar zur Entstehung einer Barrierefunktion bei (100). Da sich aus unseren Ergebnissen nach C5a Neutralisation in der schweren murinen Pneumokokkenpneumonie weder Effekte auf die PMN-Rekrutierung noch auf die Zytokinantwort zeigten, ist ein direkter Effekt auf die pulmonalvaskuläre Permeabilität zu vermuten.

[1]

Aufgrund seiner proinflammatorischen Funktion führte die Störung der C5a/C5a-Rezeptorenachse in vergleichbaren Studien zu einer Reduktion der Zytokinspiegeln (76, 95–97). Proctor *et al.* zeigten im Tiermodell des ARDS beispielsweise reduzierte Spiegel für TNF α nach Behandlung mit einem C5aR Antagonisten (95). Egge *et al.* dokumentierten ebenfalls in einem Tiermodell durch Hemmung der C5 Spaltung mittels Coversin reduzierte Spiegel für IL-1 β , IL-6 und IL-8 in der *E. coli* induzierten Sepsis (141). Jedoch wurde hier parallel CD14 mittels eines monoklonalen Antikörpers gehemmt, wodurch der *Toll-like receptor* 4 (TLR4) Signalweg und damit die Erkennung von Lipopolysacchariden stark eingeschränkt wird, was durch Einschränkung der Pathogenerkennung schon eine abgeschwächte Immunreaktion vermuten lässt. Analog zur zellulären Inflammationsantwort konnten wir in unseren Tiermodellen dagegen, mit Ausnahme reduzierter Konzentrationsspiegel des CC-Chemokin-Liganden 3 (CCL3), keine Veränderung der pulmonalen Zytokinspiegel infolge einer C5a-Neutralisation messen. In einer Studie von Russkamp *et al.* führte die intratracheale Applikation von C5a zu einer gesteigerten Freisetzung von CCL3, was wiederum zur C5a-induzierten Lungenschädigung beitrug (76). Daraus ergibt sich für die Neutralisation von C5a allenfalls ein partieller Anteil immunmodulatorischer Wirkung in der lokalen Inflammationsantwort.

Im Gegensatz dazu führte die C5a Neutralisation zu einer tendenziell reduzierten systemischen Zytokinantwort in der septischen Phase der Pneumonie. Insbesondere zeigten sich nach Neutralisation mit NOX-D19 reduzierte Konzentrationen für G-CSF. Bosmann *et al.* fanden einen direkten Zusammenhang zwischen der Expression von G-CSF und den Spiegeln von C5a bei LPS-stimulierten peritonealen Makrophagen *in vivo*, was im Zusammenhang der Aktivierung des Phosphoinositol 3-Kinaseweges und Proteinkinase B Signalweges, den C5a aktiviert, interpretiert wurde (142). Abschließend können unsere Daten den protektiven Effekt durch eine

Modulation der systemischen Immunantwort in der schweren Pneumokokkenpneumonie nicht ausschließen, jedoch auch nicht beweisen. Dafür sind weitergehende Untersuchungen notwendig. [1]

Das therapeutische Eingreifen in die angeborene Immunantwort auf Infektionen birgt das Risiko der Immunsuppression. Das L-RNA-Aptamer NOX-D19 gewährleistet die Synthese des MAC, da das Spaltprodukt C5b zu dessen Bildung weiterhin zur Verfügung steht (31, 81). In dieser Dissertation wurde die Erregerlast in der BALF, im Blut und in der Milz gemessen. Die spezifische Neutralisation von C5a durch NOX-D19 zeigte als adjunktive Therapieoption keinen nachteiligen Einfluss auf die bakterielle Ausbreitung. [1]

In dem in dieser Arbeit verwendeten Pneumoniemodell entwickelten die Mäuse 48 h nach Infektion eine pneumogene Sepsis. Zusammen mit der beobachteten systemischen Entzündungsreaktion manifestierten sich in den Tiermodellen extrapulmonale Organfunktionsstörungen. Die Tiere entwickelten ein akutes Nierenversagen, was sich in Form eines Anstiegs von Harnstoff im Blutplasma widerspiegelte sowie Anzeichen einer akuten Leberinsuffizienz und eine damit verbundene Gestörte lokale Mikrozirkulationsstörung. [1]

Die Daten dieser Dissertation wiesen unter NOX-D19 behandelten Tieren einen hepatoprotektiven Effekt nach. Die Behandlung mit dem L-RNA-Aptamer NOX-D19 führte zu einer Reduktion der AST-Konzentration im Plasma *S. pneumoniae*-infizierter Tiere. Diverse *in vivo* Studien anderer Autoren zeigten vergleichbare Ergebnisse (29, 100, 143). Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Neutralisation von C5a mit NOX-D19 ebenfalls mit einer reduzierten Expression des zentralen Apoptoseeffektors Caspase 3 einherging (144, 145). Dies steht im Einklang mit dem aktuellen Kenntnisstand, dass C5a bei Inflammation in der Lage ist, extrinsisch über die Bereitstellung der Liganden TNF- α und Fas Ligand (80, 146) oder direkt über Induktion der Caspasen 3, 6 und 9 (80, 133, 147) die Apoptosekaskade zu aktivieren. Interessanterweise korreliert die Konzentration der im Blutplasma gemessenen Caspase 3 septischer Patienten mit deren 30 Tage Mortalität (144). Das könnte bedeuten, dass NOX-D19 mit seinem C5a neutralisierenden Effekt eine protektive Wirkung in der Therapie der pneumogenen Sepsis haben könnte.

Diskussion

Die Pneumokokkenpneumonie beeinflusst die hepatozelluläre Genexpression (148, 149). Über die Sekretion der *early-response* Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α und durch alveolär patrouillierende Alveolarmakrophagen wird in der Leber parallel zur lokalen Inflammationsantwort die Akute-Phase Reaktion eingeleitet (150, 151). Über die Induktion der Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF- κ B werden Akute-Phase Proteine wie Fibrinogen und Komplementfaktoren ins Plasma sezerniert (149, 152). Ferner werden im Rahmen der Aktivierung C5aR auf zunächst C5aR-naiven Hepatozyten exprimiert (148). Die Quantität der C5aR-Expression zeigt sich direkt abhängig von der Wirkdauer des septischen Milieus (153) und von der Konzentration von C5a und anderer entzündlicher Mediatoren (80, 154–158). Die Wechselwirkung von C5a an hepatozellulären C5aR geht mit gesteigertem Leberzellschaden einher (155). Dies könnte ein weiterer Erklärungsansatz der protektiven Wirkung der C5a Neutralisation in Bezug auf den hier provozierten Leberschaden in der pneumogenen Sepsis sein.

Die der Sepsis zugrundeliegende Mikrozirkulationsstörung begleitet die Pathogenese der Organdysfunktion und ist Prognose-bestimmend (159). Für C5a ist die Induktion der Expression von *tissue factor* (TF) auf Endothelzellen, Monozyten und PMN beschrieben (91, 160–162). Über die Konversion der Zellmembranen in prothrombotischen Oberflächen ist C5a direkt mit der intravaskulären Thrombenbildung in den Zusammenhang zu bringen (160). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Neutralisation von C5a durch NOX-D19 die Ablagerung von Fibrin in den Lebersinusoiden verhindern kann. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit anderen *in vivo* Studien, wenngleich sich die Ergebnisse aber auf das plasmatische Gerinnungssystem beziehen und Fibrinogen im Gewebe nicht immunhistochemisch untersucht worden ist (161, 98, 141, 163, 98, 141, 161, 163).

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Neutralisierung des Komplementfaktors C5a mittels NOX-D19 vor pulmonalvaskulärer Hyperpermeabilität schützt, wodurch sich auch der extravaskuläre Lungenwasserindex erheblich reduziert. Dieser ist mit einer höheren Mortalität assoziiert (164). Außerdem wurde die Entzündungsreaktion während der schweren Pneumonie gedämpft und die Leberschädigung in der Pneumokokkenpneumonie verringert. Bei Patienten mit schwerer Pneumonie sollte dies schließlich im Idealfall die Überlebenschancen verbessern, was jedoch in den murinen Modellen aufgrund von Einschränkungen nicht untersucht werden konnte. Denn die Infektionsdosis in dem in dieser Dissertation verwendeten Pneumoniemodell ist letal. Das führt zu einem schweren Verlauf der Pneumonie was sich in der Entwicklung von

substanziellen Organfunktionsstörungen zeigt. Ohne antiinfektive Therapie würden die Versuchstiere die Sepsis nicht überleben. Unter einer zusätzlichen Therapie mit Antibiotika kommt es im späteren Verlauf der Erkrankung nicht zu Organversagen, so dass adjunktive Therapiestrategien nicht valide getestet werden können (165). Daher sind diese Modelle ohne Einsatz antiinfektiver Medikamente für die Untersuchung adjunktiver Therapiestrategien besonders wertvoll. Die Untersuchungen haben sich daher auf geeignete objektivierbare Parameter wie z. B. das Aussehen von Augen und Fell der Mäuse oder deren Aktivitätsniveau und Verhalten gestützt. Hier zeigte sich infolge der C5a Neutralisation in der schweren Pneumokokkenpneumonie insgesamt ein besseres klinisches *Outcome*, was die klinische Relevanz der Ergebnisse unterstreicht (127). [1]

Die Aussagekraft der gewählten murinen Modelle ist in ihrer Übertragbarkeit auf die humane Pneumokokkenpneumonie naturgemäß limitiert. Schlussfolgerungen aus Tiermodellen, hier ein Inzuchtmausstamm mit ausschließlich weiblichen, gleichaltrigen sowie gesunden Individuen, lässt sich nicht auf ein Patientenkollektiv übertragen, das in Alter, Geschlecht und Komorbiditäten sowie genetischem Hintergrund weitaus heterogener ist. Hier werden letztlich klinische Studien benötigt, die den Ansatz der C5a Neutralisation bei Patienten mit schwerer Pneumonie untersuchen.

Zusammenfassend demonstrieren die in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse signifikant erhöhte Konzentrationen des Anaphylatoxins C5a in Patienten mit CAP. In 2 Mausmodellen der schweren Pneumokokkenpneumonie schützte die Neutralisierung von C5a mit dem L-RNA-Aptamer NOX-D19 die Tiere vor pulmonalvaskulärer Hyperpermeabilität und akuter Leberschädigung. Diese Effekte waren mit keiner Beeinträchtigung der Immunreaktion der Tiere assoziiert. Der frühzeitige Einsatz von NOX-D19 als adjuvante Therapiestrategie in der schweren CAP könnte demnach ein vielversprechender neuer Ansatz zur Verbesserung der Schwere der Erkrankung sein. [1]

Literaturverzeichnis

1. Müller-Redetzky H, Kellermann U, Wienhold S-M, Gutbier B, Lienau J, Hellwig K, Reppe K, Letsiou E, Tschernig T, Scholz M, Ahnert P, Maasch C, Hoehlig K, Klussmann S, Vater A, Firsching TC, Hoppe J, Suttorp N, Witzenrath M. Neutralizing Complement C5a Protects Mice with Pneumococcal Pulmonary Sepsis. *Anesthesiology* 2020; 132(4):795–807.
2. World Health Organisation (WHO). Pneumonia fact sheet (online); 2016 [cited 2016 Nov 13]. Available from: URL: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>.
3. Blasi F, Akova M, Bonanni P, Dartois N, Sauty E, Webber C, Torres A. Community-acquired pneumonia in adults: Highlighting missed opportunities for vaccination. *Eur J Intern Med* 2017; 37:13–8.
4. Schnoor M, Hedicke J, Dalhoff K, Raspe H, Schäfer T. Approaches to estimate the population-based incidence of community acquired pneumonia. *J Infect* 2007; 55(3):233–9.
5. Drijkoningen JJC, Rohde GGU. Pneumococcal infection in adults: burden of disease. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20 Suppl 5:45–51.
6. CAPNETZ - Network of excellence Community Acquired Pneumonia (online). Die ambulant erworbene Pneumonie; 2012 [cited 2016 Nov 13]. Available from: URL: <http://www.capnetz.de/html/capnetz/project>.
7. José RJ, Perisleris JN, Brown JS. Community-acquired pneumonia. *Curr Opin Pulm Med* 2015; 21(3):212–8.
8. Kothe H, Bauer T, Marre R, Suttorp N, Welte T, Dalhoff K. Outcome of community-acquired pneumonia: influence of age, residence status and antimicrobial treatment. *Eur Respir J* 2008; 32(1):139–46.
9. Hämäläinen N. 020-0201_S3_ambulant_erworbene_Pneumonie_Behandlung_Praevention_2016-02-2: S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie, des Kompetenznetzwerks CAPNETZ, der Österreichischen Gesellschaft für Pneumologie, der Österreichischen Gesellschaft für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin und der Schweizerischen Gesellschaft für Pneumologie: Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention - Update 2016 (online) 2016 [cited 2016 Nov 13]. Available from: URL: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-0201_S3_ambulant_erworbene_Pneumonie_Behandlung_Praevention_2016-02-2.pdf.
10. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016; 388(10053):1459–544.
11. Pletz MW, Rohde G, Schütte H, Bals R, Baum H von, Welte T. Epidemiologie und Erreger bei ambulant erworbener Pneumonie (CAP). *Dtsch Med Wochenschr* 2011; 136(15):775–80.
12. Torres A, Blasi F, Peetermans WE, Viegli G, Welte T. The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33(7):1065–79.
13. Dockrell DH, Whyte MKB, Mitchell TJ. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. *Chest* 2012; 142(2):482–91.
14. Mitchell AM, Mitchell TJ. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(5):411–8.

15. Brown LR, Caulkins RC, Schartel TE, Rosch JW, Honsa ES, Schultz-Cherry S, Meliopoulos VA, Cherry S, Thornton JA. Increased Zinc Availability Enhances Initial Aggregation and Biofilm Formation of *Streptococcus pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7:233.
16. Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol* 2012; 14(4):460–6.
17. Nau R, Eiffert H. Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(1):95–110.
18. Herold S, Gabrielli NM, Vadász I. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013; 305(10):L665–81.
19. Mongardon N, Max A, Bouglé A, Pène F, Lemiale V, Charpentier J, Cariou A, Chiche J-D, Bedos J-P, Mira J-P. Epidemiology and outcome of severe pneumococcal pneumonia admitted to intensive care unit: a multicenter study. *Crit Care* 2012; 16(4):R155.
20. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193(3):259–72.
21. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8):801–10.
22. Fleischmann-Struzek C, Mikolajetz A, Schwarzkopf D, Cohen J, Hartog CS, Pletz M, Gastmeier P, Reinhart K. Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany. *Intensive Care Med* 2018; 44(11):1826–35.
23. Mellhammar L, Wullt S, Lindberg Å, Lanbeck P, Christensson B, Linder A. Sepsis Incidence: A Population-Based Study. *Open Forum Infect Dis* 2016 [cited 2020 Feb 25]; 3(4):ofw207. Available from: URL: <https://www.sepsis-stiftung.eu/wp-content/uploads/1/2019/03/Faktenblatt.pdf>.
24. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kissoon N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado FR, Reinhart KK, Rowan K, Seymour CW, Watson RS, West TE, Marinho F, Hay SI, Lozano R, Lopez AD, Angus DC, Murray CJL, Naghavi M. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2020; 395(10219):200–11.
25. Prina E, Ranzani OT, Torres A. Community-acquired pneumonia. *Lancet* 2015; 386(9998):1097–108.
26. Nguyen HB, Jaehne AK, Jayaprakash N, Semler MW, Hegab S, Yataco AC, Tatem G, Salem D, Moore S, Boka K, Gill JK, Gardner-Gray J, Pflaum J, Domecq JP, Hurst G, Belsky JB, Fowkes R, Elkin RB, Simpson SQ, Falk JL, Singer DJ, Rivers EP. Early goal-directed therapy in severe sepsis and septic shock: insights and comparisons to ProCESS, ProMISE, and ARISE. *Crit Care* 2016; 20(1):160.
27. Kumar A, Haery C, Parrillo JE. Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Clin* 2000; 16(2):251–87.
28. Zanotti-Cavazzoni SL, Hollenberg SM. Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care* 2009; 15(5):392–7.

29. Huber-Lang M, Sarma VJ, Lu KT, McGuire SR, Padgaonkar VA, Guo RF, Younkin EM, Kunkel RG, Ding J, Erickson R, Curnutte JT, Ward PA. Role of C5a in multiorgan failure during sepsis. *J Immunol* 2001; 166(2):1193–9.
30. Ward PA. The harmful role of c5a on innate immunity in sepsis. *J Innate Immun* 2010; 2(5):439–45.
31. Ward PA, Guo R-F, Riedemann NC. Manipulation of the complement system for benefit in sepsis. *Crit Care Res Pract* 2012; 2012:427607.
32. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent J-L. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2:16045.
33. Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, Machado FR, Schachter RD, Finfer S. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *N Engl J Med* 2017; 377(5):414–7.
34. Randolph AG, McCulloh RJ. Pediatric sepsis: important considerations for diagnosing and managing severe infections in infants, children, and adolescents. *Virulence* 2014; 5(1):179–89.
35. Bhattacharjee P, Edelson DP, Churpek MM. Identifying Patients With Sepsis on the Hospital Wards. *Chest* 2017; 151(4):898–907.
36. Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, Friedrich ME, Iwashyna TJ, Phillips GS, Lemeshow S, Osborn T, Terry KM, Levy MM. Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. *N Engl J Med* 2017; 376(23):2235–44.
37. Jimenez MF, Marshall JC. Source control in the management of sepsis. *Intensive Care Med* 2001; 27 Suppl 1:S49-62.
38. Martínez ML, Ferrer R, Torrents E, Guillaumat-Prats R, Gomà G, Suárez D, Álvarez-Rocha L, Pozo Laderas JC, Martín-Loeches I, Levy MM, Artigas A. Impact of Source Control in Patients With Severe Sepsis and Septic Shock. *Crit Care Med* 2017; 45(1):11–9.
39. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochwerg B, Rubenfeld GD, Angus DC, Annane D, Beale RJ, Bellingham GJ, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith C, Backer DP de, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ, Singer M, Thompson BT, Townsend SR, van der Poll T, Vincent J-L, Wiersinga WJ, Zimmerman JL, Dellinger RP. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* 2017; 43(3):304–77.
40. Russell JA. Vasopressor therapy in critically ill patients with shock. *Intensive Care Med* 2019; 45(11):1503–17.
41. Keh D, Trips E, Marx G, Wirtz SP, Abduljawwad E, Bercker S, Bogatsch H, Briegel J, Engel C, Gerlach H, Goldmann A, Kuhn S-O, Hüter L, Meier-Hellmann A, Nierhaus A, Kluge S, Lehmke J, Loeffler M, Oppert M, Resener K, Schädler D, Schuerholz T, Simon P, Weiler N, Weyland A, Reinhart K, Brunkhorst FM. Effect of Hydrocortisone on Development of Shock Among Patients With Severe Sepsis: The HYPRESS Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016; 316(17):1775–85.
42. Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis (online). *Dtsch Arztebl Int* 2016 [cited 2016 Oct 23]; 113(10):159–66. Available from: URL: http://www.sepsis-stiftung.eu/wp-content/uploads/1/2016/10/Sepsis_inDeutschland.pdf.

43. Trouw LA, Daha MR. Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol Lett* 2011; 138(1):35–7.
44. Markiewski MM, Lambris JD. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol* 2007; 171(3):715–27.
45. Mathern DR, Heeger PS. Molecules Great and Small: The Complement System. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015; 10(9):1636–50.
46. Beinrohr L, Dobó J, Závodszy P, Gál P. C1, MBL-MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation. *Trends Mol Med* 2008; 14(12):511–21.
47. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol* 2015; 6:262.
48. Murphy KM, Weaver C. *Janeway Immunologie*. 9. Auflage. Berlin, Germany: Springer Spektrum; 2018. (Lehrbuch).
49. Tartey S, Takeuchi O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *Int Rev Immunol* 2017; 36(2):57–73.
50. Kumar S, Ingle H, Prasad DVR, Kumar H. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit Rev Microbiol* 2013; 39(3):229–46.
51. Kishore U, Ghai R, Greenhough TJ, Shrive AK, Bonifati DM, Gadjeva MG, Waters P, Kojouharova MS, Chakraborty T, Agrawal A. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunol Lett* 2004; 95(2):113–28.
52. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; 11(9):785–97.
53. Rawal N, Pangburn M. Formation of high-affinity C5 convertases of the alternative pathway of complement. *J Immunol* 2001; 166(4):2635–42.
54. Lombardo-Quezada J, Sanclemente G, Colmenero J, Español-Rego M, Arias MT, Ruiz P, Mauro E, Sastre L, Crespo G, Rimola A, Moreno A, Lozano F, Navasa M. Mannose-Binding Lectin-Deficient Donors Increase the Risk of Bacterial Infection and Bacterial Infection-Related Mortality After Liver Transplantation. *Am J Transplant* 2018; 18(1):197–206.
55. van Kempen G, Meijvis S, Endeman H, Vlamincx B, Meek B, Jong B de, Rijkers G, Bos WJ. Mannose-binding lectin and I-ficolin polymorphisms in patients with community-acquired pneumonia caused by intracellular pathogens. *Immunology* 2017; 151(1):81–8.
56. Lappegård KT, Bjerre A, Tjønnfjord GE, Mollnes TE. Therapeutic complement inhibition – from experimental to clinical medicine. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2015; 135(19):1745–9.
57. Yongqing T, Drentin N, Duncan RC, Wijeyewickrema LC, Pike RN. Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: two genes, five proteins and many functions? *Biochim Biophys Acta* 2012; 1824(1):253–62.
58. Holmskov UL. Collectins and collectin receptors in innate immunity. *APMIS Suppl* 2000; 100:1–59.
59. Rosbjerg A, Genster N, Pilely K, Garred P. Evasion Mechanisms Used by Pathogens to Escape the Lectin Complement Pathway. *Front Microbiol* 2017; 8:868.
60. Thiel S, Gadjeva M. Humoral pattern recognition molecules: mannan-binding lectin and ficolins. *Adv Exp Med Biol* 2009; 653:58–73.

61. Riihilä P, Nissinen L, Farshchian M, Kallajoki M, Kivisaari A, Meri S, Grénman R, Peltonen S, Peltonen J, Pihlajaniemi T, Heljasvaara R, Kähäri V-M. Complement Component C3 and Complement Factor B Promote Growth of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Am J Pathol* 2017; 187(5):1186–97.
62. Hughes AE, Mullan GM, Bradley DT. Complement factor B polymorphism 32W protects against age-related macular degeneration. *Mol Vis* 2011; 17:983–8.
63. Rodriguez E, Nan R, Li K, Gor J, Perkins SJ. A revised mechanism for the activation of complement C3 to C3b: a molecular explanation of a disease-associated polymorphism. *J Biol Chem* 2015; 290(4):2334–50.
64. Leshner AM, Nilsson B, Song W-C. Properdin in complement activation and tissue injury. *Mol Immunol* 2013; 56(3):191–8.
65. Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol* 2007; 179(4):2600–8.
66. Guo R-F, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:821–52.
67. Pangburn MK, Rawal N. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(Pt 6):1006–10.
68. Bayly-Jones C, Bubeck D, Dunstone MA. The mystery behind membrane insertion: a review of the complement membrane attack complex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2017; 372(1726).
69. Aleshin AE, DiScipio RG, Stec B, Liddington RC. Crystal structure of C5b-6 suggests structural basis for priming assembly of the membrane attack complex. *J Biol Chem* 2012; 287(23):19642–52.
70. Dudkina NV, Spicer BA, Reboul CF, Conroy PJ, Lukoyanova N, Elmlund H, Law RHP, Ekkel SM, Kondos SC, Goode RJA, Ramm G, Whisstock JC, Saibil HR, Dunstone MA. Structure of the poly-C9 component of the complement membrane attack complex. *Nat Commun* 2016; 7:10588.
71. Doorduyn DJ, Rooijackers SHM, Heesterbeek DAC. How the Membrane Attack Complex Damages the Bacterial Cell Envelope and Kills Gram-Negative Bacteria. *Bioessays* 2019; 41(10):e1900074.
72. Denk S, Neher MD, Messerer DAC, Wiegner R, Nilsson B, Rittirsch D, Nilsson-Ekdahl K, Weckbach S, Ignatius A, Kalbitz M, Gebhard F, Weiss ME, Vogt J, Radermacher P, Köhl J, Lambris JD, Huber-Lang MS. Complement C5a Functions as a Master Switch for the pH Balance in Neutrophils Exerting Fundamental Immunometabolic Effects. *J Immunol* 2017; 198(12):4846–54.
73. Zhang T, Garstka MA, Li K. The Controversial C5a Receptor C5aR2: Its Role in Health and Disease. *J Immunol Res* 2017; 2017:8193932.
74. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol* 2015; 6:257.
75. Bamberg CE, Mackay CR, Lee H, Zahra D, Jackson J, Lim YS, Whitfield PL, Craig S, Corsini E, Lu B, Gerard C, Gerard NP. The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 2010; 285(10):7633–44.

76. Russkamp NF, Ruemmler R, Roewe J, Moore BB, Ward PA, Bosmann M. Experimental design of complement component 5a-induced acute lung injury (C5a-ALI): a role of CC-chemokine receptor type 5 during immune activation by anaphylatoxin. *FASEB J* 2015; 29(9):3762–72.
77. Karsten CM, Wiese AV, Mey F, Figge J, Woodruff TM, Reuter T, Scurtu O, Kordowski A, Almeida LN, Briukhovetska D, Quell KM, Sun J, Ender F, Schmutde I, Vollbrandt T, Laumonier Y, Köhl J. Monitoring C5aR2 Expression Using a Floxed tdTomato-C5aR2 Knock-In Mouse. *J Immunol* 2017; 199(9):3234–48.
78. Wang R, Lu B, Gerard C, Gerard NP. C5L2, the Second C5a Anaphylatoxin Receptor, Suppresses LPS-Induced Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016; 55(5):657–66.
79. Lee H, Whitfeld PL, Mackay CR. Receptors for complement C5a. The importance of C5aR and the enigmatic role of C5L2. *Immunol Cell Biol* 2008; 86(2):153–60.
80. Ward PA. Role of C5 activation products in sepsis. *ScientificWorldJournal* 2010; 10:2395–402.
81. Jore MM, Johnson S, Sheppard D, Barber NM, Li YI, Nunn MA, Elmlund H, Lea SM. Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5. *Nat Struct Mol Biol* 2016; 23(5):378–86.
82. Laudisi F, Spreafico R, Evrard M, Hughes TR, Mandriani B, Kandasamy M, Morgan BP, Sivasankar B, Mortellaro A. Cutting edge: the NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1 β release. *J Immunol* 2013; 191(3):1006–10.
83. Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol* 2011; 6:147–63.
84. Scheiermann C, Kunisaki Y, Jang J-E, Frenette PS. Neutrophil microdomains: linking heterocellular interactions with vascular injury. *Curr Opin Hematol* 2010; 17(1):25–30.
85. Liu Z, Zhu S, Qin X, Cheng Z, Liu M, Zhang H, Liu D. Silencing of C5a receptor gene with siRNA for protection from Gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced vascular permeability. *Mol Immunol* 2010; 47(6):1325–33.
86. Rodrigues SF, Granger DN. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers* 2015; 3(1-2):e978720.
87. Hoppensteadt D, Tsuruta K, Hirman J, Kaul I, Osawa Y, Fareed J. Dysregulation of inflammatory and hemostatic markers in sepsis and suspected disseminated intravascular coagulation. *Clin Appl Thromb Hemost* 2015; 21(2):120–7.
88. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454(7203):428–35.
89. Ikeda K, Nagasawa K, Horiuchi T, Tsuru T, Nishizaka H, Niho Y. C5a induces tissue factor activity on endothelial cells. *Thromb Haemost* 1997; 77(2):394–8.
90. Ritis K, Doulas M, Mastellos D, Micheli A, Giaglis S, Magotti P, Rafail S, Kartalis G, Sideras P, Lambris JD. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol* 2006; 177(7):4794–802.
91. Ward PA, Gao H. Sepsis, complement and the dysregulated inflammatory response. *J Cell Mol Med* 2009; 13(10):4154–60.
92. Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol* 2007; 28(4):184–92.

93. Wojta J, Huber K, Valent P. New aspects in thrombotic research: complement induced switch in mast cells from a profibrinolytic to a prothrombotic phenotype. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33(5-6):438–41.
94. Wojta J, Kaun C, Zorn G, Ghannadan M, Hauswirth AW, Sperr WR, Fritsch G, Printz D, Binder BR, Schatzl G, Zwirner J, Maurer G, Huber K, Valent P. C5a stimulates production of plasminogen activator inhibitor-1 in human mast cells and basophils. *Blood* 2002; 100(2):517–23.
95. Proctor LM, Strachan AJ, Woodruff TM, Mahadevan IB, Williams HM, Shiels IA, Taylor SM. Complement inhibitors selectively attenuate injury following administration of cobra venom factor to rats. *Int Immunopharmacol* 2006; 6(8):1224–32.
96. Dong H, Shan F, Sun Q, Yang B-X, Li C-P. The cyclic hexapeptide AcF attenuates sepsis-induced acute lung injury and mortality in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18(18):2727–35.
97. Gao H, Neff TA, Guo R-F, Speyer CL, Sarma JV, Tomlins S, Man Y, Riedemann NC, Hoesel LM, Younkin E, Zetoune FS, Ward PA. Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. *FASEB J* 2005; 19(8):1003–5.
98. Keshari RS, Silasi R, Popescu NI, Patel MM, Chaaban H, Lupu C, Coggeshall KM, Mollnes TE, DeMarco SJ, Lupu F. Inhibition of complement C5 protects against organ failure and reduces mortality in a baboon model of *Escherichia coli* sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114(31):E6390-E6399.
99. Koelman DLH, Brouwer MC, van de Beek D. Targeting the complement system in bacterial meningitis. *Brain* 2019; 142(11):3325–37.
100. Hoehlig K, Maasch C, Shushakova N, Buchner K, Huber-Lang M, Purschke WG, Vater A, Klussmann S. A novel C5a-neutralizing mirror-image (l-)aptamer prevents organ failure and improves survival in experimental sepsis. *Mol Ther* 2013; 21(12):2236–46.
101. Khan MA, Maasch C, Vater A, Klussmann S, Morser J, Leung LL, Atkinson C, Tomlinson S, Heeger PS, Nicolls MR. Targeting complement component 5a promotes vascular integrity and limits airway remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(15):6061–6.
102. Wilson MR, Takata M. Inflammatory mechanisms of ventilator-induced lung injury: a time to stop and think? *Anaesthesia* 2013; 68(2):175–8.
103. Klapsing P, Moerer O. Beatmung bei Sepsis – Standards und Innovationen. *Klinikarzt* 2014; 43(06):302–7.
104. Beitler JR, Malhotra A, Thompson BT. Ventilator-induced Lung Injury. *Clin Chest Med* 2016; 37(4):633–46.
105. Petersen B, Busch T, Gaertner J, Haitsma JJ, Krabbendam S, Ebsen M, Lachmann B, Kaisers UX. Complement activation contributes to ventilator-induced lung injury in rats. *J Physiol Pharmacol* 2016; 67(6):911–8.
106. Spieth PM, Koch T, Gama de Abreu M. Approaches to ventilation in intensive care. *Dtsch Arztebl Int* 2014; 111(42):714–20.
107. Brower RG, Matthay MA, Morris A, Schoenfeld D, Thompson BT, Wheeler A. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342(18):1301–8.
108. Müller-Redetzky HC, Felten M, Hellwig K, Wienhold S-M, Naujoks J, Opitz B, Kershaw O, Gruber AD, Suttrop N, Witzernath M. Increasing the inspiratory time and I:E ratio during mechanical ventilation aggravates ventilator-induced lung injury in mice. *Crit Care* 2015; 19:23.

109. Petrucci N, Feo C de. Lung protective ventilation strategy for the acute respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; (2):CD003844.
110. Gattinoni L, Tonetti T, Quintel M. Intensive care medicine in 2050: ventilator-induced lung injury. *Intensive Care Med* 2018; 44(1):76–8.
111. Wienhold S-M, Macrì M, Nouailles G, Dietert K, Gurtner C, Gruber AD, Heimesaat MM, Lienau J, Schumacher F, Kleuser B, Opitz B, Suttorp N, Witzernath M, Müller-Redetzky HC. Ventilator-induced lung injury is aggravated by antibiotic mediated microbiota depletion in mice. *Crit Care* 2018; 22(1):282.
112. Needham DM, Yang T, Dinglas VD, Mendez-Tellez PA, Shanholtz C, Sevransky JE, Brower RG, Pronovost PJ, Colantuoni E. Timing of low tidal volume ventilation and intensive care unit mortality in acute respiratory distress syndrome. A prospective cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191(2):177–85.
113. Silva PL, Negrini D, Rocco PRM. Mechanisms of ventilator-induced lung injury in healthy lungs. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2015; 29(3):301–13.
114. Plataki M, Hubmayr RD. The physical basis of ventilator-induced lung injury. *Expert Rev Respir Med* 2010; 4(3):373–85.
115. Han B, Lodyga M, Liu M. Ventilator-induced lung injury: role of protein-protein interaction in mechanosensation. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2(3):181–7.
116. Pittet JF, Griffiths MJ, Geiser T, Kaminski N, Dalton SL, Huang X, Brown LA, Gotwals PJ, Koteliansky VE, Matthay MA, Sheppard D. TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest* 2001; 107(12):1537–44.
117. Belperio JA, Keane MP, Lynch JP, Strieter RM. The role of cytokines during the pathogenesis of ventilator-associated and ventilator-induced lung injury. *Semin Respir Crit Care Med* 2006; 27(4):350–64.
118. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CR. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1998; 338(6):347–54.
119. Liu K, Mao Y-F, Zheng J, Peng Z-Y, Liu W-W, Liu Y, Xu W-G, Sun X-J, Jiang C-L, Jiang L. SC5b-9-induced pulmonary microvascular endothelial hyperpermeability participates in ventilator-induced lung injury. *Cell Biochem Biophys* 2013; 67(3):1421–31.
120. Verbrugge SJC, Lachmann B, Kesecioglu J. Lung protective ventilatory strategies in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: from experimental findings to clinical application. *Clin Physiol Funct Imaging* 2007; 27(2):67–90.
121. Müller-Redetzky HC, Will D, Hellwig K, Kummer W, Tschernig T, Pfeil U, Paddenberg R, Menger MD, Kershaw O, Gruber AD, Weissmann N, Hippenstiel S, Suttorp N, Witzernath M. Mechanical ventilation drives pneumococcal pneumonia into lung injury and sepsis in mice: protection by adrenomedullin. *Crit Care* 2014; 18(2):R73.
122. Ranieri VM, Giunta F, Suter PM, Slutsky AS. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 2000; 284(1):43–4.
123. Beer FM de, Aslami H, Hoeksma J, van Mierlo G, Wouters D, Zeerleder S, Roelofs JJTH, Juffermans NP, Schultz MJ, Lagrand WK. Plasma-derived human C1-esterase inhibitor does not prevent mechanical ventilation-induced pulmonary complement activation in a rat model of *Streptococcus pneumoniae* pneumonia. *Cell Biochem Biophys* 2014; 70(2):795–803.

124. Suttorp N, Welte T, Marre R, Stenger S, Pletz M, Rupp J, Schütte H, Rohde G. CAPNETZ. Das Kompetenzzentrum für ambulant erworbene Pneumonie. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2016; 59(4):475–81.
125. Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax* 2012; 67(1):71–9.
126. CAPNETZ - Network of excellence Community Acquired Pneumonia (online); 2018 [cited 2018 Dec 15]. Available from: URL: [https://www.capnetz.de/html/progress/P-CAP?capnetzsid=\(15.12.2018\)](https://www.capnetz.de/html/progress/P-CAP?capnetzsid=(15.12.2018)).
127. Berger S, Goekeri C, Gupta SK, Vera J, Dietert K, Behrendt U, Lienau J, Wienhold S-M, Gruber AD, Suttorp N, Witzernath M, Nouailles G. Delay in antibiotic therapy results in fatal disease outcome in murine pneumococcal pneumonia. *Crit Care* 2018; 22(1):287.
128. Gressner OA, Koch A, Sanson E, Trautwein C, Tacke F. High C5a levels are associated with increased mortality in sepsis patients--no enhancing effect by actin-free Gc-globulin. *Clin Biochem* 2008; 41(12):974–80.
129. Gardinali M, Padalino P, Vesconi S, Calcagno A, Ciappellano S, Conciato L, Chiara O, Agostoni A, Nespoli A. Complement activation and polymorphonuclear neutrophil leukocyte elastase in sepsis. Correlation with severity of disease. *Arch Surg* 1992; 127(10):1219–24.
130. Stöve S, Welte T, Wagner TO, Kola A, Klos A, Bautsch W, Köhl J. Circulating complement proteins in patients with sepsis or systemic inflammatory response syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3(2):175–83.
131. Fang Y-Y, Shao R, Yu H, Zhang Q, Wang M-M, Li C-S. Prognostic significance of C5a2 on polymorphonuclear neutrophil and C5a2intra/C5a2 ratio level for early sepsis in an ED. *Am J Emerg Med* 2016; 34(11):2084–9.
132. Riedemann NC, Guo R-F, Ward PA. A key role of C5a/C5aR activation for the development of sepsis. *J Leukoc Biol* 2003; 74(6):966–70.
133. Riedemann NC, Guo R-F, Laudes IJ, Keller K, Sarma VJ, Padgaonkar V, Zetoune FS, Ward PA. C5a receptor and thymocyte apoptosis in sepsis. *FASEB J* 2002; 16(8):887–8.
134. Witzernath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, Mitchell TJ, los Toyos JR de, Rosseau S, Suttorp N, Schütte H. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 2006; 34(7):1947–54.
135. Reppe K, Tschernig T, Lührmann A, van Laak V, Grote K, Zemlin MV, Gutbier B, Müller HC, Kursar M, Schütte H, Rosseau S, Pabst R, Suttorp N, Witzernath M. Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 40(4):474–81.
136. Doehn JM, Fischer K, Reppe K, Gutbier B, Tschernig T, Hocke AC, Fischetti VA, Löffler J, Suttorp N, Hippenstiel S, Witzernath M. Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(9):2111–7.
137. Müller HC, Hellwig K, Rosseau S, Tschernig T, Schmiedl A, Gutbier B, Schmeck B, Hippenstiel S, Peters H, Morawietz L, Suttorp N, Witzernath M. Simvastatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Crit Care* 2010; 14(4):R143.
138. Yatime L, Maasch C, Hoehlig K, Klussmann S, Andersen GR, Vater A. Structural basis for the targeting of complement anaphylatoxin C5a using a mixed L-RNA/L-DNA aptamer. *Nat Commun* 2015; 6:6481.

139. Huber-Lang MS, Sarma JV, McGuire SR, Lu KT, Guo RF, Padgaonkar VA, Younkin EM, Laudes IJ, Riedemann NC, Younger JG, Ward PA. Protective effects of anti-C5a peptide antibodies in experimental sepsis. *FASEB J* 2001; 15(3):568–70.
140. Parker C. Eculizumab for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet* 2009; 373(9665):759–67.
141. Egge KH, Thorgersen EB, Pischke SE, Lindstad JK, Pharo A, Bongoni AK, Rieben R, Nunn MA, Barratt-Due A, Mollnes TE. Organ inflammation in porcine *Escherichia coli* sepsis is markedly attenuated by combined inhibition of C5 and CD14. *Immunobiology* 2015; 220(8):999–1005.
142. Bosmann M, Haggadone MD, Zetoune FS, Sarma JV, Ward PA. The interaction between C5a and both C5aR and C5L2 receptors is required for production of G-CSF during acute inflammation. *Eur J Immunol* 2013; 43(7):1907–13.
143. Lei Y-C, Lu C-L, Chen L, Ge K, Yang L-L, Li W, Wu Y-H. C5a/C5aR pathway is essential for up-regulating SphK1 expression through p38-MAPK activation in acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2016; 22(46):10148–57.
144. Lorente L, Martín MM, Pérez-Cejas A, González-Rivero AF, López RO, Ferreres J, Solé-Violán J, Labarta L, Díaz C, Palmero S, Jiménez A. Sustained high serum caspase-3 concentrations and mortality in septic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 37(2):281–8.
145. Messer MP, Kellermann P, Weber SJ, Hohmann C, Denk S, Klohs B, Schultze A, Braumüller S, Huber-Lang MS, Perl M. Silencing of fas, fas-associated via death domain, or caspase 3 differentially affects lung inflammation, apoptosis, and development of trauma-induced septic acute lung injury. *Shock* 2013; 39(1):19–27.
146. Lionetti V, Recchia FA, Ranieri VM. Overview of ventilator-induced lung injury mechanisms. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11(1):82–6.
147. Ward PA. Sepsis, apoptosis and complement. *Biochem Pharmacol* 2008; 76(11):1383–8.
148. Quinton LJ, Blahna MT, Jones MR, Allen E, Ferrari JD, Hilliard KL, Zhang X, Sabharwal V, Algül H, Akira S, Schmid RM, Pelton SI, Spira A, Mizgerd JP. Hepatocyte-specific mutation of both NF- κ B RelA and STAT3 abrogates the acute phase response in mice. *J Clin Invest* 2012; 122(5):1758–63.
149. Crispe IN. Hepatocytes as Immunological Agents. *J Immunol* 2016; 196(1):17–21.
150. Quinton LJ, Jones MR, Robson BE, Mizgerd JP. Mechanisms of the hepatic acute-phase response during bacterial pneumonia. *Infect Immun* 2009; 77(6):2417–26.
151. Goldstein I, Paakinaho V, Baek S, Sung M-H, Hager GL. Synergistic gene expression during the acute phase response is characterized by transcription factor assisted loading. *Nat Commun* 2017; 8(1):1849.
152. Quinton LJ, Mizgerd JP. Dynamics of lung defense in pneumonia: resistance, resilience, and remodeling. *Annu Rev Physiol* 2015; 77:407–30.
153. Riedemann NC, Guo R-F, Neff TA, Laudes IJ, Keller KA, Sarma VJ, Markiewski MM, Mastellos D, Strey CW, Pierson CL, Lambris JD, Zetoune FS, Ward PA. Increased C5a receptor expression in sepsis. *J Clin Invest* 2002; 110(1):101–8.
154. Koleva M, Schlaf G, Landmann R, Götze O, Jungermann K, Schieferdecker HL. Induction of anaphylatoxin C5a receptors in rat hepatocytes by lipopolysaccharide in vivo: mediation by interleukin-6 from Kupffer cells. *Gastroenterology* 2002; 122(3):697–708.

155. Sun S, Guo Y, Zhao G, Zhou X, Li J, Hu J, Yu H, Chen Y, Song H, Qiao F, Xu G, Yang F, Wu Y, Tomlinson S, Duan Z, Zhou Y. Complement and the alternative pathway play an important role in LPS/D-GalN-induced fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2011; 6(11):e26838.
156. Laudes IJ, Chu JC, Huber-Lang M, Guo R-F, Riedemann NC, Sarma JV, Mahdi F, Murphy HS, Speyer C, Lu KT, Lambris JD, Zetoune FS, Ward PA. Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *J Immunol* 2002; 169(10):5962–70.
157. Riedemann NC, Guo R-F, Sarma VJ, Laudes IJ, Huber-Lang M, Warner RL, Albrecht EA, Speyer CL, Ward PA. Expression and function of the C5a receptor in rat alveolar epithelial cells. *J Immunol* 2002; 168(4):1919–25.
158. Drouin SM, Kildsgaard J, Haviland J, Zabner J, Jia HP, McCray PB, Tack BF, Wetsel RA. Expression of the complement anaphylatoxin C3a and C5a receptors on bronchial epithelial and smooth muscle cells in models of sepsis and asthma. *J Immunol* 2001; 166(3):2025–32.
159. Charlton M, Sims M, Coats T, Thompson JP. The microcirculation and its measurement in sepsis. *J Intensive Care Soc* 2017; 18(3):221–7.
160. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 2008; 83(3):536–45.
161. Laudes IJ, Chu JC, Sikranth S, Huber-Lang M, Guo R-F, Riedemann N, Sarma JV, Schmaier AH, Ward PA. Anti-c5a ameliorates coagulation/fibrinolytic protein changes in a rat model of sepsis. *Am J Pathol* 2002; 160(5):1867–75.
162. Kambas K, Markiewski MM, Pneumatikos IA, Rafail SS, Theodorou V, Konstantonis D, Kourtzelis I, Doumas MN, Magotti P, Deangelis RA, Lambris JD, Ritis KD. C5a and TNF- α up-regulate the expression of tissue factor in intra-alveolar neutrophils of patients with the acute respiratory distress syndrome. *J Immunol* 2008; 180(11):7368–75.
163. Øvstebø R, Hellum M, Aass HCD, Trøseid AM, Brandtzaeg P, Mollnes TE, Henriksson CE. Microparticle-associated tissue factor activity is reduced by inhibition of the complement protein 5 in *Neisseria meningitidis*-exposed whole blood. *Innate Immun* 2014; 20(5):552–60.
164. Jozwiak M, Teboul J-L, Monnet X. Extravascular lung water in critical care: recent advances and clinical applications. *Ann Intensive Care* 2015; 5(1):38.
165. Müller-Redetzky HC, Wienhold SM, Berg J, Hocke AC, Hippenstiel S, Hellwig K, Gutbier B, Opitz B, Neudecker J, Rückert J, Gruber AD, Kershaw O, Mayer K, Suttorp N, Witzent-rath M. Moxifloxacin is not anti-inflammatory in experimental pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70(3):830–40.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ute Kellermann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Die Neutralisation des Komplementfaktors C5a in der Pneumokokken-induzierten murinen Pneumonie und Sepsis“ („Neutralization of the Complement Factor C5a in murine Pneumococcal-induced Pneumonia and Sepsis“) selbständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer un-wahren eidesstattlichen Versicherung (§§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Ute Kellermann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Müller-Redetzky H, Kellermann U, Wienhold SM, Gutbier B, Lienau J, Hellwig K, Reppe K, Letsiou E, Tschernig T, Scholz M, Ahnert P, Maasch C, Hoehlig K, Klussmann S, Vater A, Firsching TC, Hoppe J, Suttorp N, Witzenrath M (2020) Neutralizing Complement Component C5a Protects Mice with Pneumococcal Pulmonary Sepsis. *Anesthesiology* 132(4):795-807.

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung sämtlicher Tiermodellstudien;

Erhebung und Zusammenstellung der aus den Tierversuchen gewonnenen Daten in den Abbildungen 7 bis 26;

Probenweiterverarbeitung der Materialien aus Abbildung 6, Probenverarbeitung der Materialien aus den Abbildungen 7 und 8; 10 bis 26;

Durchführung der Messungen für die Abbildungen 8; 10 bis 16; 22 bis 26;

Messungen für die Abbildungen 6 und 7 durch Dr. Axel Vater und Dr. Christian Maasch der NOXXON Pharma AG Berlin;

Messungen Abbildung 17 durch Labor Berlin GmbH;

Messungen/Färbung Abbildungen 18 bis 21 durch Prof. Dr. Thomas Tschernig, Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie der Medizinischen Fakultät des Saarlandes.

Statistische Auswertung Abbildungen 6 bis 17; 22 bis 26, supervidiert durch Fr. Dr. Jasmin Lienau, Medizinische Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin;

Statistische Auswertung Abbildungen 18 bis 21 durch Prof. Dr. Thomas Tschernig, Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie der Medizinischen Fakultät des Saarlandes.

Erstellung der Graphen Abbildungen 6 bis 26.

Anteilig Datenaufarbeitung, Zusammenfassung der Patientencharakteristika und tabellarische Darstellung Tabellen 10 bis 12;

Zusammenfassung Patientencharakteristika, Korrelationsanalysen durch Prof. Dr. Markus Scholz, Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie der Universität Leipzig.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Publikation: Müller-Redetzky H, Kellermann U, Wienhold S-M, Gutbier B, Lienau J, Hellwig K, Reppe K, Letsiou E, Tschernig T, Scholz M, Ahnert P, Maasch C, Hoehlig K, Klussmann S, Vater A, Firsching TC, Hoppe J, Suttorp N, Witzernath M. Neutralizing Complement C5a Protects Mice with Pneumococcal Pulmonary Sepsis. *Anesthesiology* 2020; 132(4):795–807.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin Witzzenrath, Arbeitsgruppenleiter der AG Witzzenrath der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, für die Vergabe dieses interessanten und medizinisch relevanten Promotions-themas sowie für die Bereitstellung der Ressourcen zu deren Durchführung. An der Komplexität des Themas konnte ich fachlich und persönlich wachsen.

Ein herzliches Dankeschön richte ich an Herrn Dr. Holger Müller-Redetzky für die Betreuung, die offenen Ohren für jegliche Krisen und die Akzeptanz und Ruhe für das mich umgebende dynamische Chaos.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Axel Vater und Dr. Christian Maasch für die Bereitstellung des L-RNA-Aptamers NOX-D19, die freundliche Zusammenarbeit sowie die Messungen der humanen und murinen C5a Spiegel.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Tschernig, Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, für die histopathologische Aufarbeitung der Leberschnitte bedanken.

Einen riesengroßen Dank richte ich an Frau Dr. Jasmin Lienau für die unzähligen Stunden, die sie in die Fertigstellung des zugehörigen Papers und in die Unterstützung bei der Korrektur meiner Dissertation investiert hat.

Genauso groß ist der Dank an Frau Dr. Sandra-Maria Wienhold für die Beantwortung unzähliger Fragen, für die Einarbeitung und die lieben personalisierten Gebrauchsanweisungen - dank ihr behielt ich Übersicht, Struktur und Ausdauer.

Ich danke den guten Seelen des Labors, Frau Dr. Birgitt Gutbier und Frau Dr. Katrin Reppe für ihre Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei Katharina Hellwig und Marfa Rhagal für die Betreuung der Beatmungsversuche bedanken.

Meinen lieben Eltern und meinem Bruder Sven danke ich für den liebevollen Zusammenhalt unserer Familie.

Liebe Natascha, dir danke ich dafür, dass du mich mit deiner mütterlichen Fürsorge zum Ziel schubst.

Danksagung

Meiner Freundin Beatrice danke ich für ihre analytische Logik der Dinge und meinem besten Freund Alexander danke ich von Herzen für seine Freundschaft.

Ich danke allen meinen Freunden für unsere Zeit, für die Momente in denen wir herzlich lachen und nicht an morgen denken.

Dir, Christopher, danke ich für deine Partnerschaft.