

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

**Eingereicht über das Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Die Bedeutung von Angiotensin-2 für die Entwicklung
eines akuten Lungenversagens in der schweren
Pneumokokkenpneumonie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Carolin Ehrler
Tierärztin aus Müllheim**

**Berlin 2022
Journal-Nr.: 4345**

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité –

Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über das Institut für Tierpathologie

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

**Die Bedeutung von Angiotensin-2 für die Entwicklung eines
akuten Lungenversagens in der schweren
Pneumokokkenpneumonie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Carolin Ehrler

Tierärztin

aus Müllheim

Berlin 2022

Journal-Nr.: 4345

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Martin Witzernath
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Sven Hammerschmidt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, animal models, acute respiratory distress syndrome, pneumonia, Streptococcus pneumoniae, endothelium, inflammation, ligands

Tag der Promotion: 01.08.2022

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-181-0

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2022

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2022 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

I.	Tabellenverzeichnis.....	XII
II.	Abbildungsverzeichnis.....	XIV
III.	Abkürzungsverzeichnis.....	XVI
1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	2
2.1	Das respiratorische System.....	2
2.1.1	Anatomie des respiratorischen Systems.....	2
2.1.2	Das respiratorische System von Maus und Mensch.....	2
2.1.3	Der Aufbau der alveolar-kapillären Barriere.....	3
2.1.4	Die physikochemischen Barrieren der Lunge.....	4
2.1.5	Das pulmonale Endothel und seine Barrierefunktion.....	5
2.2	Das Immunsystem der Lunge.....	6
2.2.1	Die Zelluläre Immunabwehr des nicht-adaptiven Immunsystems.....	6
2.2.1.1	Alveolarmakrophagen.....	6
2.2.1.2	Mastzellen.....	7
2.2.1.3	Granulozyten.....	8
2.2.1.4	Dendritische Zellen.....	9
2.2.1.5	Natürliche Killerzellen.....	9
2.2.2	Das Komplementsystem.....	10
2.2.3	Das adaptive Immunsystem der Lunge.....	11
2.2.3.1	Zelluläre Immunabwehr des adaptiven Immunsystems.....	11
2.2.3.2	Humorale Immunabwehr des adaptiven Immunsystems.....	12
2.2.4	Zytokine und Chemokine.....	13
2.2.4.1	Tumornekrosefaktor Alpha.....	14

2.2.4.2	Interleukin-6.....	14
2.2.4.3	Interleukin-10.....	15
2.2.4.4	Interleukin-12.....	15
2.2.4.5	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand-1	16
2.2.4.6	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand-2.....	16
2.3	Thrombozyten und Hämostase.....	17
2.4	Streptokokken.....	18
2.4.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	19
2.4.1.1	Virulenzfaktoren.....	19
2.4.1.1.1	Kapsel	19
2.4.1.1.2	Pneumolysin	20
2.4.1.1.3	Oberflächenproteine	21
2.5	Pneumonie	22
2.5.1	Definition und Einteilung	22
2.5.2	Epidemiologie der ambulant erworbenen Pneumonie	22
2.5.3	Erreger und Therapie der ambulant erworbenen Pneumonie.....	23
2.6	Sepsis	24
2.7	Das akute respiratorische Syndrom.....	25
2.8	Der Angiotensin/Tyrosinkinase-Rezeptor-Signalweg	27
2.8.1	Angiotensin-1.....	28
2.8.2	Angiotensin-2.....	30
3	Arbeitshypothese, Ziele und Strategie des Dissertationsprojektes	33
4	Material und Methoden	34
4.1	Tiere.....	34
4.1.1	Versuchstiere.....	34

4.1.2	Haltung.....	34
4.2	Isolierung und Kultivierung primärer muriner pulmonaler Endothelzellen.....	35
4.3	DNA-Isolierung aus Ohrbiopsien und aus primären murinen pulmonalen Endothelzellen von Angiopoietin-2- ^{loxP/loxP} -Cre-ERT2 Mäusen.....	36
4.3.1	Isolierung von DNA aus Ohrbiopsien.....	36
4.3.2	Isolierung von DNA aus primären murinen pulmonalen Endothelzellen.....	37
4.4	Identifizierung Cre-exprimierender Angiopoietin-2- ^{loxP/loxP} -Cre-ERT2 ^{+/-} Mäuse auf Genomebene.....	37
4.4.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	37
4.4.2	Identifizierung des Polymerase-Kettenreaktion-Produktes Cre-exprimierender Angiopoietin-2- ^{loxP/loxP} -Cre-ERT2 ^{+/-} Mäuse mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	38
4.5	Induktion einer Angiopoietin-2-Defizienz in Angiopoietin-2- ^{loxP/loxP} -Cre-ERT2 Mäusen und in primären murinen pulmonalen Endothelzellen von Angiopoietin-2- ^{loxP/loxP} -Cre-ERT2 Mäusen.....	39
4.5.1	<i>In vivo</i> Induktion eines Angiopoietin-2-Knockout.....	39
4.5.2	<i>In vitro</i> Induktion einer Angiopoietin-2 Defizienz in primären murinen pulmonalen Endothelzellen.....	39
4.6	Bestätigung der Angiopoietin-2-Defizienz auf Genomebene.....	40
4.6.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	40
4.6.2	Identifizierung des Polymerase-Kettenreaktion-Produktes einer <i>in vivo</i> oder <i>in vitro</i> induzierten Angiopoietin-2-Defizienz in Angiopoietin-2- ^{loxP/loxP} -Cre-ERT2 Mäusen mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	41
4.7	Bestätigung einer Angiopoietin-2-Defizienz auf Genexpressionsebene.....	41
4.7.1	RNA-Isolierung aus murinen Lungen.....	41
4.7.2	Isolierung von RNA aus primären murinen pulmonalen Endothelzellen.....	42
4.7.3	cDNA-Synthese aus RNA-Proben von <i>in vivo</i> induzierten Angiopoietin-2- ^{loxP/loxP} -Cre-ERT2 Mäusen sowie <i>in vitro</i> induzierten primären murinen pulmonalen Endothelzellen von Angiopoietin-2- ^{loxP/loxP} -Cre-ERT2 Mäusen.....	42
4.7.4	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.....	42

4.8	<i>In vitro</i> Versuche mit primären murinen pulmonalen Endothelzellen.....	44
4.8.1	Untersuchung des Einflusses von Angiopoietin-2 auf die Integrität eines mit Pneumolysin stimulierten primären murinen pulmonalen Endothelzellmonolayer mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	44
4.9	<i>In vivo</i> Infektionsversuche mit Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen.....	46
4.9.1	Anzucht von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	46
4.9.2	Intranasale Inokulation von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	46
4.9.3	Organentnahme bei mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten Mäusen zur histopathologischen Untersuchung und histochemischen Lokalisierung von Angiopoietin-2.....	47
4.9.4	Bestimmung der pulmonalen Permeabilität von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten Mäusen.....	48
4.9.5	Gewinnung von murinem Blutplasma.....	50
4.9.6	Quantitative Bestimmung von Angiopoietin-2 in murinen Blutplasmaproben von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten Mäusen.....	50
4.9.7	Bestimmung der Bakterienlast in Blut und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten Mäusen.....	51
4.9.8	Ermittlung der Gesamtleukozytenzahl und des Leukozytendifferentialbildes im Blut von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten Mäusen.....	51
4.9.9	Durchflusszytometrische Analyse der Gesamtleukozytenzahl und des Leukozytendifferentialbildes von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten Mäusen.....	51
4.9.10	Die Zytokin- und Chemokinexpression von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten Mäusen.....	52
4.9.10.1	Quantitative Bestimmung von Interleukin-6 in murinen Blutplasmaproben von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten Mäusen.....	52
4.9.10.2	Quantitative Bestimmung von Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand-1 in murinen Blutplasmaproben von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen und Kontrollmäusen.....	53

4.9.10.3	Quantitative Bestimmung pro- und antiinflammatorischer Zytokine und Chemokine in der zellfreien bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten Angiopoietin-2-Knockout Mäusen und Kontrollmäusen.....	53
4.10	Statistische Datenanalyse.....	53
5	Ergebnisse	55
5.1	Induktion eines Angiopoietin-2-Knockout in der Angiopoietin-2 ^{loxP/loxP} -Cre-ERT2 Maus	55
5.1.1	Identifizierung Cre-exprimierender Mäuse des Stammes Angiopoietin-2 ^{loxP/loxP} -Cre-ERT2	55
5.1.2	Identifizierung induzierter Angiopoietin-2-Knockout-Mäuse.....	55
5.1.3	Angiopoietin-2-Knockout-Mäuse wiesen in der immunhistochemischen Untersuchung weniger Angiopoietin-2 im Lungengewebe auf als Kontrollmäuse...56	56
5.1.4	Identifizierung einer Angiopoietin-2-Defizienz in primären murinen pulmonalen Endothelzellen nach <i>in vitro</i> Induktion.....	57
5.1.5	Primäre murine pulmonale Endothelzellen wiesen nach der Induktion einer Angiopoietin-2-Defizienz eine tendenziell geringere Angiopoietin-2 Genexpression auf als nicht induzierte primäre murine pulmonale Endothelzellen.....	58
5.2	Kultivierte primäre murine pulmonale Endothelzellmonolayer wiesen nach der Induktion einer Angiopoietin-2-Defizienz und Stimulation mit Pneumolysin einen geringeren Integritätsverlust auf als nicht induzierte primäre murine pulmonale Endothelzellmonolayer	59
5.3	Die Pneumokokkenpneumonie in der Angiopoietin-2-Knockout-Maus	61
5.3.1	Angiopoietin-2-Knockout-Mäuse und deren nicht induzierbaren Geschwistertiere zeigten in der Pneumokokkenpneumonie im Lungengewebe eine ähnliche Angiopoietin-2 Genexpression.....	61
5.3.2	Die Angiopoietin-2-Knockout-Maus zeigte im Gegensatz zur Kontrolle keinen Anstieg der Angiopoietin-2-Plasmakonzentration in der Pneumokokkenpneumonie.....	62

5.3.3	In der Pneumokokkenpneumonie zeigten Angiotensin-2-Knockout-Mäuse eine ähnliche Entwicklung im Verlauf der Körpertemperatur und des Körpergewichtes wie Kontrollmäuse	62
5.3.4	In der Pneumokokkenpneumonie hatten Angiotensin-2-Knockout-Mäuse sowohl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit als auch im Blut eine vergleichbare Bakterienlast wie Kontrollmäuse	63
5.3.5	In der Pneumokokkenpneumonie wies das Differentialblutbild von Angiotensin-2-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen keinen Unterschied auf	64
5.3.6	Das Leukozytendifferentialbild in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Angiotensin-2-Knockout-Mäusen nach Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> ähnelte dem von Kontrollmäusen.....	65
5.3.7	In der Pneumokokkenpneumonie war in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Angiotensin-2-Knockout-Mäusen und Kontrollmäusen eine ähnliche Konzentration von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen erkennbar	66
5.3.8	Die Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand-1-Plasmakonzentration war in der Pneumokokkenpneumonie bei der Angiotensin-2-Knockout-Maus im Vergleich zur Kontrollmaus reduziert.....	68
5.3.9	Die Interleukin-6-Plasmakonzentration war in der Pneumokokkenpneumonie bei Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen vergleichbar	68
5.3.10	In der Pneumokokkenpneumonie war bei Angiotensin-2-Knockout-Mäusen und deren nicht induzierbaren Geschwistertieren kein Unterschied bezüglich der Permeabilität der alveolokapillären Barriere erkennbar.....	69
5.4	Histopathologische Untersuchung der Angiotensin-2-Knockout-Maus in der Pneumokokkenpneumonie	70
5.4.1	Die Angiotensin-2-Knockout-Maus zeigte in der Pneumokokkenpneumonie im Gegensatz zur Kontrollmaus keinen Anstieg der Angiotensin-2-Plasmakonzentration	70
5.4.2	In der histopathologischen Untersuchung wies die Angiotensin-2-Knockout-Maus in der Pneumokokkenpneumonie im Vergleich zur Kontrollmaus eine geringere Angiotensin-2 Expression im Lungengewebe auf	71

5.4.3	In der histopathologischen Untersuchung wiesen Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen nach einer Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> eine ähnliche Entzündungsreaktion und Bakterienlast auf.....	73
6	Diskussion.....	76
6.1	Der Angiotensin-2-Knockout auf DNA-, RNA- und Proteinexpressionsebene	76
6.2	Angiotensin-2-defiziente primäre murine pulmonale Endothelzellen wiesen nach einer Stimulation mit Pneumolysin einen geringeren Integritätsverlust auf als primäre murine pulmonale Kontrollendothelzellen	77
6.3	<i>In vivo</i> zeigten mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierte Angiotensin-2-Knockout-Mäuse keinen Anstieg der Angiotensin-2-Plasmakonzentration.....	77
6.4	Angiotensin-2-Knockout-Mäuse wiesen in der Infektion eine vergleichbare IL-6-Konzentration und eine geringere Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand-1-Plasmakonzentration als Kontrollmäuse auf	79
6.5	Die Permeabilität der alveolokapillären Barriere war bei Angiotensin-2-Knockout-Mäusen und Kontrollmäusen nach Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> vergleichbar hoch.....	79
6.6	Mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierte Angiotensin-2-Knockout-Mäuse wiesen im Lungengewebe eine ähnliche Pathomorphologie wie Kontrollmäuse auf	80
6.7	Die konditionelle Angiotensin-2-Knockout-Maus.....	81
7	Zusammenfassung	84
8	Summary	86
9	Literaturverzeichnis.....	88
10	Anhang.....	121
10.1	Versuchsgruppen	121
10.2	Ergebnisse der immunhistochemischen und histopathologischen Auswertung von Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen 48 Stunden nach Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> oder einer Scheininfektion.....	123
10.3	Materialien.....	127

11	Publikationen.....	143
12	Förderung/ Interessenskonflikt.....	145
13	Danksagung	146
14	Selbständigkeitserklärung.....	147

I. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Die Berliner Definition eines ARDS.....	27
Tabelle 2:	Reaktionsansatz zur Identifizierung Cre-exprimierender Angiopoietin-2- $^{loxP/loxP}$ - Cre-ERT2 ^{+/-} Mäuse mittels Polymerase-Kettenreaktion	37
Tabelle 3:	Temperaturprogramm zur Identifizierung Cre-exprimierender Angiopoietin- 2- $^{loxP/loxP}$ -Cre-ERT2 ^{+/-} Mäuse mittels Polymerase-Kettenreaktion	38
Tabelle 4:	Reaktionsansatz zur Bestimmung einer Angiopoietin-2-Defizienz mittels Polymerase-Kettenreaktion	40
Tabelle 5:	Temperaturprogramm zur Bestimmung einer Angiopoietin-2-Defizienz mittels Polymerase-Kettenreaktion	41
Tabelle 6:	Ansatz <i>Assay on Demand</i> Angiopoietin-2 (Ang-2) und Glycerinaldehyd-3- phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	43
Tabelle 7:	Reaktionsansatz zur Bestimmung der Genexpression von Angiopoietin-2 mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	43
Tabelle 8:	Temperaturprogramm zur Bestimmung der Genexpression von Angiopoietin-2 mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	44
Tabelle 9:	Bewertungsschema der immunhistochemischen Untersuchung des Lungen- gewebes von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten und scheininfizierten Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen und Kontrollmäusen auf das Vorkommen von Angiopoietin-2 (Ang-2).....	47
Tabelle 10:	<i>Master Mix</i> Fc Block Zusammensetzung zur Durchflusszytometrischen Analyse	51
Tabelle 11:	Zusammensetzung <i>Master Mix</i> der Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	52
Tabelle 12:	Immunhistochemische Auswertung der Angiopoietin-2 Expression im Lungengewebe von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten und schein- infizierten Angiopoietin-2-Knockout- und Kontrollmäusen.....	123
Tabelle 13:	Histopathologische Auswertung des Lungengewebes von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten und scheininfizierten Angiopoietin-2-Knockout- und Kontrollmäusen	124

Tabelle 14:	Histopathologische Auswertung des Milz- und Lebergewebes von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten und scheininfizierten Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen	125
Tabelle 15:	Immunhistochemische Auswertung der Lungen von Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen zum Nachweis von <i>Streptococcus pneumoniae</i> 48 Stunden nach Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> oder einer Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung	126

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Identifizierung Cre-exprimierender Angiopoietin-2 ^{-loxP/loxP} -Cre-ERT2 ^{+/-} -Mäuse	55
Abbildung 2: Identifizierung von Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen.....	56
Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung von Angiopoietin-2 in murinem Lungengewebe von Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen und nicht induzierbaren Kontrollmäusen	57
Abbildung 4: Identifizierung einer Angiopoietin-2-Defizienz von primären murinen pulmonalen Endothelzellen nach <i>in vitro</i> Induktion	58
Abbildung 5: Untersuchung der Angiopoietin-2 Genexpression primärer muriner pulmonaler Endothelzellen nach <i>in vitro</i> Induktion	59
Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung stimulierter primärer muriner pulmonaler Endothelzellmonolayer.....	60
Abbildung 7: Untersuchung der Angiopoietin-2 Genexpression von Angiopoietin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie.....	61
Abbildung 8: Die Angiopoietin-2-Plasmakonzentration in der Pneumokokkenpneumonie bei Angiopoietin-2-Knockout- und Kontrollmäusen.....	62
Abbildung 9: Körpertemperatur und Körpergewicht im Verlauf einer Pneumokokkenpneumonie	63
Abbildung 10: Bakterienlast in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und im Blut.....	64
Abbildung 11: Differentialblutbild in der Pneumokokkenpneumonie bei Angiopoietin-2-Knockout- und Kontrollmäusen	65
Abbildung 12: Leukozytendifferentialbild der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Angiopoietin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie	66
Abbildung 13: Konzentrationen pro- und antiinflammatorischer Zytokine und Chemokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Angiopoietin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie	67

Abbildung 14: Die Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand-1-Plasmakonzentration in der Pneumokokkenpneumonie bei Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen	68
Abbildung 15: Die Interleukin-6-Plasmakonzentration in der Pneumokokkenpneumonie bei Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen	69
Abbildung 16: Permeabilität der alveolokapillären Barriere in der Pneumokokkenpneumonie bei Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen	70
Abbildung 17: Die Angiotensin-2-Plasmakonzentration von Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie.....	71
Abbildung 18: Immunhistochemische Untersuchung der Angiotensin-2 Expression in den Lungen von Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie	72
Abbildung 19: Semiquantitative Auswertung der endothelialen Angiotensin-2 Expression in mittleren und kleinen Lungengefäßen von Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie	73
Abbildung 20: Histopathologische Untersuchung der Lungen von Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie	74
Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis von <i>Streptococcus pneumoniae</i> in der Lunge von Angiotensin-2-Knockout-Mäusen und Kontrollmäusen	75

III. Abkürzungsverzeichnis

4-OHT	<i>4-Hydroxytamoxifen</i>
AJ	<i>adherens junction</i>
Ang	<i>Angiopoietin</i>
Ang-2 KO	<i>Angiopoietin-2-Knockout</i>
APC	<i>antigen-presenting cells</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrom, aktues Lungenversagen</i>
BALF	<i>bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit</i>
Bp	<i>Basenpaare</i>
BSA	<i>bovines Serumalbumin</i>
CAP	<i>community-acquired pneumonia, ambulat erworbene Pneumonie</i>
CPAP	<i>continuous positive airway pressure</i>
CXCL	<i>Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand</i>
CXCR2	<i>C-X-C Chemokinrezeptor 2</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i>
DC	<i>dendritic cells</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
engl.	<i>englisch</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii, und andere</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrische Zellanalyse</i>
FCS	<i>fetales Kälberserum</i>
FcεRI	<i>Immunglobulin E affiner Fcε-Rezeptor</i>
FOXO-1	<i>forkhead transcription factor 1</i>

GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
GJ	<i>gap junction</i>
HAP	<i>hospital-acquired pneumonia, nosokomial erworbene Pneumonie</i>
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HBSS ⁻	<i>Hanks Balanced Salt Solution w/o</i>
HSA	<i>humanes Serumalbumin</i>
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
ICAM-1	<i>Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1</i>
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IL	<i>Interleukin</i>
KbE	<i>koloniebildende Einheit</i>
KC	<i>keratinocyte chemoattractant</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
LPXTG	<i>Leucin-Prolin-Xaa-Threonin-Glycin</i>
LytA	<i>Autolysin</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mPEC	<i>primäre murine pulmonale Endothelzellen</i>
n	<i>Gruppengröße</i>
n.d.	<i>nicht detektierbar</i>
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NK-Zelle	<i>Natürliche Killerzelle</i>
OD	<i>Optische Dichte</i>
OI	<i>Oxygenierungsindex</i>
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
PAF	<i>platelet activating factor</i>

PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PavA	<i>pneumococcal adherence and virulence factor A</i>
PBS	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
PEEP	<i>positiv-endexpiratorischer Druck</i>
PI3K	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>
PLY	<i>Pneumolysin</i>
PMN	<i>Polymorphonukleärer Neutrophiler</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
Psp	<i>pneumococcal surface protein</i>
qPCR	<i>quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion</i>
ROS	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
SD	<i>standard deviation, Standardabweichung</i>
SEM	<i>standard error of the mean, Standardfehler</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleid acid</i>
SOFA Score	<i>sequential (sepsis-related) organ failure assessment score</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TAE	<i>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Essigsäure-Ethylendiamintetraessigsäure</i>
TE	<i>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan- Ethylendiamintetraessigsäure</i>
TH-Zelle	<i>T-Helferzelle</i>
Tie	<i>tunica interna endothelial cell kinase</i>
TJ	<i>tight junction</i>
TLR	<i>Toll-like Rezeptor</i>
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor alpha</i>
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>

VAP	<i>ventilator-associated pneumonia, beatmungsassoziierte Pneumonie</i>
VE-Cadherin	<i>vaskulär-endotheliales Cadherin</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WT	<i>nicht induzierbare Kontrolle</i>

1 Einleitung

Ungeachtet des umfangreichen Einsatzes von Antibiotika und intensiver Behandlungsstrategien zählt die ambulant erworbene Pneumonie (engl. *community-acquired pneumonia*, CAP) in Europa zu den fünf häufigsten Todesursachen (Torres 2014). Seit den 1950-er Jahren ist die Mortalitätsrate stationär behandelter CAP Patienten gleichbleibend hoch (Torres 2014). Der häufigste Erreger der CAP ist das grampositive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) (Musher and Thorer 2014; Wilkinson and Woodhead 2004). Neben den Pathogenitätsfaktoren dieses Erregers ist eine überschießende Entzündungs- und Immunantwort des Wirtes ein bedeutender Faktor bezüglich eines Therapieversagens (T. T. Bauer et al. 2006; Matthay and Zimmerman 2005). Die Interaktionen des Erregers und des Wirtes können zu einer erhöhten endothelialen Permeabilität und einem daraus resultierenden schweren Lungenschaden, bis hin zum akuten Lungenversagen, führen (Ware and Matthay 2000). Ein wichtiger Faktor bei der Entstehung endothelialer Permeabilität sowie einer endothelialen Entzündungsantwort ist der Angiotensin/Tyrosinkinase-Rezeptor-Signalweg (Eklund et al. 2013; Thurston et al. 2012; Augustin et al. 2009). Liganden des endothelial vorkommenden Tyrosinkinase-Rezeptors *tunica interna endothelial cell kinase-2* (Tie-2) sind die Angiotensine (Barton et al. 2006; Davis et al. 1996). Studien zeigten, dass vor allem die Angiotensine-1 und -2 eine tragende Rolle in der inflammatorischen Reaktion und Permeabilität des Endothels spielen (Augustin et al. 2009; Eklund and Olsen 2006). Angiotensin-1 (Ang-1) wirkt agonistisch an Tie2 und dient der Aufrechterhaltung eines intakten Gefäßsystems (Scharpfenecker et al. 2005). Das Protein reduziert die endotheliale Permeabilität und hat eine antiinflammatorische sowie antiapoptotische Wirkung auf das Endothel (Mammoto et al. 2007; Pizurki et al. 2003; Daly et al. 2004). Angiotensin-2 (Ang-2) wirkt hingegen antagonistisch am Tie-2 Rezeptor und führt zu einer Destabilisierung des Endothels (Scharpfenecker et al. 2005). Des Weiteren hat es eine proinflammatorische und proapoptotische Wirkung und erhöht die endotheliale Permeabilität (Fiedler and Augustin 2006; Parikh et al. 2006). Welchen direkten Einfluss Ang-2 auf das inflammatorische Geschehen und die pulmonale endotheliale Permeabilität in der schweren Pneumokokkenpneumonie hat, ist bisher unbekannt. Um dies zu eruieren, wurden unter der Zuhilfenahme eines Ang-2 Knockoutmodells sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen durchgeführt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Kenntnisse bezüglich der Rolle von Ang-2 in der schweren Pneumokokkenpneumonie zu gewinnen und hierdurch einen Beitrag zur Entwicklung neuer innovativer Behandlungsstrategien zu leisten.

2 Literaturübersicht

2.1 Das respiratorische System

2.1.1 Anatomie des respiratorischen Systems

Das respiratorische System setzt sich aus den luftleitenden Atmungsorganen bestehend aus Nase, *Pharynx*, *Larynx*, *Trachea*, *Bronchi*, *Pulmo sinister et dexter* und den luftaustauschenden Atmungsorganen bestehend aus *Bronchioli respiratorii*, *Ductus alveolares*, *Sacculi alveolares* und *den Alveoli pulmonis* (Alveolen) zusammen (König and Liebich 2005). Die luftleitenden Atemwege sind von einem einschichtigen mehrreihigen, hochprismatischen Flimmerepithel ausgekleidet. Dieses Epithel, auch respiratorisches Epithel genannt, beinhaltet Kinozilien tragende Flimmerzellen, schleimproduzierende Becherzellen, seröse Zellen, Mikrovilli tragende Bürsten- und Intermediärzellen, Basalzellen sowie Club- und endokrine Zellen. In den luftaustauschenden Atemwegen sind die *Bronchioli respiratorii* ebenso mit einem respiratorischen Epithel ausgekleidet. Hier sind bereits vereinzelt Alveolen zu finden. Die Alveolen sind, wie auch der *Ductus Alveolares* mit einem einschichtigen Alveolarepithel, das hauptsächlich von Pneumozyten Typ I und Typ II gebildet wird, ausgekleidet (König und Liebich 2005; Hees und Sinowatz 2000). Die Alveolen bilden den terminalen Abschnitt des respiratorischen Systems und sind von einem dichten Kapillarnetz umgeben. Hier findet der Gasaustausch von eingeatmeten Sauerstoff in das Blut der Alveolarkapillaren und von Kohlenstoffdioxid aus dem Blut in die Atemluft statt (von Engelhardt und Breves 2005; Hees und Sinowatz 2000).

2.1.2 Das respiratorische System von Maus und Mensch

Das respiratorische System von Maus und Mensch weist einige Unterschiede auf. Die Lungen beider Spezies setzen sich aus 5 Lungenlappen zusammen. Der rechte Lungenflügel des Menschen weist drei, der linke Lungenflügel zwei Lungenlappen auf. Die Maus besitzt einen viergliedrigen rechten Lungenflügel und einen ungegliederten linken Lungenflügel. Die Lunge des Menschen, mit ihrem dichotomen bronchialen Aufzweigungsmuster, besitzt eine Kapazität von circa 6000 ml und einen parenchymalen Gewebeanteil von 12 %. Die luftleitenden Atmungsorgane sind beim Menschen von der Trachea bis hin zu den distalen Bronchiolen mit hyalinen Knorpelspangen ausgestattet. Der Aufbau der Mauslunge folgt vielmehr einem monopodalem Aufzweigungsmuster und hat im Vergleich zum Menschen eine geringere Anzahl respiratorischer Bronchiolen. Die Mauslunge hat eine Kapazität von 1 ml sowie einen parenchymalen Gewebeanteil von 18 %. Vollständige hyaline Knorpelspangen sind bei der Maus nur im oberen Teil der Trachea zu finden (Peake and Pinkerton 2015; Valerius 1996; McBride 1992). Die luftleitenden Wege der Maus haben ein relativ großes Lumen und sind von einem respiratorischen Epithel mit geringer Dicke ausgekleidet. Im Vergleich zum Menschen besitzt

das respiratorische Epithel der Maus eine geringere Anzahl submuköser Drüsen sowie eine höhere Anzahl an Club-Zellen. Des Weiteren besitzt die Maus im Gegensatz zum Menschen keine präkapillaren bronchial-pulmonal-arteriellen Anastomosen (Hedrich 2012; McBride 1992). Im luftaustauschenden Bereich des respiratorischen Systems sind die Alveolen der Mauslunge mit einem Durchmesser von 80 μm erheblich kleiner als die des Menschen (210 μm), auch ist die Wandstärke der Blut-Gas-Barriere bei der Maus (0,32 μm) deutlich dünner als die des Menschen (0,62 μm) (Irvin and Bates 2003). Diese speziesspezifischen Unterschiede im Aufbau der Lunge von Maus und Mensch sollten bei der Analyse und Interpretation von Maus generierten Daten stets beachtet werden.

2.1.3 Der Aufbau der alveolar-kapillären Barriere

Die alveolar-kapilläre Barriere, auch Blut-Luft-Schranke genannt, setzt sich aus dem Alveolarepithel mit aufgelagertem Surfactant, der Basallamina des Alveolarepithels, der Basallamina des Kapillarendothels und dem Kapillarendothel zusammen. Der Gasaustausch von Sauerstoff über die Alveole in die Kapillare und Kohlenstoffdioxid aus der Kapillare in die Atemluft erfolgt über Diffusion (von Engelhardt und Breves 2005; König und Liebich 2005; Hees und Sinowatz 2000). Die Alveolen sind mit einem dünnen einschichtigen Epithel ausgekleidet, das aus zwei Zelltypen besteht. Die Pneumozyten Typ I überziehen als flach ausgedehnter Zellverband die Basallamina, sind arm an Zellorganellen und bedecken etwa 93 % der Alveolarfläche (König und Liebich 2005; Linß 1999). Die Pneumozyten Typ II sind häufig in den Alveolarnischen zu finden. Sie sind rundlich, haben einen relativ großen apikal abgerundeten Zytoplasmakörper und bedecken etwa 7 % der Alveolarfläche. Pneumozyten Typ II haben einen hohen Zellstoffwechsel und dienen vor allem der Produktion von Surfactant, einem oberflächenaktiven Phospholipidfilm. Durch die Benetzung der Alveolarfläche mit Surfactant wird die Oberflächenspannung der inneren Lungenoberfläche verringert und die luftgefüllte Lunge stabilisiert. Es trägt zur Retraktionskraft der Lunge bei, dient dem Schutz sowie der Befeuchtung des Epithels und spielt eine Rolle in der Immunabwehr der Lunge (König und Liebich 2005; Rieger et al. 2004; S. Sato and Kishikawa 2001). Benachbarte Alveolen werden durch eine gemeinsame Wand, auch Alveolarseptum genannt, voneinander abgegrenzt. Das Septum enthält ein zentrales Kapillarnetz und ein Bindegewebsgerüst. In den Maschen des Bindegewebsgerüsts sind Fibroblasten, Fibrozyten, Granulozyten, Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen eingelagert. Das Alveolarseptum ist so aufgebaut, dass jede Kapillare in Kontakt zu den beiden angrenzenden Alveolen steht. Vielfach verschmelzen hier die Basalmembran von Alveolarepithel und Kapillarendothel und bilden dadurch eine sehr dünne Grenzschicht. An Stellen, in denen Septumbindegewebe vorhanden ist, ist der Diffusionsweg etwas länger. Den-

noch findet auch hier ein Gasaustausch statt. Des Weiteren besitzen die Alveolarwände Poren, die der Luftzirkulation und dem Druckausgleich dienen (König und Liebich 2005; Rieger et al. 2004; Hees und Sinowatz 2000). Die Kapillaren der Lunge sind mit einem kontinuierlichen Endothel ausgekleidet. Die einzelnen Endothelzellen sind über *adherens junctions* (AJ) miteinander verbunden. Sie besitzen einen länglichen und kleinen Zellkern, in dessen Nähe sich die Zellorganellen befinden. Die übrigen Zytoplasmaregionen der Endothelzellen sind außerordentlich dünn, im Bereich der Blut-Luft-Schranke beträgt die Dicke nur etwa 0,1 – 0,2 μm . Als Zeichen transzellulärer Transportvorgänge enthalten Endothelzellen viele Pinozytosebläschen (Junqueira and Carneiro 2005; Hees und Sinowatz 2000). Die Intensität des Gasaustausches über die alveolar-kapilläre Barriere wird von vielen Faktoren beeinflusst. So können Änderungen in der Gefäßweite der Kapillare, Verschiebungen der Oberflächenrelation der angrenzenden zellulären Grenzflächen sowie Abweichungen in der Membranpermeabilität eine Beeinträchtigung der Atemfunktion nach sich ziehen (Hees und Sinowatz 2000).

2.1.4 Die physikochemischen Barrieren der Lunge

Das respiratorische System ist dauerhaft äußeren Umwelteinflüssen ausgesetzt. Einem raffinierten System aus physiochemischen Barrieren und lokaler Immunantwort ist es jedoch zu verdanken, dass über die Atmung aufgenommene Pathogene zügig eliminiert werden. Der tubuläre Aufbau der Nase, mit Nasenhaaren und respiratorischer Schleimhaut sowie der Nies- und Hustenreflex verhindern, dass größere Partikel ($< 10 \mu\text{m}$) in die oberen luftleitenden Atemwege gelangen. In den tieferen luftleitenden Atemwegen begünstigt der verzweigte Aufbau des Bronchialsystems ein Anhaften von kleineren Partikeln (2 – 10 μm) an die muköse Schicht des respiratorischen Epithels (Junqueira and Carneiro 2005). Der Partikel beladene Schleim wird durch rhythmische Bewegungen der zilienträgenden Zellen retrograd befördert (mukoziliäre Reinigung) und durch Abschlucken, Aushusten oder Niesen aus den Atemwegen entfernt (Bennett, Foster, and Chapman 1990; Puchelle et al. 1980). Neben der Sekretion von Schleim, zur Bildung der mukösen Schicht, sezerniert das respiratorische Epithel eine Vielzahl antimikrobieller, immunmodulatorischer und protektiver Moleküle wie zum Beispiel Immunglobulin A (IgA), α - und β -Defensin, Lysozyme, Lactoferrin, Cathelicidin LL37 und Surfactant Proteine und stellt somit einen wichtigen Bestandteil der Immunabwehr dar (Whitsett and Alenghat 2015). Kleinste Partikel können jedoch bis in die Alveolen vordringen. In den Alveolen sind weder ein zilienträgendes Epithel noch eine dicke muköse Schicht aufzufinden. Jedoch produziert hier das Alveolarepithel ein Sekret, das die Alveolarwände benetzt. Ein Hauptbestandteil dieses Alveolarsekretes ist Surfactant. Surfactant ist nicht nur wie in 2.1.3 beschrieben für die Stabilität der Lunge verantwortlich, sondern spielt auch eine Rolle in der Immunabwehr. Die Proteine des Surfactant können über bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder auch

durch direkte Absorption an die Oberfläche von Pathogenen binden und dadurch die phagozytische sowie die zytotoxische Aktivität angrenzender Immunzellen erhöhen (de Wetering et al. 2001; Van Iwaarden et al. 1994). Weitere Bestandteile des Alveolaresekretes wie zum Beispiel alveoläres Immunglobulin G (IgG), LPS-bindendes Protein, Fibronectin, Komplement und antimikrobielle Peptide (AMP) tragen zusätzlich zur lokalen Immunabwehr bei (Ewig 2016b).

2.1.5 Das pulmonale Endothel und seine Barrierefunktion

Das pulmonale Endothel dient dem Erhalt einer Homöostase zwischen den intravasalen Räumen und dem angrenzenden Lungengewebe und verfügt über synthetische und metabolische Fähigkeiten. Das Endothel nimmt Einfluss auf die Blutgerinnung, auf die Aktivität von Blutplättchen, auf die Regulierung des Gefäßtonus und des Blutflusses (Langer et al. 2005; Bombeli, Schwartz, and Harlan 1998; Marcus et al. 1997; Yanagisawa et al. 1988; Furchgott and Zawadzki 1980). Aber auch im Verlauf von Immun- und Entzündungsgeschehen spielt es eine entscheidende Rolle. Das pulmonale Endothel wirkt als semipermeable Barriere und ermöglicht unter physiologischen Bedingungen über einen parazellulären und einen transzellulären Transportweg den Austausch von Flüssigkeiten, Proteinen und gelösten Substanzen. Der Parazelluläre Transportweg erfolgt über endotheliale Zellverbindungen und ist für gelöste Substanzen bis zu einer Größe von 3 nm zugänglich (Pappenheimer, Renkin, and Borrero 1951). Zu diesen Zellverbindungen zählen die *gap junction* (GJ), die *tight junction* (TJ) und die *adherens junction* (AJ). Die GJ sind für einen Austausch von Wasser, Ionen und anderen kleinen Molekülen zwischen den Endothelzellen verantwortlich (Kanno and Loewenstein 1964). AJ, welche in der endothelialen Lungenbarriere vermehrt aufzufinden sind, dienen ebenso wie TJ einer stabilen Verknüpfung benachbarter Endothelzellen (Müller-Redetzky et al. 2014). AJ bestehen aus vaskulären-endothelialen Cadherinen (VE-Cadherin). Diese stehen intrazellulär mit dem Aktin-Zytoskelett der Endothelzelle in Kontakt und verbinden sich homotypisch und calciumabhängig an VE-Cadherine benachbarter Endothelzellen (Ali et al. 1997; Lampugnani et al. 1992). Die Affinität der VE-Cadherine und ihrer intrazellulären Strukturen bestimmt die Stabilität sowie Permeabilität der AJ und wird durch Kinasen und Phosphatasen reguliert (Wildenberg et al. 2006; Knox and Brown 2002; Venkiteswaran et al. 2002). So führt eine Phosphorylierung des VE-Cadherins zu einer Internalisierung des Proteins in die Endothelzelle und erzeugt dadurch ein Ansteigen der endothelialen Permeabilität (Gavard and Gutkind 2006). Die transzelluläre Permeabilität, auch Transzytose genannt, ist vor allem für den Transport von Makromolekülen verantwortlich. Hierbei werden größere Proteine, wie beispielsweise Albumin, durch die Bindung an spezifische Rezeptoren der luminalen Caveolen in Vesikel eingeschlossen und intrazellulär transportiert. Abluminal werden diese, nach Verschmelzen der

Vesikel mit der Plasmamembran, wieder ausgeschleust und gelangen so in das perivaskuläre Gewebe (Schnitzer and Oh 1994; Simionescu 1981). Diverse extrazelluläre Stimuli können einen Einfluss auf die pulmonal-endotheliale Barriere nehmen. Pulmonale Endothelzellen besitzen *pattern recognition receptors* (PRR) mit denen sie *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) von Pathogenen, aber auch *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) beschädigter Zellen erkennen und infolgedessen zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen, Interferonen und Chemokinen angeregt werden (Witzenrath et al. 2011; Huan Yang et al. 2010; Andonegui et al. 2003; Zarembek and Godowski 2002; Medzhitov, Preston-Hurlburt, and Janeway 1997). Eine Aktivierung des Endothels durch einen solchen Stimulus führt zu einer Vasodilatation der betroffenen Gefäße, zu einer erhöhten Permeabilität der endothelialen Barriere und einer vaskulären Leckage von Plasmaproteinen in das umliegende Gewebe (Sun et al. 2013; Witzenrath et al. 2006). Durch die Freisetzung von Chemokinen kann das Endothel Leukozyten rekrutieren und eine Diapedese von Immunzellen durch eine Expression diverser proinflammatorischer Moleküle in das betroffene Gewebe fördern (Griffin et al. 2012; Roussel et al. 2010). Eine Schädigung oder der Tod der Endothelzelle führt zu einer Aktivierung von Thrombozyten sowie der Gerinnungskaskade und fördert die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten (Geelen, Bhattacharyya, and Tuomanen 1992; Stern et al. 1985). Diese inflammatorischen Mechanismen sind unerlässlich für die Beseitigung von Pathogenen und den Erhalt einer physiologischen Lungenfunktion. Kommt es jedoch zu einer Deregulierung und einem Kontrollverlust der inflammatorischen Kaskade führt die daraus resultierende unkontrollierte inflammatorische Antwort zu einer massiven Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und lipidischer Mediatoren. Dies hat die Aktivierung und Akkumulation von Leukozyten, eine unkontrollierte Aktivierung der Komplement- und Gerinnungskaskade und schließlich ein Versagen der pulmonalen endothelialen Barriere zur Folge (Singer et al. 2016). Störungen und Deregulierung der pulmonalen endothelialen Barriere können Schädigungen der Lunge und gravierende pathologische Konsequenzen, wie ein akutes Lungenversagen (engl. *acute respiratory distress syndrom*, ARDS) und/oder Sepsis, nach sich ziehen (Singer et al. 2016; Ferguson et al. 2012).

2.2 Das Immunsystem der Lunge

2.2.1 Die Zelluläre Immunabwehr des nicht-adaptiven Immunsystems

2.2.1.1 Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen sind in der Regel die ersten Immunzellen der unspezifischen Immunabwehr der Lunge, die mit inhalierten Partikeln in Kontakt treten. Sie sind in den Alveolarsepten und in den Lumina der Alveolen zu finden und bilden ein Bindeglied zwischen nicht-adaptiver

und adaptiver Immunantwort (Freudenberg, Kortsik, and Ross 2002). Phagozytotische Zellen, wie Alveolarmakrophagen, identifizieren pathogene Partikel zum einen anhand von Opsonierung durch beispielsweise IgG, Komplement oder Surfactant Proteine und zum anderen anhand einer direkten Bindung an PAMPs über PRRs, wie beispielsweise *Toll-like* Rezeptoren (TLR). Die pathogenen Partikel werden von den aktivierten Alveolarmakrophagen aufgenommen und intrazellulär abgetötet (Underhill et al. 1999). Durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise Interleukin (IL)- 8 und CXC-Chemokinen, rekrutieren Alveolarmakrophagen Polymorphonukleäre Neutrophile (PMN) aus den Lungenkapillaren in die Alveolen. Auch aktivierte Monozyten und Lymphozyten werden durch die Sekretion von CC-Chemokinen zum Entzündungsort gelockt (Fillion et al. 2001; Maus et al. 1998). Zusätzlich können Alveolarmakrophagen in das umgebende Gewebe auswandern, um dort durch Antigenpräsentation das adaptive Immunsystem anzuregen (Gong et al. 1994). Apathogene Partikel werden ebenfalls von Alveolarmakrophagen phagozytiert und eliminiert, jedoch ohne weitere Immunmechanismen zu aktivieren. Diese Differenzierung zwischen apathogenen und pathogenen Partikeln ist von Bedeutung für den Erhalt einer physiologischen Lungenfunktion unter alltäglichen Umwelteinflüssen (Murphy et al. 2012).

2.2.1.2 Mastzellen

Mastzellen sind weitere stationäre Lungenzellen des Immunsystems, die eine Rolle in der frühen Erregerabwehr spielen. Sie sind unterhalb des respiratorischen Epithels sowie in direkter Nachbarschaft von Gefäßen und Nerven aufzufinden. Mastzellen exprimieren verschiedene Rezeptoren wie TLR und Immunglobulin E affine Fcε-Rezeptoren (FcεRI), die es ihnen ermöglichen, verschiedenste Pathogene zu identifizieren und eine spezifische Immunantwort zu generieren. Nach Aktivierung schütten sie Zytokine, wie beispielsweise IL-1β und Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α) sowie Zellmediatoren wie Leukotrien C4, *platelet activating factor* (PAF) und Prostaglandin D2 aus und rufen dadurch eine lokale Entzündungsreaktion hervor (Qiao et al. 2006; Longphre et al. 1996; Schleimer et al. 1986). Zusätzlich steigern sie durch die Freisetzung von Histamin die lokale Durchblutung sowie die vaskuläre Permeabilität und führen zu einer zunehmenden Antikörperkonzentration in dem betroffenen Gewebe und einer vermehrten Einwanderung von Effektorzellen. Desweiteren spielen Mastzellen eine Rolle bei allergischen Reaktionen des Typ I. Sie können durch eine Immunglobulin E (IgE) Opsonierung unschädlicher Partikel aktiviert werden und hierdurch eine Vielzahl allergischer Abwehrreaktionen entfachen (Murphy et al. 2012).

2.2.1.3 Granulozyten

PMN, eosinophile und basophile Granulozyten sind zirkulierende Zellen, die sowohl bei der Abwehr von Pathogenen als auch in der Immunregulation von Bedeutung sind. PMN werden aus der Zirkulation durch die Freisetzung immunmodulatorischer Substanzen aus stationären Zellen rekrutiert (Walz et al. 1987; Vial, Toews, and Pierce 1984). Aktivierte PMN migrieren in die betroffenen Lufträume der Lunge und identifizieren Pathogene über Opsonierung und/oder durch Bindung von PRRs an PAMPs. Die Pathogene werden von den PMN phagozytiert und intrazellulär abgetötet (Kobayashi et al. 2003). Zusätzlich sezernieren PMN eine Vielzahl an Molekülen wie beispielsweise proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1), das T-Zell aktivierende Zytokin IL-12 und B-Zell-aktivierenden Faktor (Scapini et al. 2005; Cassatella et al. 1995; Tiku, Tiku, and Skosey 1986; Dubravec et al. 1990). Aber auch Chemokine wie beispielsweise Chemerin, das dendritische Zellen aktiviert und rekrutiert, werden von PMN gebildet (Wittamer et al. 2005). In der Pathophysiologie eines pulmonalen Barriereversagens spielen PMNs eine bedeutende Rolle und nehmen wesentlich Einfluss auf die vaskuläre Permeabilität. Über Faktoren wie TNF- α , Thromboxan A₂, Leukotrien B₄ oder auch Chemokine wie *Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand (CXCL) -1, -2, -3 und -8* bewirken PMN eine Kontraktion der Endothelzelle und führen zu einem Verlust interendothelialer Zellkontakte (S. R. Kim et al. 2010; Petrache et al. 2003; Strieter et al. 1995; Björk, Hedqvist, and Arfors 1982). Zusätzlich steigern PMN durch eine direkte Bindung an Adhäsionsmoleküle, wie dem interzellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), und durch eine daraus resultierende Synthese reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) die vaskuläre Permeabilität und schwächen somit die pulmonale Barriere (Q. Wang and Doerschuk 2000). PMN sind im Stande sogenannte *neutrophil extracellular traps* (Nets) zu bilden. Sie durchlaufen in der Net-Bildung (Netosis) eine einzigartige Form des Zelltodes, in dem sie granuläre Proteine und Chromatin ausscheiden und so ein antimikrobielles Netz bilden. Bakterien können in diesem Netz haften bleiben und somit an ihrer Verbreitung gehindert werden. Zusätzlich besitzen Nets diverse antimikrobielle Proteine, die Virulenzfaktoren inaktivieren und Pathogene abtöten (Brinkmann et al. 2004). Jedoch können sich einige Bakterien durch Bekapselung oder Enzyme wie Nukleasen, die beispielsweise von Pneumokokken oder *Staphylococcus aureus* exprimiert werden, vor einem Anhaften an Nets schützen (Berends et al. 2010; Wartha et al. 2007). Aber auch an pathophysiologischen Vorgängen wie einer endothelialen Hyperpermeabilität, ausufernder Thrombenbildung und der Entwicklung eines Organversagens in Folge einer Sepsis können Nets beteiligt sein (Caudrillier et al. 2012; Saffarzadeh et al. 2012; Clark et al. 2007). Eosinophile Granulozyten spielen vor allem als Effektorzellen in allergischen Abwehrreaktionen wie beispielsweise Asthma und bei der Bekämpfung parasitärer helminthischer Infektionen eine Rolle. Sie werden über eine T-Helferzellvermittelte Immunantwort zu den Entzündungsorten rekrutiert (Culley et al. 2002; Gonzalo et

al. 1996). Durch die Freisetzung granulärer Proteine haben eosinophile Granulozyten einen direkten toxischen Effekt sowohl auf Parasiten als auch auf das anliegende Gewebe. Sie produzieren eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise IL-5, IL-6 und IL-12, aber auch Chemokine und lipidische Mediatoren wie CXCL-5 und Leukotrien C4 (Grewe et al. 1998; Ying et al. 1996; Dubucquoi et al. 1994; Hamid et al. 1992; Owen et al. 1987). Basophile Granulozyten stellen die geringste Zahl zirkulierender Granulozyten dar. Sie sind vor allem bei allergischen Reaktionen, aber auch in der Abwehr von Parasiten relevant. Basophile Granulozyten besitzen wie Mastzellen FcεRI-Rezeptoren und schütten nach Aktivierung schlagartig gespeichertes Histamin aus (Youssef et al. 2007; Ishizaka et al. 1972). Des Weiteren produzieren sie große Mengen IL-4 und IL-13. Dadurch unterstützen sie die Differenzierung von T-Lymphozyten zu T-Helferzellen (TH-Zellen) und erhöhen die B-Lymphozyten Proliferation und Immunglobulinproduktion (H. Li, Sim, and Alam 1996; Brunner, Heusser, and Dahinden 1993; Gauchat et al. 1993).

2.2.1.4 Dendritische Zellen

Weitere phagozytotische Zellen des unspezifischen Immunsystems sind dendritische Zellen (engl. *dendritic cells*, DC). Ihre Hauptaufgabe jedoch ist nicht die Beseitigung von Pathogenen, sondern die Aktivierung der spezifischen Immunantwort durch Antigenpräsentation und Sekretion von Zytokinen. DC befinden sich unterhalb des respiratorischen Epithels und besitzen Zellausläufer, die bis in das Lumen der Atemwege hineinreichen (Zoltán Veres et al. 2011; Sertl et al. 1986). Nach Identifizierung, Phagozytose und dem Abbau des Pathogens wandern DC in die lokalen Lymphknoten und präsentieren dem adaptiven Immunsystem die Antigen-Peptide, gebunden an *major histocompatibility complex* (MHC) Molekülen, auf ihrer Oberfläche (Vermaelen et al. 2001; Visintin et al. 2001; Inaba et al. 1998; Bhardwaj et al. 1993).

2.2.1.5 Natürliche Killerzellen

Die im Blut zirkulierenden Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gelten, obwohl sie als Lymphozyten klassifiziert sind, als Bestandteil der nicht-adaptiven Immunantwort (Kiessling, Klein, and Wigzell 1975; Pross and Jondal 1975). Im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen können NK-Zellen ohne eine spezifische Immunisierung der Zielzelle einen Zelltod einleiten (Kärre et al. 1986). Sie gelten als Sentinelzellen und treten vor allem bei der Immunabwehr von Virusinfektionen und bei der Immunüberwachung von entarteten Zellen in Erscheinung (Welsh et al. 1990; Hanna and Burton 1981; Law and Levine 1977; Herberman, Nunn, and Lavrin 1975). Eine Aktivierung der NK-Zellen erfolgt über Zytokine, Pathogene und über die Bindung an NK-

spezifische Rezeptoren (Jamieson et al. 2002; Brown et al. 2001; Mandelboim et al. 2001; C. A. Biron, Young, and Kasaian 1990; Christine A. Biron, Sonnenfeld, and Welsh 1984). Die Funktion der NK-Zellen wird sowohl durch inhibitorische als auch aktivierende Rezeptoren bestimmt. So binden inhibitorische Rezeptoren der NK-Zellen an MHC I-Komplexe, welche auf gesunden Zellen zu finden sind (Wagtmann et al. 1995; Karlhofer, Ribaldo, and Yokoyama 1992). Aktivierende Rezeptoren binden an zelleigene oder pathogen-induzierte Zellrezeptoren, welche vor allem in gestressten oder infizierten Zellen vermehrt aufzufinden sind (Jamieson et al. 2002; Mandelboim et al. 2001). Kommt es bei einer Zelle durch eine Entartung oder Infektion zu einer Reduktion der MHC I-Komplexe und findet zudem eine Bindung an einen aktivierenden Rezeptor statt, wird die NK-Zelle aktiviert und der Zelltod der jeweiligen Zielzelle eingeleitet (Oshimi et al. 1996; Vujanovic et al. 1996). Hierbei wird die Zelle durch eine Exozytose von Perforin und Granzymen direkt lysiert (Trapani 1995; Peters et al. 1991). Auch eine immunregulatorische Funktion wird den NK-Zellen vor allem in der frühen Phase einer Entzündung zugesprochen, indem sie sowohl proinflammatorische als auch immunsuppressive Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren sezernieren (Siré et al. 2004; Mehrotra et al. 1998; Oliva et al. 1998; De Sanctis, Blanca, and Bianco 1997). So beeinflussen sie beispielsweise über Interferon- γ und den Zelldebris der getöteten Zellen die T-Zellantwort (Krebs et al. 2009; Martín-Fontecha et al. 2004).

2.2.2 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein weiterer Bestandteil des nicht-adaptiven Immunsystems und ist vor allem in der initialen Immunabwehr von großer Bedeutung. Es setzt sich aus 30 verschiedenen Proteinen zusammen, die in inaktivierter Form im Blut und anderen Körperflüssigkeiten wie beispielsweise im Alveolarsekret zu finden sind. Man unterscheidet drei unterschiedliche Aktivierungswege des Komplementsystems wobei alle drei das Ziel einer Erregereliminierung haben. Die initialen Proteine des Komplementsystems fungieren als PRRs. Sie erkennen die Anwesenheit eines Pathogens und aktivieren über eine Kaskade verschiedenster Proteine und Enzyme ein Effektor-Komplementmolekül, das schließlich die Induktion der Immunantwort einleitet (Murphy et al. 2012). So opsoniert zum Beispiel das Komplement C3b Pathogenoberflächen und erleichtert phagozytischen Zellen die Aufnahme und Eliminierung des Pathogens (Ehlenberger and Nussenzweig 1977; Law and Levine 1977). Aber auch die Rekrutierung von Immunzellen und die Entstehung einer Entzündungsreaktion kann durch Proteine des Komplementsystems wie beispielsweise C3a und C5a gefördert werden (Hartmann et al. 1997). Terminale Proteine der Komplementkaskade können in der Zellmembran von Pathogenen einen Membranangriffskomplex (MAK) bilden, welcher in der Lage ist, die Zellmembran zu durchbrechen und eine Zellyse auszulösen (Nauta et al. 2002; Tomlinson et

al. 1989; Koski et al. 1983; Podack et al. 1980). Neben seiner Rolle in der nicht-adaptiven Immunantwort nimmt das Komplementsystem zusätzlich Einfluss auf die adaptive Immunantwort. Durch die Komplementopsonierung von Pathogenen kommt es zu einer vermehrten Antigenpräsentation phagozytotischer antigenpräsentierender Zellen (engl. *antigen-presenting cell*, APC) gegenüber Lymphozyten (Sándor et al. 2009; Kopf et al. 2002). Zudem können einige Komplementproteine die Zytokinproduktion von APC stimulieren und somit zusätzlich die Ausbildung und das Ausmaß der adaptiven Immunantwort beeinflussen (Goodman, Chenoweth, and Weigle 1982).

2.2.3 Das adaptive Immunsystem der Lunge

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch eine hocheffiziente und spezifische Immunabwehr aus und ist in der Lage, Pathogene, die bereits zu einem früheren Zeitpunkt den Organismus befallen haben, wiederzuerkennen. Das adaptive Immunsystem setzt sich aus einer zellulären und einer humoralen Komponente zusammen (Murphy et al. 2012).

2.2.3.1 Zelluläre Immunabwehr des adaptiven Immunsystems

Zu den Zellen der spezifischen Immunabwehr gehören die T-Lymphozyten. In den Lymphorganen binden naive T-Lymphozyten an APC wie beispielsweise DC oder Makrophagen, und entwickeln sich zu Effektor-T-Zellen wie TH-Zellen (Ingulli et al. 1997). Diese entstehen durch die Bindung von CD4⁺ T-Lymphozyten an den antigentragenden MHC II-Komplex von APC. Nach Differenzierung und Proliferation migrieren TH-Zellen in das betroffene Gewebe und binden sich antigenspezifisch an den MHC II-Komplex infizierter Zellen. Über die Expression membran-assoziiierter Proteine und die Sekretion von Zytokinen unterstützen sie die infizierte Zelle bei der Erregerabwehr (Sakihama, Smolyar, and Reinherz 1995; Mosmann et al. 1986). Sie rekrutieren über die Sekretion von IL-17 und TNF- α PMN in das betroffene Gewebe und aktivieren über Interferon gamma (IFN- γ) und Lymphotoxin alpha (LT- α) infizierte Makrophagen (Murphy et al. 2012; Brehm, Daniels, and Welsh 2005; H. Park et al. 2005; Grogan et al. 2001; Eardley et al. 1980;). Des Weiteren können TH-Zellen über die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 Eosinophile, Mastzellen und B-Zellen stimulieren und durch die Bindung ihres CD40-Liganden an das CD40-Oberflächenmolekül von B-Zellen einen Isotopenwechsel induzieren (Gonzalo et al. 1996; Lederman et al. 1994; Mosmann et al. 1986). Nicht alle TH-Zellen leisten einen zeitnahen Beitrag zur spezifischen Immunabwehr. Einige TH-Zellen entwickeln sich zu T-Gedächtniszellen. Diese Zellen können noch Jahre später ein Antigen wiedererkennen und

ohne erneute Aktivierungs- und Differenzierungsschritte mit einer raschen spezifischen Immunantwort beginnen (Murphy et al. 2012). Weitere Effektor-T-Zellen sind zytotoxische T-Zellen. Sie entstehen durch die Bindung von CD8⁺ T-Lymphozyten an antigentragende MHC I-Komplexe von APC (Fung-Leung et al. 1991). Nach der Differenzierung und Proliferation binden zytotoxische T-Zellen an antigentragende MHC I-Komplexe infizierter oder transformierter Zellen. Sie setzen zytotoxische Substanzen wie Perforin und Granzym frei und leiten somit den Tod der Zelle ein (Peters et al. 1991). Zusätzlich nutzen zytotoxische T-Zellen durch die Expression des Fas-Liganden (CD178) und dessen Bindung an das Fas-Molekül (CD95) der Zielzelle einen weiteren Signalweg, um eine Apoptose der Zelle zu induzieren (Schröter et al. 1995).

2.2.3.2 Humorale Immunabwehr des adaptiven Immunsystems

Die humorale Immunabwehr unterstützt die zelluläre Abwehr mittels antigenspezifischer Antikörper und verhindert vor allem im Extrazellularraum eine Besiedlung und Verbreitung von Pathogenen. B-Lymphozyten synthetisieren diese antigenspezifischen Antikörper. In den Blutbahnen und im lymphatischen System treffen naive B-Lymphozyten auf Antigene. Eine Aktivierung der B-Lymphozyten kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Bei einer T-Lymphozyten abhängigen Aktivierung wird die Differenzierung des naiven B-Lymphozyten durch eine TH-Zelle unterstützt (Kupfer et al. 1986). Nachdem ein naiver B-Lymphozyt an ein Antigen gebunden hat, wird das Antigen endozytiert und über MHC II-Komplexe auf der Oberfläche präsentiert (Kunkel et al. 2003). Die antigenspezifische TH-Zelle aktiviert den B-Lymphozyten zum einen durch die Bindung an dessen MHC II-Komplex sowie an das CD40 Oberflächenmolekül und zum anderen durch die Sekretion von Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-6). Diese Aktivierung führt zu einer starken klonalen Proliferation des B-Lymphozyten und es entstehen antikörperproduzierende Plasmazellen sowie B-Gedächtniszellen (Horikawa and Takatsu 2006; Lane et al. 1992; Cosgrove et al. 1991; Lebman and Coffman 1988; Muraguchi et al. 1988). Die in der primären Phase entstandenen Plasmazellen dienen der sofortigen humoralen Immunabwehr und synthetisieren vor allem niedrigaffine Immunglobuline (Ig) des Isotypen IgM (Wildenberg et al. 2006). Einige der geklonten B-Zellen bilden in primären Lymphfollikeln zusammen mit TH-Zellen ein Keimzentrum (Victoria et al. 2010). In diesem Keimzentrum finden durch verschiedenste Differenzierungsschritte eine Affinitätsreifung und ein Isotopenwechsel der B-Zelle statt. Durch Proliferation dieser differenzierten B-Lymphozyten entstehen weitere Plasmazellen die sich in der sekundären Phase der humoralen Abwehr durch eine Produktion unterschiedlicher hochaffiner Ig der Isotypen IgG, IgA und IgE auszeichnen (Kräutler et al. 2017; Murphy et al. 2012; Cerutti et al. 1998). Einzelne B-Zellen entwickeln sich in diesen Keimzentren zu B-Gedächtniszellen. B-Gedächtniszellen durchlaufen die gleichen

Differenzierungsschritte wie die Plasmazellen der sekundären Phase, jedoch produzieren sie keine Antikörper. Diese Zellen können noch nach Jahren ein Antigen wiedererkennen und bereits bei einer niedrigen Antigendosis eine schnelle hochaffine humorale Immunantwort einleiten (Bernasconi, Traggiai, and Lanzavecchia 2002; Arpin et al. 1995). Die T-Lymphozyten unabhängige Aktivierung der B-Lymphozyten erfolgt allein durch eine direkte Bindung von proteinfreien Antigenen. Jedoch findet durch diese Form der Aktivierung nur im geringen Maße ein Isotopenwechsel statt und es entstehen keine B-Gedächtniszellen (Dintzis, Middleton, and Dintzis 1983; Coutinho et al. 1974). Die durch die Aktivierung von B-Zellen entstandenen Ig unterstützen die Immunabwehr, indem sie Pathogene neutralisieren und an einem Eindringen in die Zelle hindern. Des Weiteren können sie durch die Opsonierung der Pathogenoberflächen die Aktivität phagozytotischer Zellen erhöhen sowie die Proteine des Komplement-Systems aktivieren (Murphy et al. 2012).

2.2.4 Zytokine und Chemokine

Zytokine und Chemokine sind zellulär sezernierte Proteine, die eine bedeutende Rolle in der Modifikation und Entwicklung einer Entzündungsreaktion spielen (Turner et al. 2014). Zytokine sind etwa 25 kDa große Moleküle, die von einer Vielzahl von Zellen produziert werden. Über komplexe Interaktionen nehmen diese Proteine Einfluss auf die Immunität und auf das Entzündungsgeschehen. Dies beinhaltet unter anderem das angeborene Immunsystem, die Antigenpräsentation, die Differenzierung im Knochenmark, die zelluläre Rekrutierung und Aktivierung sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen. Für die Sekretion eines Zytokins ist zumeist ein aktivierender Stimulus notwendig. Welche Ausprägung und Ausrichtung eine Immunantwort nach einem solchen Stimulus annimmt, ist wesentlich von dem sezernierten Zytokin abhängig (Murphy et al., 2012; Borish & Steinke, 2003;) Je nach Ursprung, der Zielstruktur, der Phase der Immunantwort und der Anwesenheit verschiedener Zytokine kann sowohl eine proinflammatorische als auch eine antiinflammatorische Wirkung vermittelt werden (Turner et al. 2014; Borish and Steinke 2003). Die Chemokine sind eine Gruppe sehr kleiner Moleküle (8 – 12 kDa), die in einer Vielzahl von Zellen eine Chemotaxis induzieren. Diese kann sowohl eine inflammatorische als auch eine homöostatische Wirkung auf das Immunsystem haben. Inflammatorische Chemokine können u. a. Leukozyten rekrutieren und aktivieren und somit eine Immunantwort verstärken und eine Wundheilung initiieren (Fernandez and Lolis 2002). Die homöostatischen Chemokine sind überwiegend in die adaptive Immunantwort involviert und unter anderem an der Lymphozytenmigration, der Hämatopoese, dem Antigen-*Signaling* sowie an der Immunüberwachung beteiligt (Moser and Loetscher 2001). Im folgenden Abschnitt wird auf einige Zytokine und Chemokine näher eingegangen.

2.2.4.1 Tumornekrosefaktor Alpha

TNF- α ist ein starker inflammatorischer Mediator und wesentlich für die Entzündungsreaktionen des angeborenen Immunsystems verantwortlich. Das Zytokin wird von mononukleären Phagozyten, PMN, aktivierten Lymphozyten und natürlichen Killerzellen sowie Endothelzellen und Mastzellen gebildet (Brehm, Daniels, and Welsh 2005; Ranta et al. 1999; Simpson, Singh, and Bice 1994; Dubravec et al. 1990; Gordon and Galli 1990; Perez et al. 1990; Paya et al. 1988). Auf Tumorzellen kann es eine zytolytische und zytostatische Wirkung haben (Gupta 2002). In Endothelzellen induziert es die Bildung von Adhäsionsmolekülen und ermöglicht hierdurch Granulozyten in Entzündungsgebiete einzuwandern (Mattila et al. 1992). Zudem kann es zur Entwicklung einer endothelialen Barrierestörung beitragen, indem es die vaskuläre Permeabilität über eine Bildung von Stress-Aktin-Fasern und einen Verlust von interzellulären Endothelzellverknüpfungen beeinflusst (Petrache et al. 2003). TNF- α aktiviert PMN, erleichtert eine Adhäsion, wirkt chemotaktisch, bewirkt eine Degranulation und kann einen *respiratory burst* induzieren (Khwaja, Carver, and Linch 1992; Salyer et al. 1990; Richter, Andersson, and Olsson 1989). Auch gilt es als primärer endogener Mediator im toxischen Schockgeschehen und Sepsis (Tracey et al. 1987). Zusätzlich wirkt es negativ-inotrop und nimmt Einfluss auf die Koagulation (Page, Bester, and Pretorius 2018; Yokoyama et al. 1993).

2.2.4.2 Interleukin-6

IL-6 ist ein pleiotropisches Zytokin und wird hauptsächlich von mononukleären phagozytischen Zellen gebildet (Maus et al. 1998; J. Bauer et al. 1988). Aber auch T- und B-Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Hepatozyten und Knochenmarkzellen können das Zytokin sezernieren (Panesar, Tolman, and Mazuski 1999; Rougier et al. 1998; Elias and Lentz 1990; Hutchins, Cohen, and Michael Steel 1990; Zubiaga et al. 1990; Grossman et al. 1989; Jirik et al. 1989). IL-6 ist in die Hämatopoese involviert, stimuliert die Reifung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen und führt zu einer T-Zellaktivierung und Differenzierung (K. A. Smith and Maizels 2014; Urashima et al. 1996; Bernad et al. 1994; Muraguchi et al. 1988). Es induziert eine Pyrexie und ist bedeutsam für die Sezernierung von Akute-Phase-Proteinen aus der Leber (Gauldie et al. 1989; Castell et al. 1988). Aber auch eine antiinflammatorische Wirkung kann IL-6 zugeschrieben werden. So beendet es eine Hochregulierung der inflammatorischen Kaskade und hemmt die Synthese von IL-1 β und TNF- α (Schindler et al. 1990).

2.2.4.3 Interleukin-10

IL-10 wird unter anderem von T- Helferzellen (TH), B-Lymphozyten, Mastzellen und mononukleären phagozytotischen Zellen synthetisiert (Sanin, Prendergast, and Mountford 2015; Ishizuka et al. 1999; Burdin et al. 1993; Yssel et al. 1992). Es hat eine inhibitorische Wirkung auf die Sekretion von Zytokinen, die mit zellulärer Immunität und allergischer Entzündungsreaktion assoziiert sind (Arock et al. 1996; P. Wang et al. 1994). Zudem stimuliert IL-10 eine humorale und zytotoxische Immunantwort (Santin et al. 2000; Rousset et al. 1992). Das Protein hemmt die Synthese von IFN- γ und TNF- α durch TH-1-Lymphozyten und von IL-4 und IL-5 durch TH-2-Lymphozyten (Endharti et al. 2005; Banning et al. 1997; Del Prete et al. 1993). Des Weiteren verkürzt es die Überlebenszeit von Eosinophilen und inhibiert eine IL-4 induzierte IgE-Synthese (Kosaka et al. 2011; Del Prete et al. 1993). Es hemmt auch die Synthese von IFN- γ und TNF- α durch NK-Zellen und vermindert die Synthese von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α durch mononukleäre Phagozyten (Mocellin et al. 2004; Heyen et al. 2000; Shin et al. 1999; L. Armstrong, Jordan, and Millar 1996; Thomassen, Divis, and Fisher 1996; Hunter et al. 1994). Zusätzlich führt es zu einer Inhibition von MHC Klasse II-Molekülen, CD 23 und ICAM-1 (Chadban et al. 1998; Morinobu et al. 1996; Willems et al. 1994). Indem IL-10 die Synthese des Protein B7 unterdrückt, vermindert es die Fähigkeit von APC, Signale zur T-Helfer-Zellaktivierung bereitzustellen (Willems et al. 1994; Ding et al. 1993). In B-Lymphozyten hingegen hat das Protein einen aktivierenden Effekt und regt die Zellproliferation sowie die Immunglobulinsekretion an (Heine et al. 2014). Hinzukommend fördert es einen Isotopenwechsel zu IgG4 und dient als Co-Wachstumsfaktor für zytotoxische Zellen (Ye et al. 2007; Satoguina et al. 2005).

2.2.4.4 Interleukin-12

IL-12 wird vorwiegend von Monozyten und Makrophagen gebildet, aber auch B-Zellen, DC, Langerhans-Zellen, PMNs und Mastzellen können das Protein sezernieren (Schultze et al. 1999; Fulton et al. 1996; Heufler et al. 1996; Kang et al. 1996; Mahon et al. 1996; Cassatella et al. 1995; T. J. Smith, Ducharme, and Weis 1994). In seiner aktiven Form ist IL-12 ein Heterodimer, dessen große Untergruppe p40 dem löslichen Rezeptor von IL-6 gleicht und dessen kleinere Untergruppe p35 homolog zu IL-6 ist (Podlaski et al. 1992). IL-12 aktiviert NK-Zellen und induziert eine Proliferation, die Zytotoxizität und Zytokinsynthese dieser Zellen (Scharton-Kersten et al. 1995; Aste-Amezaga et al. 1994; Valiante, Rengaraju, and Trinchieri 1992). Des Weiteren stimuliert es die Proliferation von TH-Zellen und zytotoxischen Lymphozyten (Heufler

et al. 1996). Im Zusammenspiel mit IL-18 stimuliert es eine Freisetzung von IFN- γ (Yoshimoto et al. 1998).

2.2.4.5 Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand-1

CXCL-1 oder auch *keratinocyte chemoattractant* (KC) genannt gehört zu der Gruppe der CXC-Chemokine. Das murine CXCL-1 gilt als funktionelles Homolog des humanen IL-8. CXCL-1 wird unter basalen Bedingungen nur gering exprimiert. Im Falle einer bakteriellen Infektion steigt die Expression jedoch in hämatopoetischen und auch gewebsständigen Zellen signifikant an (Sawant et al. 2016; Jin et al. 2014). Es wird sowohl als Monomer als auch als Dimer exprimiert und bindet an Glykosaminoglykanen von Endothelzellen, Epithelzellen und extrazellulärer Matrix sowie an den C-X-C Chemokinrezeptor 2 (CXCR2) von PMN (Sawant et al. 2016). CXCL-1 ist ein starker chemotaktischer Lockstoff und führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung von PMN in das jeweilige betroffene Gewebe (Sawant et al. 2015; Köhler et al. 2011; Lee et al. 1995). Es moduliert die Funktion von PMN und ist ein bedeutender Faktor in der bakteriellen Clearance, indem es zur Synthese von ROS beiträgt, die Bildung von Nets beeinflusst sowie die phagozytotische Aktivität verstärkt (Jin et al. 2014; Batra et al. 2012). Des Weiteren führt es zu einer Expression proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β , IL-6, IL-17A, CXCL-2 und CXCL-5 sowie zu einer Aktivierung von *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) und *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinasen und einer Hochregulation von ICAM-1 (Jin et al. 2014; Batra et al. 2012; Cai et al. 2010).

2.2.4.6 Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand-2

CXCL-2 oder auch *macrophage inflammatory protein-2* (MIP-2) ist ein murines Chemokin der CXC-Familie. CXCL-2 gilt wie CXCL-1 als murines Homolog des humanen IL-8 (S. D. Wolpe et al. 1989). Es bindet mit einer hohen Affinität an CXCR2, welcher hauptsächlich von Granulozyten und NK-Zellen exprimiert wird (Faunce, Sonoda, and Stein-Streilein 2001; Bozic et al. 1994). Es wird hauptsächlich von myeloiden Zellen exprimiert, wirkt direktional chemotaktisch und führt zu einer lokalisierten PMN Gewebsinfiltration (Greenberger et al. 1996; Stephen D. Wolpe et al. 1988). Nach einer Stimulation mit Bakterien oder mit bakteriellen Zellwandbestandteilen wie Lipopolysaccharid (LPS) wird das Chemokin in großen Mengen von Makrophagen synthetisiert (S. Huang, Paulauskis, and Kobzik 1992; Tannenbaum et al. 1990; S. D. Wolpe and Cerami 1989). Aber auch Epithelzellen, vaskuläre Endothelzellen, Astrozyten, Mastzellen und PMN können es exprimieren (D. A. Armstrong et al. 2004; Mancardi et al. 2003; Biedermann et al. 2000; M. Q. Zhao et al. 2000; Nygårdas, Määttä, and Hinkkanen

2000). Des Weiteren zeigten *in vitro* Studien, dass proinflammatorische Zytokine wie IL-1 oder TNF- α ebenso zu einer Expression von CXCL-2 in murinen Endothelzellen führen können (Liu, Wang, and Thorlacius 2000). CXCL-2 ist bedeutend für eine bakterielle Abwehr im Lungengewebe. So konnte in einer Studie von Greenberger et al. (1996, Journal of Infectious Diseases) in einem murinen Pneumoniemodell mit *Klebsiella pneumoniae* die Bedeutung von CXCL-2 für die Rekrutierung von PMN in die Lunge, und die daraus resultierende Prävention vor einer systemischen Infektion aufgezeigt werden. Hierbei führte eine Inhibition von CXCL-2 zu einer reduzierten PMN Rekrutierung und einer verminderten bakteriellen Clearance im Lungen- und Lebergewebe im Vergleich zum Wildtyp.

2.3 Thrombozyten und Hämostase

Thrombozyten sind kleine Zellfragmente, die von Megakaryozyten aus dem Knochenmark abstammen. Sie sind ca. 2 – 3 μm groß und haben eine Lebensdauer von ca. 5 – 9 Tagen. Thrombozyten besitzen keinen Nukleus. Im Zytoplasma dieser Zellen finden sich Mitochondrien, ein glattes endoplasmatisches Retikulum, Lysosomen und Granula (Silverthorn 2013). Die Granula der Thrombozyten enthalten biologisch aktive Substanzen, die nach einer Thrombozytenaktivierung ausgeschüttet werden. Sie dienen u. a. der Einleitung einer Koagulation und der Rekrutierung von Zellen im Laufe eines Entzündungsprozesses (Flaumenhaft 2003). Thrombozyten sind Bestandteil der primären Hämostase. Die primäre Blutstillung erfolgt über eine Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten. Nach einer Schädigung des Endothels binden sich Thrombozyten durch Interaktion mit der subendothelialen Matrix an subendotheliale Bestandteile wie gebundenem von-Willebrand Faktor oder Kollagen (Nieswandt and Watson 2003; Falati, Edmead, and Poole 1999; Coller et al. 1989). Diese Bindung führt zu einer Aktivierung der Thrombozyten, einer Änderung ihrer Morphologie und einer Sekretion biologisch aktiver Moleküle aus den Granula (Silverthorn 2013). Dies wiederum führt zu einer Vasokonstriktion, der Aktivierung weiterer Thrombozyten und der Entstehung eines instabilen Thrombozytenaggregates (Silverthorn 2013; French, Macfarlane, and Sanders 1964). Auch werden während der Formänderung der Thrombozyten die Fibrinogenrezeptoren (GPIIb/IIIa) freigelegt und aktiviert (Niiya et al. 1987). Die sekundäre Hämostase, auch Koagulation genannt, wird in einen intrinsischen und extrinsischen Signalweg aufgeteilt. Der intrinsische Signalweg wird über eine Freilegung von subendotheliale Kollagen und einer Aktivierung des Gerinnungsfaktor XII gestartet. Der extrinsische Signalweg beginnt durch die Freilegung des Gerinnungsfaktor II und der Aktivierung von Gerinnungsfaktor VII. Die beiden Kaskaden vereinigen sich letztendlich zu einem gemeinsamen Signalweg, an dessen Ende Thrombin entsteht. Thrombin führt zu einer Konvertierung von Fibrinogen zu Fibrin. Durch die Quervernetzung des Fibrins und den Einschluss roter Blutkörperchen innerhalb des

Thrombozytenaggregates kommt es zur Entstehung eines unlöslichen „roten Thrombus“ (Silverthorn 2013). Während der Heilung des Endothelschadens wird der Thrombus allmählich aufgelöst, indem Plasminogen über Thrombin durch *tissue plasminogen activator* (tPA) zu Plasmin konvertiert wird und eine Fibrinolyse stattfindet (Silverthorn 2013). Um ein physiologisches Gleichgewicht zu erhalten und das Gewebe vor einer unkontrollierten Hämostase zu schützen, verfügt der Körper über Antikoagulantien wie zum Beispiel der Serin-Protease-Inhibitor Antithrombin oder Thrombomodulin (Opal et al. 2002; Esmon 1989). Antikoagulantien inhibieren über verschiedene Mechanismen die Anheftung von Thrombozyten an das Endothel, die Koagulation und die Fibrinbildung. Im pulmonalen Gewebe können Endotoxine und proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise TNF- α oder IL-1 die lokale Koagulation aktivieren und eine verringerte Fibrinolyse sowie verminderte Produktion von Antikoagulantien herbeiführen (Günther et al. 2000; Kirchhofer et al. 1994; Fourrier et al. 1992; Bevilacqua et al. 1984; Colucci et al. 1983). Dieser prokoagulante Zustand des Lungengewebes ist ein wichtiger Bestandteil der lokalen Bekämpfung pulmonaler Infektionen und Inflammation. Imbalancen in diesem System können jedoch die Entstehung einer pulmonalen Koagulopathie fördern und das Krankheitsgeschehen vorantreiben (Rijneveld et al. 2006; Günther et al. 2000). So kann eine erhöhte endotheliale Leckage von Plasmaproteinen in die Alveolen oder die zusätzliche Einwirkung inflammatorischer Stimuli, wie bakterieller Toxine, die Koagulation modifizieren und die Expression und Synthese prokoagulanter und antifibrinolytischer Faktoren fördern (Rijneveld et al. 2006; Biemond et al. 1995; Geelen, Bhattacharyya, and Tuomanen 1992). Die daraus resultierende ausufernde Koagulation und verringerte Fibrinolyse führt zu einer vermehrten Ansammlung von Fibrin in den Alveolen, einer Inaktivierung von Surfactant, einer Zunahme des Gewebeschadens, einem gestörten Gasaustausch sowie einer pulmonalen Fibrose (Sitrin et al. 1998; Papadimitriou et al. 1997; Idell et al. 1991; Seeger et al. 1985).

2.4 Streptokokken

Streptokokken sind gram-positive, runde, sich in Ketten oder Paaren anordnende Bakterien. Sie sind Katalase-negativ und können aufgrund ihrer hämolytischen Eigenschaften (α -, β -, γ -Hämolyse) und der Polysaccharide ihrer Zellwand in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Lancefield 1933). Häufig sind Streptokokken als Bestandteil der kommensalen Flora von Schleimhäuten zu finden. Sie können jedoch auch schwerwiegende Infektionserkrankungen hervorrufen (Kayser et al. 2010).

2.4.1 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae, auch Pneumokokken genannt, sind α -hämolytische, unbewegliche, zumeist bekapselte Bakterien. Sie werden aufgrund der Polysaccharid-Struktur ihrer Kapsel in verschiedene Serotypen eingeteilt. Es sind über 90 verschiedene Serotypen von *S. pneumoniae* bekannt (Henrichsen 1995). Pneumokokken sind reine extrazelluläre Erreger und besitzen die Fähigkeit der Phasenvariation. Sie können zwischen einem transparenten kolonialisierenden und einem opaken invasiven Phänotyp wechseln (Serrano, Melo-Cristino, and Ramirez 2006; Weiser et al. 1994). Vor allem bei Kindern im Alter von 2 – 3 Jahren sind sie häufige Kommensalen der Schleimhäute des Nasen-Rachen-Raums und der oberen Atemwege. Im Erwachsenenalter sinkt die Trägerrate auf $< 10\%$ (Regev - Yochay et al. 2004). Eine Infektion der Schleimhäute des Nasen-Rachen-Raums und der oberen Atemwege mit *S. pneumoniae* findet durch Tröpfchen oder Aerosole statt und verläuft in der Regel asymptomatisch. Jedoch kann eine Verbreitung des Erregers in angrenzende Organe zu der Entwicklung invasiver Infektionskrankheiten führen. Pneumokokken sind ein häufiger Erreger lokaler Infektionen wie Otitis media und Sinusitis, aber auch gravierender Erkrankungen wie Pneumonien (Brook and Guber 2007; Linder et al. 1994; Pachon et al. 1990), Sepsis und Meningitis können auf den Verlauf einer Pneumokokkeninfektion zurückzuführen sein (Mongardon et al. 2012; Hsu et al. 2009). Risikogruppen für *S. pneumoniae* Infektionen sind vor allem alte Menschen, Kleinkinder und immunsupprimierte Menschen (Cillóniz et al. 2013; Rozenbaum et al. 2013; Fletcher et al. 2006).

2.4.1.1 Virulenzfaktoren

2.4.1.1.1 Kapsel

Die 200 – 400 nm dicke und negativ geladene Polysaccharidkapsel bildet die äußere Hülle der Pneumokokken (Sorensen et al. 1988). Sie ist ein wichtiger Virulenzfaktor für die Etablierung des Bakteriums in einem Wirtsorganismus. So sind alle bekannten invasiven klinischen Isolate bekapselt. Unbekapselte Stämme hingegen weisen eine geringere Virulenz auf (Briles et al. 1992). Die Kapsel ermöglicht dem Bakterium das respiratorische Epithel zu besiedeln und verhindert, dass das Bakterium durch die mukozilliäre Reinigung beseitigt wird (Nelson et al. 2007). Sie hat eine antiphagozytotische Wirkung, indem sie opsonierende Antikörper und Komplement für die Rezeptoren phagozytotischer Zellen unzugänglich macht (Hyams et al. 2010). Zudem verhindert die Kapsel ein Anhaften von Pneumokokken an Nets (Wartha et al.

2007) und bildet durch Schutz vor einer Antibiotika-induzierten Autolyse einen wesentlichen Faktor bei der Entstehung von Antibiotikaresistenzen (Fernebro et al. 2004).

2.4.1.1.2 Pneumolysin

Pneumolysin (PLY) ist ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor von *S. pneumoniae*. Das 53-kDa große Thiol-aktivierte Zytotoxin wird von allen klinischen Isolaten produziert und befindet sich im Zytoplasma des Bakteriums (Boulnois et al. 1991). PLY wird nicht aktiv sezerniert, sondern vor allem in der Wachstumsphase durch eine Autolysin (LytA) vermittelte Lyse der Zellwand aus dem Zytoplasma freigesetzt (Benton, Paton, and Briles 1997; Berry et al. 1989). Aber auch eine von der Zellyse unabhängige Sekretion von PLY konnte beobachtet werden (Balachandran et al. 2001). In der stationären Wachstumsphase einer Pneumokokkeninfektion kann eine Behandlung durch Antibiotika eine Autolysin-induzierte Autolyse des Bakteriums und dadurch eine Freisetzung von PLY nach sich ziehen (Mellroth et al. 2012; Spreer et al. 2003). Seine zytotoxische Wirkung erlangt PLY durch eine Bindung an das Cholesterol von Zellmembranen und führt hierbei, über die Bildung ringförmiger, transmembraner Poren, zu einer Zellyse (Tilley et al. 2005). PLY ist vor allem in der frühen Pathogenese einer Pneumokokkeninfektion der Atemwege von Bedeutung. So inhibiert es die Zilienbewegung von Flimmerzellen und löst TJ Verbindungen des respiratorischen Epithels. Infolgedessen kommt es zu einer Beeinträchtigung der mukoziliären Reinigung sowie der Integrität des Zellmonolayers, wodurch den Pneumokokken eine Invasion in die tieferen Atemwege ermöglicht wird (Rayner et al. 1995; Feldman et al. 1990). Dort verursacht die zytotoxische Wirkung von PLY eine Schädigung der alveolar-kapillären Barriere und verhilft so den Pneumokokken zu einer Penetration in das pulmonale Gewebe und schließlich in den Blutkreislauf des Wirtsorganismus (Rubins et al. 1993; 1992). PLY hat darüber hinaus diverse Auswirkungen auf das Immunsystem. Es führt in zytotoxischer Konzentration zu einer direkten Inhibierung phagozytotischer und modulatorischer Funktionen von Immunzellen. In sublytischen Konzentrationen hemmt es den *respiratory burst* und die chemotaktische sowie antibakterielle Aktivität von PMN und Makrophagen (Nandoskar et al. 1986; Paton and Ferrante 1983). Zusätzlich hemmt es die lymphoproliferative Antwort und die Produktion von Zytokinen und Immunglobulinen durch Lymphozyten (Ferrante, Rowan-Kelly, and Paton 1984). Es hat jedoch nicht nur eine reine inhibierende Wirkung auf das Immunsystem, sondern wirkt auch proinflammatorisch und führt zu einer Rekrutierung von Immunzellen. PLY stimuliert durch seine zytotoxische Wirkung eine Zytokinausschüttung in den betroffenen Geweben und provoziert zudem durch eine direkte Aktivierung des klassischen Komplementweges eine Immunantwort (Paton, Rowan Kelly, and Ferrante 1984). Des Weiteren regt es Monozyten zu einer Produktion von TNF- α und IL-1 β und PMNs zu einer Synthese und Ausschüttung von IL-8 an (Cockeran et al. 2002;

Houldsworth, Andrew, and Mitchell 1994). Auch führt es, wie Experimente in der Mauslunge zeigten, zu einem Anstieg von PAF (Witzenrath et al. 2006). Diese direkten zytotoxischen, inhibitorischen Effekte und die immunmodulierende Komponente von Pneumolysin machen es zu einem bedeutenden Faktor in der Pathogenese einer pulmonalen Pneumokokkeninfektion.

2.4.1.1.3 Oberflächenproteine

Die Familie der Leucin-Prolin-Xaa-Threonin-Glycin (LPXTG) verankerten Oberflächenproteine trägt wesentlich zur Virulenz von Pneumokokken bei. Ein Beispiel hierfür ist die Hyaluronidase. Sie wird von 99 % aller klinischen Pneumokokkenisolate sezerniert (Humphrey 1944). Mittels der Degradierung hyaluroner Säuren wird dem Bakterium die Verbreitung und Kolonialisierung im Wirt erleichtert (Ponnuraj and Jedrzejewski 2000). Ein weiteres Enzym, das zu der Familie der LPXTG verankerten Oberflächenproteine zählt, ist die Neuraminidase. In Körperflüssigkeiten und auf Zelloberflächen spaltet das Enzym N-Acetylneuraminsäuren von Glycolipiden, Lipoproteinen und Oligosacchariden. Es führt zu einer direkten Zellschädigung und vereinfacht dadurch dem Bakterium eine Bindung an die Wirtszellen (Brittan et al. 2012; King, Hippe, and Weiser 2006; Camara et al. 1994). Cholinbindende Oberflächenproteine wie beispielsweise *pneumococcal surface protein A* (PspA), *pneumococcal surface protein C* (PspC) und LytA sind weitere wichtige Virulenzfaktoren der Zellwand von Pneumokokken. Das Oberflächenprotein PspA stört die Bindung von C3-Komplement an die Zellwand von Pneumokokken und verhindert dadurch eine Opsonierung der Bakterienoberfläche durch Komplement (Ren et al. 2004). Zusätzlich bindet es Lactoferrin und schützt das Bakterium vor dessen bakterizider Wirkung (Håkansson et al. 2001). PspC schützt das Bakterium vor einer Aktivierung des Komplementsystems, indem es sowohl an den polymerischen Immunglobulinrezeptor als auch an das komplementregulatorische Protein Faktor H bindet (Asmat et al. 2011; Duthy et al. 2002). LytA zählt ebenfalls zu den cholinbindenden Oberflächenproteinen. Das autolytisch aktive Enzym führt zu einer Zelllyse und ist vor allem in der Wachstumsphase des Bakteriums von Bedeutung. Durch die Zelllyse werden Virulenzfaktoren wie PLY, aber auch inflammatorische Peptidoglycane und Teichonsäuren aus der Zellwand des Bakteriums freigesetzt (Bonnet et al. 2018; Mellroth et al. 2012; Berry et al. 1989). Ein weiteres Oberflächenprotein, das dem Bakterium als Virulenzfaktor dient, ist der *pneumococcal adherence and virulence factor A* (PavA). Durch seine Bindung an Fibronectin ermöglicht PavA dem Bakterium eine Annäherung an Endothelzellen (Holmes et al. 2001). Ebenso erwähnenswert sind das plasminogen-bindende Protein Glycerinaldehyde-3-Phosphate-Degydrogenase und die Enolase. Diese Proteine ermöglichen den Pneumokokken eine Transmigration durch die Basalmembran (Simone Bergmann, Rohde, and Hammerschmidt 2004; S. Bergmann et al. 2001).

2.5 Pneumonie

2.5.1 Definition und Einteilung

Als Pneumonie wird eine akute oder chronische Entzündung des Lungenparenchyms bezeichnet, die durch eine Infektion mit mikrobiellen Erregern wie Bakterien, Viren, Pilzen oder auch Protozoen ausgelöst werden kann (Gerok et al. 2007). Pneumonien können aufgrund ihres Infektionsursprungs in 3 Gruppen eingeteilt werden. Die *community-acquired pneumonia* (CAP), im deutschen auch ambulant erworbene Pneumonie genannt, ist eine Pneumonieform, die außerhalb eines Krankenhauses und bei einer normalen Immunitätslage des Wirtes erworben wurde (Ewig 2016b). Als nosokomial erworbene Pneumonie, im englischen *hospital-acquired pneumonia* (HAP), gelten Infektionen, die bei einer normalen Immunitätslage des Wirtes, 48 Stunden nach einer Krankenhausaufnahme auftreten (Ewig et al. 2021). Die beatmungsassoziierte Pneumonie (engl. *ventilator-associated pneumonia*, VAP) wird als Untergruppe einer HAP angesehen. Eine VAP wird als eine endogene oder exogene Infektion im Rahmen einer invasiven maschinellen Beatmung, nach einer Mindestbeatmungsdauer von 48 Stunden, klassifiziert (Dalhoff et al. 2018). Als weitere Klassifikation wird noch die „Pneumonie unter Immunsuppression“ als Gruppe definiert. Sie zeichnet sich nicht durch den Ort der Entstehung einer Infektion, sondern anhand der Immunitätslage des Wirtes aus. Hier führt eine Immunsuppression des Wirtes zu einer Infektion, die ein opportunistisches Erregerspektrum mit einschließt (Ewig 2016b).

2.5.2 Epidemiologie der ambulant erworbenen Pneumonie

Trotz hoher Gesundheits- und Pflege-Standards zählt die CAP in Europa zur fünfthäufigsten Todesursache (Torres 2014). Risikogruppen für eine ambulant erworbene Pneumonie sind vor allem Kinder unter 5 Jahren sowie Ältere über 65 Jahre (Heiskanen-Kosma et al. 1997; Rozenbaum et al. 2013). Aber auch chronische Erkrankungen und Immunsuppression erhöhen das Risiko, an einer Pneumonie zu erkranken (Cillóniz et al. 2013). Aufgrund des breiten Erregerspektrums ist eine gesamtheitliche Prävention gegen eine CAP nicht möglich. Jedoch werden Risikogruppen Vakzinierungen gegen einige Erreger wie beispielsweise Pneumokokken oder Influenza empfohlen (Koch 2016). Die Mortalitätsrate der CAP ist ungeachtet der flächenweiten Einführung von Antibiotika in den 1950 er Jahren gleichbleibend hoch. Die Mortalitätsrate bei Patienten, die aufgrund einer CAP stationär therapiert werden müssen, beläuft sich in Europa auf 5 – 15 % und steigt bei Intensivpatienten auf bis zu 40 % (Torres 2014). Bei Erkrankten, die nicht in ein Krankenhaus eingewiesen werden müssen, liegt die Mortalitätsrate bei weniger als 1 % (Carratalà et al. 2005; Fine et al. 1997). Hinzukommend stellt CAP einen hohen sozioökonomischen Kostenfaktor dar. Allein in Europa werden die jährlichen durch CAP

verursachten Kosten, aufgrund von Krankenhausaufenthalten und Arbeitskraftverlusten, auf circa 10 Milliarden Euro geschätzt (Torres 2014).

2.5.3 Erreger und Therapie der ambulant erworbenen Pneumonie

S. pneumoniae ist weltweit der häufigste bakterielle Erreger einer CAP (Cillóniz et al. 2013; 2011). Aber auch andere bakterielle Erreger wie *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* oder auch gram-negative Bakterien wie *Chlamydophila pneumoniae* und *Legionella species* können eine CAP hervorrufen (Cillóniz et al. 2011). Unter den viralen Erregern ist vor allem das seit 2020 pandemisch grassierende Coronavirus SARS-CoV-2 ein ernstzunehmender Faktor bei der Entstehung einer CAP (Ghebreyesus 2020; Dähne et al. 2021). Weitere virale Erreger, die eine CAP zur Folge haben können, sind das saisonale Influenzavirus, das respiratorische Synzytial-Virus und das Parainfluenza-Virus (Wiemken et al. 2013). Ferner können in seltenen Fällen mykotische Infektionen wie *Coccidioides species*, *Histoplasma capsulatum* oder *Blastomyces dermatitidis* Auslöser einer CAP sein (Gago et al. 2014; Kralt et al. 2009; Valdivia et al. 2006). Die Therapie einer CAP orientiert sich an der Schwere der Erkrankung sowie an dem ursächlichen Erreger der Infektion. So sollten Patienten durch eine Risikostratifizierung anhand ärztlicher klinischer Einschätzung und unter Zuhilfenahme klinischer Scores in dem Schweregrad der CAP beurteilt und das Therapiesetting dementsprechend angepasst werden. Es wird empfohlen, eine antimikrobielle Therapie so zügig wie möglich nach der Diagnose einer CAP zu beginnen. Bei leichten Pneumonien kommen vor allem Penicillin-Präparate oder Aminopenicillin- β -Laktamase-Inhibitor-Kombinationen zum Einsatz. Bei mittelschweren Pneumonien gelten Aminopenicilline mit β -Laktamase-Inhibitor und Cephalosporine der 2- und 3a-Generation als initiale Therapieoptionen. Bei Patienten mit einer schweren Pneumonie werden zumeist zusätzlich Makrolide eingesetzt (Ewig et al. 2016a). Besteht der Verdacht einer Influenzainfektion sollte überdies mit einem Neuraminidase-Inhibitor behandelt werden. Es ist zu beachten, dass die antimikrobielle initiale Therapie jedoch nach der Identifizierung des Pneumonieerregers neu evaluiert und dementsprechend angepasst werden sollte (Ewig et al. 2016a). Eine Erregerdiagnose kann über verschiedene Diagnoseverfahren wie Erregeranzuchten, Antigentests, aber auch molekulare Detektionsverfahren wie Real-Time- und Multiplex-Polymerase-Kettenreaktionen erfolgen. Jedoch ist ungeachtet einer adäquaten initialen antimikrobiellen Therapie und entsprechendem Management vorhandener Komorbiditäten die Mortalitätsrate von hospitalisierten Patienten mit einer schweren CAP gleichbleibend hoch (Torres 2014). Als Grund für ein Therapieversagen wird vor allem eine inadäquate Entzündungsantwort verantwortlich gemacht. Die überschießende Aktivität der körpereigenen Entzündungs- und Immunantwort

kann zu schweren Schäden auf der Ebene der alveolar-kapillären Barriere führen und schwerwiegende Komplikationen wie beispielsweise Sepsis und/oder ein akutes respiratorisches Syndrom (engl. *acute respiratory distress syndrom*, ARDS) zur Folge haben (Chen et al. 2016; Menéndez et al. 2016; Montull et al. 2016; Moisés et al. 2014; Yende et al. 2008).

2.6 Sepsis

Als Sepsis wird ein lebensbedrohliches Organversagen infolge einer gestörten Regulation der Wirtsantwort aufgrund einer Infektion beschrieben (Singer et al. 2016). Hierbei gilt die Pneumonie als häufigste Ursache einer Sepsis (Vincent et al. 2006). Die Bezeichnung septischer Schock beschreibt zusätzliche zirkulatorische und zelluläre/metabolische Abweichungen, die das Mortalitätsrisiko des Patienten erheblich erhöhen (Singer et al. 2016). Zu den häufigsten bakteriellen Erregern einer Sepsis zählen die gram-positiven *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* sowie die gram-negativen *Escherichia coli*, *Klebsiella species* und *Pseudomonas aeruginosa* (Vincent et al. 2006; Opal et al. 2003). Risikofaktoren für die Entwicklung einer Sepsis determinieren sich vor allem durch die Prädisposition eines Patienten für Infektionen und der daraus resultierenden Wahrscheinlichkeit eines akuten Organversagens. So sind Patienten mit chronischen Erkrankungen oder Patienten, die mit Immunsuppressiva therapiert werden, einem erhöhten Sepsisrisiko ausgesetzt. Aber auch das Lebensalter (Alte und Kleinkinder) sowie das Geschlecht (Männer > Frauen) stellen einen Risikofaktor für die Entstehung einer Sepsis dar (Angus et al. 2001). Das klinische Erscheinungsbild einer Sepsis ist äußerst variabel und sowohl von der Grunderkrankung, der initialen Infektion und dem verursachenden Pathogen sowie dem Charakter des akuten Organversagens abhängig. Der Verlauf einer Sepsis wird sowohl von proinflammatorischen als auch antiinflammatorischen Immunprozessen bestimmt. Eine ausgewogene Wirtsantwort ist für die Beseitigung der Infektion sowie den Schutz und Erhalt des Wirtsgewebes von großer Bedeutung. In der initialen Phase einer Sepsis ist vor allem die proinflammatorische Immunantwort maßgebend. Diese kann im Falle einer Disbalance zu starken Gewebeschädigungen und Nekrosen führen und sich in einem akuten Organversagen manifestieren (Singer et al. 2016; Osuchowski et al. 2006; Hotchkiss et al. 1999). Im späteren Verlauf einer Sepsis werden vor allem Anzeichen einer Immunsuppression mit einer erhöhten Empfänglichkeit für sekundäre Infektionen erkennbar (G. J. Zhao et al. 2016; Ertel et al. 1995). Des Weiteren leiden Sepsispatienten an einer unkontrollierten Blutgerinnung. Die Entstehung mikrovaskulärer Thromben aufgrund einer gesteigerten Koagulation und gleichzeitiger Beeinträchtigung endogener antikoagulatorischer Signalwege sowie einer gestörten Fibrinolyse führt zu einer Hypoperfusion und Hypoxämie von Geweben (Dhainaut et al. 2005; Kidokoro et al. 1996; Shimamura et al. 1983). Hinzukommend wird die Oxygenierung der Gewebe durch den Verlust endothelialer Barrieren

und auf subzellulärer Ebene durch mitochondriale Schäden gestört (Johansen et al. 2015; Brealey et al. 2002). Aufgrund der Variabilität des klinischen Erscheinungsbildes empfiehlt der Internationale Konsensus zur Definition von Sepsis und septischem Schock zur Diagnose einer Sepsis die Beurteilung des Infektions- und Entzündungsgeschehens anhand klinischer und labordiagnostischer Parameter sowie die Anwendung des *Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment Score* (SOFA Score) zur Feststellung eines septischen Organversagens. Hierbei wird von einem septischen Organversagen bei einer akuten SOFA Score Wert Änderung auf ≥ 2 infolge einer Infektion gesprochen. Die Krankenhausmortalität dieser Patienten liegt selbst bei einem geringgradigen Organversagen aufgrund einer Infektion bei über 10 %. Die Diagnose eines septischen Schocks wird durch das Auftreten einer Sepsis mit anhaltender Hypotension trotz Einsatzes von Vasopressoren und einer Hyperlaktämie (> 2 mmol/L) trotz adäquater Flüssigkeitstherapie gestellt. Bei Erfüllung dieser Kriterien wird mit einer Krankenhausmortalität von über 40 % gerechnet (Singer et al. 2016). Die initiale Therapie einer Sepsis zielt auf die Optimierung und Wiederherstellung kardiorespiratorischer Funktionen und der Abwehr eines unkontrollierten Infektionsgeschehens ab. So wird das kardiorespiratorische System durch den Einsatz intravenöser Flüssigkeiten und Vasopressoren sowie durch den Einsatz von Sauerstoff und gegebenenfalls mechanischer Ventilation unterstützt und das Infektionsgeschehen durch eine antimikrobielle Therapie behandelt. Die weiterführende Therapie einer Sepsis muss je nach Zustand des Patienten evaluiert und angepasst werden (Dellinger et al. 2013).

2.7 Das akute respiratorische Syndrom

Bakterielle oder virale Pneumonien sind die häufigste pulmonale Ursache für die Entstehung eines ARDS. Aber auch Erkrankungen, die indirekt einen schweren Lungenschaden herbeiführen, wie beispielsweise eine Sepsis nicht pulmonaler Herkunft, können die Entwicklung eines ARDS begünstigen (Moisés et al. 2014; Ferring and Vincent 1997; Knaus et al. 1994). In der initialen exsudativen Phase eines ARDS führen direkte oder indirekte Schädigungen der pulmonal-endothelialen Barriere zu einer erhöhten Permeabilität. Eine Folge dieser vaskulären Leckage ist die Entwicklung eines proteinreichen Ödems im Lungeninterstitium und in den Alveolen. Darüber hinaus kommt es zur Einwanderung und Ansammlung von PMN in das Lungengewebe und in die Alveolarräume. Hierbei kann es aufgrund einer nicht verhältnismäßigen Akkumulation und Aktivierung von Leukozyten und Makrophagen sowie einer deregulierten Entzündungsantwort zu einer massiven Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und apoptotischer Substanzen kommen. Diese Prozesse führen somit zu einer zusätzlichen Verschlimmerung des bereits vorhandenen Lungenschadens (Thille et al. 2013; Pratt et al. 1979). In der fibroproliferativen Phase eines ARDS, die früh nach der Schadensentstehung

und teilweise überlappend mit der exsudativen Phase stattfindet, wird der Alveolarraum durch proliferative mesenchymale Zellen, wie Fibroblasten, Myofibroblasten und lokale pluripotente mesenchymale Vorläuferzellen gefüllt. Reparative Vorgänge führen zur Proliferation von Typ I Epithelzellen und zur Entstehung neuer Blutgefäße. Hinzukommend sind Anzeichen einer unkontrollierten Aktivierung der Blutgerinnung durch Mikrothrombi innerhalb der kleinen pulmonalen Gefäße und einer beeinträchtigten fibrinolytischen Aktivität angesichts von Fibrinansammlung innerhalb der distalen Atemwege erkennbar (Thille et al. 2013; Meduri et al. 1991; Pratt et al. 1979). Das klinische Bild eines ARDS zeichnet sich vorrangig durch eine akut einsetzende Hypoxämie, aufgrund eines nicht kardiogenen Lungenödems und eines physiologischen Lungenschunts sowie durch Atelektasen verschiedener Lungenbereiche und einer verminderten Compliance aus. In seltenen Fällen treten zudem eine progressive pulmonale Fibrose und/oder eine pulmonale Hypertension auf (Zhou et al. 2016; Ranieri et al. 2012; Villar et al. 1989). Es gibt verschiedene Definitionen und Einteilungen des ARDS. Die Berliner Definition eines ARDS wurde 2011 eingeführt. Hierbei wird die Diagnose durch die Beurteilung des Zeitpunktes des Einsetzens der Symptome, der radiologischen Befunde und der Ursache des vorhandenen Lungenödems gestützt. Des Weiteren wird eine Einteilung des ARDS aufgrund des Schweregrades der vorhandenen Hypoxie vorgenommen. Dazu wird der Oxygenierungsindex (OI) sowie der positiv-endexpiratorische Druck (PEEP) und der kontinuierliche positive Beatmungsdruck (CPAP) beurteilt und das ARDS in eine milde, moderate und schwere Form eingestuft (Tabelle 1) (Ferguson et al. 2012; Ranieri et al. 2012). Neben der Behandlung der ursächlichen Grunderkrankung ist aufgrund der schweren arteriellen Hypoxämie und einer Erschwerung der Atemtätigkeit zumeist eine maschinelle Beatmung des Patienten von Nöten. Tatsächlich ist eine protektive Lungenbeatmung die bisher einzige bekannte effektive Therapiemethode eines ARDS (Bellani et al. 2016; Brower et al. 2000). Die Heterogenität, die pathophysiologischen Ereignisse, die funktionelle Redundanz und die pleiotropischen Effekte der verschiedenen Zytokine, Chemokine und Transkriptionsfaktoren erschweren die Behandlung eines ARDS erheblich. In einer weltweiten prospektiven Studie lag die Mortalitätsrate eines ARDS im Winter 2014 bei 40 % (Bellani et al. 2016). Eine Studie von Brun-Buisson et al. aus dem Jahr 2004 ergab, dass die Mortalitätsrate bei Intensiv- und Krankenhauspatienten, die aufgrund einer bakteriellen Pneumonie ein ARDS entwickelten, bei 42,6 % und 50,7 % lag. Die Mortalitätsrate bei Patienten, deren ursächliche Erkrankung eine Pneumonie mit septischem Schock war, betrug sogar 66,7 % und 72,2 % (Brun-Buisson et al. 2004). Diese Studien unterstreichen die Bedeutung der Erforschung neuer Therapieoptionen, um den Krankheitsverlauf eines ARDS besser zu kontrollieren und die Heilungschancen für Patienten zu erhöhen.

Tabelle 1: **Die Berliner Definition eines ARDS** (Ranieri et al. 2012; Ferguson et al. 2012)

Akutes respiratorisches Syndrom			
Zeitpunkt:	Beginn innerhalb einer Woche nach akutem klinischen Ereignis oder neu Auftreten bzw. Verschlechterung respiratorischer Symptome.		
Bildgebung:	Bilaterale Verdichtungen, die nicht allein durch einen Erguss, einen Lungenkollaps oder anhand von Rundherden erklärt werden können.		
Ursache des Ödems:	Nicht allein erklärbar durch eine kardiogene Ursache oder eine Volumenüberladung. Falls keine Risikofaktoren vorhanden, muss anhand einer objektiven Beurteilung durch beispielsweise eine Echokardiographie ein hydrostatisches Ödem ausgeschlossen werden.		
	Mild	Moderat	Schwer
Oxygenierung:	200 < OI ≤ 300 mmHg	100 < OI ≤ 200 mmHg	OI ≤ 100 mmHg
	PEEP/CPAP ≥ 5 cmH ₂ O	PEEP ≥ 5 cmH ₂ O	PEEP ≥ 5 cmH ₂ O

Abkürzungen: CPAP – kontinuierlicher positiver Beatmungsdruck, OI – Oxygenierungsindex, PEEP – positiv-endexpiratorischer Druck

2.8 Der Angiotensin/Tyrosinkinase-Rezeptor-Signalweg

Der Angiotensin/Tyrosinkinase-Rezeptor-Signalweg ist essenziell für die embryonale Entwicklung von Blut- und Lymphgefäßen (T. N. Sato et al. 1995; Dumont et al. 1994). Im adulten Gewebe kontrolliert der Signalweg die vaskuläre Permeabilität sowie die endotheliale Entzündungsantwort und ist ein wichtiger Faktor bei der Entstehung pathologischer Blutgefäßbildung (Fiedler et al. 2006; Hawighorst et al. 2002; Holash et al. 1999; G Thurston, Suri, Smith, McClain, et al. 1999; Puri et al. 1995). Die Tyrosinkinase-Rezeptoren *tunica interna endothelial cell kinase-1* (Tie-1) und Tie-2 des Signalweges sind homologe Zelloberflächenmoleküle, die vorwiegend von Endothelzellen exprimiert werden (T. N. Sato et al. 1993; Partanen et al. 1992). Aber auch in hämatopoetischen Zellen, wie Eosinophilen und einer Subpopulation von Monozyten, konnten diese Rezeptoren bisher nachgewiesen werden (Murdoch et al. 2007; Feistritzer et al. 2004). Die Tyrosinkinase-Rezeptoren zeigen einen zu 76 % ähnlichen Aufbau und setzen sich aus einer extrazellulären Liganden-bindenden-Domäne und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne zusammen (Schnurch and Risau 1993; Ziegler et al. 1993; Partanen et al. 1992). Liganden des Tie-2-Rezeptors sind die parakrin oder autokrin sezernierten Angiotensine (Valenzuela et al. 1999; Maisonpierre et al. 1997; Suri et al. 1996). Der Tie-2-Rezeptor wird durch Bindung eines agonistischen Liganden phosphoryliert und aktiviert

(Wong et al. 1997; Davis et al. 1996). Die große Bedeutung des Angiopoietin/Tie-2-Rezeptor-Signalweges für die Stabilität und Integrität des Gefäßsystems wird vor allem im Zusammenhang mit dem ubiquitären endothelialen Vorkommen des Rezeptors und dessen konstitutiver Phosphorylierung im ruhenden Gefäßbett deutlich (Wong et al. 1997). Die Liganden des Tie-2-Rezeptors, die Angiopoietine, sind endogene oligomerische Glycoproteine. Alle Proteine dieser Familie weisen eine spezifische aminoternale Region sowie eine *Coiled-Coil* Domäne auf. Diese Regionen sind zum einen für eine Oligomerisierung der Proteine von Bedeutung, und sie schaffen zum anderen die Voraussetzungen für ein Clustering der Liganden am Rezeptor sowie für die Aktivierung des Tie-2-Rezeptors (Barton et al. 2006; Valenzuela et al. 1999; Maisonpierre et al. 1997; Davis et al. 1996). Der *Coiled-Coil* Domäne folgt eine carboxylterminale Fibrinogendomäne, welche allein für die Interaktion mit dem Tie-2-Rezeptor verantwortlich ist (Davis et al. 2003; Fiedler et al. 2003). Die am besten charakterisierten Proteine des Signalweges sind die Angiopoietine-1 (Ang-1) und -2 (Ang-2). Ang-1 wirkt als agonistischer Ligand am Tie-2-Rezeptor, Ang-2 hingegen inhibiert als kompetitiv antagonistischer Ligand den Tie-2-Rezeptor-Signalweg (Maisonpierre et al. 1997; Davis et al. 1996). Über die Funktion der Proteine Angiopoietin-4 (Ang-4) und dessen murinen Ortholog Angiopoietin-3 (Ang-3) ist bisweilen nur wenig bekannt. Der Tie-1-Rezeptor gilt aktuell als ein verwaister Rezeptor, für den bislang kein Ligand bekannt ist (Savant et al. 2015). Jedoch kann Tie-1 über eine Wechselbeziehung und der Bindung von Angiopoietinen an Tie-2 aktiviert werden (Korhonen et al. 2016; Savant et al. 2015). Der Beitrag und die Wirkungsweise des Rezeptors im Angiopoietin/Tie-Rezeptor-System ist gegenwärtig nur partiell untersucht. In einer Studie von Patan et al. (1998, *Microvascular Research*) zeigten Tie-1 defiziente Mäuse Anzeichen einer vermehrten Angiogenese sowie eine stärkere Vaskularisation als der Wildtyp, welches ein Hinweis auf eine mögliche Bedeutung des Rezeptors in der Regulation des ruhenden Gefäßbettes sein könnte.

2.8.1 Angiopoietin-1

Ang-1 wird von verschiedenen Zelltypen synthetisiert. Vor allem periendotheliale Zellen, glatte Muskelzellen der Gefäße, Fibroblasten, Thrombozyten und Megakaryozyten exprimieren das Protein konstitutiv (J. J. Li et al. 2001; Davis et al. 1996). Es ist ein agonistischer Ligand und führt nach der Bindung an den Tie-2-Rezeptor zu einer Autophosphorylierung und Aktivierung des Rezeptors (Davis et al. 1996). Ang-1 ist ein bedeutender Faktor in der embryonalen Angiogenese. So weisen Ang-1 Knockout-Mäuse eine embryonale Letalität mit schwerwiegenden kardiovaskulären Veränderungen auf (Suri et al. 1996). Die vaskulären Defizite dieser Knockout-Mäuse gleichen dem Phänotyp von Tie-2 Knockout-Mäusen und verdeutlichen hierdurch

den Zusammenhang einer physiologischen embryonalen Gefäßreifung mit einer Ang-1 stimulierten Tie-2 Rezeptoraktivierung (T. N. Sato et al. 1995; Dumont et al. 1994). Auch in der Aufrechterhaltung eines adulten stabilen und integren Gefäßsystems ist Ang-1 von Bedeutung. Studien von Suri et al. (1998, Science) und Thurston et al. (2000, Nature Medicine) zeigten, dass transgene Ang-1 überexprimierende Mäuse neben einer vermehrten Vaskularisation der Gewebe auch eine reduzierte endotheliale Permeabilität aufweisen. Das Glycoprotein induziert eine Ansammlung von Tie-Rezeptoren an endothelialen Zellverknüpfungen und an endothelialen Kontaktstellen mit extrazellulärer Matrix und aktiviert über eine Bindung an den Tie-2-Rezeptor die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und das *ras related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) (Fukuhara et al. 2008; Saharinen et al. 2008). Dies führt über das p190Rho-GTPase-aktivierende Protein zu einer Inaktivierung von *ras homolog family member A* (RhoA), wodurch letztendlich die Entstehung von F-Aktin-Fasern und somit die endotheliale Permeabilität reduziert wird (Mammoto et al. 2007). Zusätzlich schützt es vor einer vaskulären Leckage, indem es zum einen über die Inhibition der Tyrosinkinase Src einer *vascular endothelial growth factor* (VEGF) vermittelten Internalisierung von VE-Cadherinen entgegenwirkt (Gavard, Patel, and Gutkind 2008; G. Thurston et al. 2000; G. Thurston, Suri, Smith, McClain, et al. 1999). Zum anderen stärkt es über eine *extracellular-signal regulated kinase 1 und 2* (ERK1/2) vermittelte Aktivierung der Sphingosinkinase-1 und einem daraus resultierenden Anstieg junctionaler VE-Cadherine die interendothelialen Zellkontakte (X. Li et al. 2008). Ein weiterer Mechanismus, über den Ang-1 das Endothel vor einer erhöhten Permeabilität schützt, erfolgt über die Inhibition des Inositol-tri-Phosphat (IP3)-Rezeptors und einem daraus resultierenden reduzierten extrazellulären Kalziuminflux durch den *transient-receptor-potential-channel-1* Ionenkanal (TRPC-1) (Jho et al. 2005; Ahmmed et al. 2004). Die Wirkung von Ang-1 ist jedoch nicht nur auf die endotheliale Permeabilität beschränkt. *In vitro* Studien konnten eine direkte anti-apoptotische Wirkung des Glycoproteins auf Endothelzellen aufzeigen, indem es durch die Phosphorylierung von Tie-2 und über den PI3K/Proteinkinase B-Signalweg zu einer Inhibition des *forkhead transcription factor 1* (FOXO-1) führt (Daly et al. 2004; I. Kim et al. 2000; Papapetropoulos et al. 2000). Hinzukommend schützt die Ang-1 induzierte Inhibition von FOXO-1 das Endothel vor einer Aktivierung, da es die Expression und Sekretion von FOXO-1 Zielgenen inklusive Ang-2 hemmt (Daly et al. 2004). Des Weiteren konnte eine reduzierte Expression proinflammatorischer Gene und inflammatorischer Mediatoren wie beispielsweise IL-8 durch Ang-1 belegt werden (Hughes, Marron, and Brindle 2003; Pizurki et al. 2003). Auch konnte eine durch Ang-1 verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selectin, ICAM1 und *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM1) sowie eine Ang-1 vermittelte Reduktion der Leukozytenadhäsion und Transmigration nach einem vorausgegangenen proinflammatorischen Stimulus aufgezeigt werden (Gamble et al. 2000; I. Kim et al. 2001). In Bezug auf das pulmonale Gewebe konnte eine protektive Wirkung des Proteins nachgewiesen werden.

So zeigten Ang-1 überexprimierende oder mit Ang-1 behandelte Mäuse nach Induktion eines endotoxin- oder hydrogenperoxid-vermittelten Lungenschadens eine verminderte Expression pulmonaler Zytokine und Adhäsionsmoleküle sowie eine verminderte Leukozyten Infiltration und vaskuläre Leckage (So et al. 2008; Xu et al. 2008; Mammoto et al. 2007; Mei et al. 2007; McCarter et al. 2007, 2006; Witzendichler et al. 2005). Ebenso konnte in *in vitro* und *in vivo* Modellen einer Pneumokokkenpneumonie der protektive Effekt einer Ang-1 Therapie bestätigt werden. So wiesen mit Ang-1 behandelte humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (hMPEC) nach einer Stimulation mit PLY eine geringere Permeabilität als die unbehandelte Kontrollgruppe auf (Gutbier et al. 2018). Im Mausmodell wiesen die mit *S. pneumoniae* infizierten und mit Ang-1 behandelten Tiere eine geringere Leukozytenrekrutierung, eine geringere pulmonale Permeabilität, eine verminderte Sekretion inflammatorischer Zytokine sowie ein verbessertes klinisches Outcome auf als eine unbehandelte Kontrollgruppe (Gutbier et al. 2018). Auch konnte durch eine Ang-1 vermittelte Hemmung der Expression und Aktivität von Gewebethromboplastin ein positiver Effekt des Proteins auf eine erhöhte Koagulationsneigung, welches eine Problematik von Sepsis oder ARDS ist, aufgezeigt werden (I. Kim et al. 2002).

2.8.2 Angiopoietin-2

Ang-2 wirkt als kompetitiver Antagonist am Tie-2-Rezeptor. Das Glycoprotein wird ausschließlich von Endothelzellen exprimiert und in *Weibel-Palade-Bodies* gespeichert. In einer homöostatischen Umgebung wird Ang-2 in geringen Mengen stetig von der Endothelzelle sezerniert. Hierbei wirkt es schwach agonistisch am Tie-2-Rezeptor. Diese schwach agonistische Wirkung ist u. a. in der Entwicklung von lymphatischen Gefäßen von Bedeutung. So weisen konstitutive Ang-2 Knockout-Mäuse, aufgrund von Defekten im lymphatischen Gefäßsystem, eine höhere Sterblichkeitsrate in den ersten Lebenswochen auf als Wildtypmäuse (Gale et al. 2002). Interessanterweise zeigen diese Mäuse im Vergleich zum Wildtyp nach der Gabe eines inflammatorischen Stimulus eine verlangsamte Immunantwort und einen reduzierten Einstrom Neutrophiler Granulozyten in das Gewebe (Fiedler and Augustin 2006). Nach Stimulation einer Endothelzelle wird Ang-2, im Gegensatz zu dem konstant gleichmäßig freigesetzten Ang-1, sehr rasch und in großen Mengen ausgeschüttet (Fiedler et al. 2004). Eine gesteigerte Expression und Freisetzung von Ang-2 findet vor allem bei Inflammation und vaskulären Umbauprozessen statt und wird durch Faktoren wie TNF- α , Thrombin, Histamin, Hypoxie, VEGF und Angiotensin II stimuliert (Fiedler et al. 2004; Zhang et al. 2003; Otani et al. 2001; Oh et al. 1999). In Entzündungsprozessen, sei es akut oder chronisch, wandelt sich das Protein zu einem Antagonisten am Tie-2-Rezeptor (M. Kim et al. 2016; Korhonen et al. 2016). In seiner antagonistischen Funktion wirkt es proinflammatorisch, proapoptotisch und destabilisierend

auf das Gefäßsystem (Fiedler and Augustin 2006; Scharpfenecker et al. 2005). Das Protein schwächt die Angiopoietin/Tie-Signalkaskade, indem es die Phosphorylierung und Aktivierung des Tie-2-Rezeptors verhindert. Die Inhibition dieser Signalkaskade bewirkt eine Aktivierung von FOXO-1 und eine gesteigerte Expression von FOXO-1 Zielgenen, welche einen aktivierenden und proapoptotischen Effekt auf das Endothel haben (M. Kim et al. 2016; Korhonen et al. 2016; Ghosh et al. 2015). Zudem aktiviert Ang-2 die Rho-Kinase 1 und induziert hierdurch die Entstehung von F-Aktin-Fasern. Diese Fasern führen zu einer Kontraktion der Endothelzellen was letztendlich eine erhöhte endotheliale Permeabilität zur Folge hat (Parikh et al. 2006). Des Weiteren sensibilisiert Ang-2 das Endothel. Es fördert eine TNF- α induzierte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und erleichtert somit die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel (Fiedler et al. 2006). In Anbetracht dieser Effekte und Wirkungsweisen des Proteins auf den Organismus ist es nicht verwunderlich, dass transgene Mäuse, die Ang-2 überexprimieren, einen letalen Phänotyp aufweisen, der dem Ang-1 und Tie-2 defizienten Tieren ähnelt (Maisonpierre et al. 1997; Davis et al. 1996; Suri et al. 1996). Einige Studien weisen darauf hin, dass Ang-2 neben dem Tie-Rezeptor-System auch über endotheliale Integrine, die in einer inflammatorischen Umgebung hochreguliert werden, einen direkten Einfluss auf das Endothel nehmen kann (Umeda et al. 2006). So führte die Ang-2 Stimulation einer Endothelzellkultur, die den Tie-2-Rezeptor nicht exprimiert, neben einer Aktivierung von $\alpha 5\beta 1$ -Integrinen auch zu einer Bildung von F-Aktin-Fasern, einer veränderten Adhäsion der Endothelzellen an die Endothelzellmatrix und zu einer Destabilisierung des Endothelzellmonolayers (Hakanpaa et al. 2015). Des Weiteren wurde eine Ang-2 induzierte Apoptose von Perizyten über die Integrine p53 und $\alpha 3\beta 1$ beschrieben (S. W. Park et al. 2014). Bezüglich des pulmonalen Gewebes konnte von Parikh et al. (2006, PLoS Medicine) eine direkte destabilisierende Wirkung von Ang-2 auf die endotheliale Barriere der Lunge nachgewiesen werden. In dieser *in vivo* Studie entwickelten gesunde Mäuse nach Applikation von Ang-2 eine vaskuläre Hyperpermeabilität und Lungenkongestion (Parikh et al. 2006). Über einen Zusammenhang zwischen einer Barrierestörung der Lunge, welche sich zum Beispiel in Folge einer Pneumokokkenpneumonie entwickeln kann, und einer erhöhten Ausschüttung von Ang-2 sowie einem erhöhten zirkulierenden Ang-2 Serumspiegel wird aktuell diskutiert. Pneumolysin (PLY) ist ein maßgebender Faktor in der Entstehung einer endothelialen Barrierestörung in der Pneumokokkenpneumonie (Witzenrath et al. 2006) und führt, wie eine Studie von Gutbier et al. (2018, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine) zeigte, zu einer Ausschüttung von Ang-2 aus dem pulmonalen Endothel. Der genaue Mechanismus der PLY induzierten Permeabilität ist bisher unklar. Jedoch scheint Ang-2 hier ein bedeutender Faktor zu sein. So wiesen Mäuse, die mit Ang-2 spezifischer *small interfering RNA* (siRNA) behandelt wurden, eine geringere PLY induzierte Permeabilität der Lunge auf als die mit unspezifischer siRNA behandelten Kontrolltiere (Gutbier et al. 2018). Diese Ergebnisse sind auch im Einklang mit

den nachgewiesenen erhöhten Ang-2 Serumspiegeln in Pneumoniepatienten. Hospitalisierte CAP-Patienten wiesen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöhte Ang-2 Serumlevel und verringerte Ang-1 Serumlevel auf. Bei Patienten, die aufgrund der Erkrankung verstarben, war sogar ein signifikanter Unterschied in den Ang-2 Serumleveln sowohl zwischen der gesunden Kontrollgruppe als auch der überlebenden hospitalisierten Gruppe erkennbar (Gutbier et al. 2018).

3 Arbeitshypothese, Ziele und Strategie des Dissertationsprojektes

Die Ergebnisse zahlreicher Studien verdichten die Annahme, dass Ang-2 sowohl ein bedeutender prognostischer als auch ein verlaufsbestimmender Faktor in der Pneumokokkenpneumonie ist. Der genaue Einfluss erhöhter Ang-2-Konzentrationen im Krankheitsgeschehen ist jedoch bis heute unbekannt. In Anbetracht der bekannten Wirkung des Proteins könnte eine reduzierte Ausschüttung von Ang-2 in der Pneumokokkenpneumonie sowohl zu einem verringerten inflammatorischen Geschehen als auch zu einer stabileren pulmonalen endothelialen Barriere führen und somit die Verlaufsprognose einer schweren Pneumokokkenpneumonie verbessern. Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, diese Hypothese näher einzugrenzen, um somit eine verbesserte Grundlage für die Behandlung der Pneumokokkenpneumonie schaffen zu können. Hierfür wurde ein konditionelles Angiopoietin-2-Knockout Modell verwendet. Nach Erarbeitung eines *in vivo* sowie *in vitro* Induktionsprotokolls und einer Phänotypisierung der konditionellen Ang-2 KO-Maus wurden *in vitro* und *in vivo* Studien durchgeführt. Um einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung des inflammatorischen Geschehens in der Pneumokokkenpneumonie und Ang-2 darzustellen, wurden im *in vivo* Infektionsmodell mit *S. pneumoniae* die Ang-2 Genexpression, die Ang-2-Plasmakonzentration, eine Zellanalyse von Blut und BALF sowie eine Zytokinanalyse durchgeführt. Ebenso wurden pathohistologische Gewebeanalysen durchgeführt, die bakterielle Last bestimmt, und klinische Parameter erfasst. Zur Untersuchung des Einflusses von Ang-2 auf die endotheliale Permeabilität wurde *in vitro* die Integrität von Ang-2 KO Endothelzellmonolayern nach Stimulation mit PLY mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. *In vivo* wurde die endotheliale Permeabilität von mit *S. pneumoniae* infizierten Ang-2 KO-Mäusen mittels Bestimmung der Extravasation von zuvor applizierten humanem Serumalbumin quantifiziert.

4 Material und Methoden

4.1 Tiere

4.1.1 Versuchstiere

Die verwendeten Angiotensin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäuse wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité Berlin gezüchtet. Durch Verpaarung von geflochten homozygoten Ang-2-Mäusen, generiert von Taconic Artemis GmbH (Köln), und heterozygoten ubiquitären Cre-ERT2-Deleter-Mäusen konnte eine konditionale Angiotensin-2-Knockout (Ang-2 KO) Maus gezüchtet werden. Aufgrund des heterozygoten Cre-ERT2-Deleters war es möglich, sowohl Tiere mit einem induzierbaren Ang-2 KO (Angiotensin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-}) als auch nicht induzierbare Mäuse (Angiotensin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{-/-}) zu züchten. Die nicht induzierbaren Geschwistertiere dienten in diesem Versuchsdesign als Kontrolle (WT). Für *in vivo* Infektionsversuche wurden weibliche Angiotensin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäuse im Alter von 7 – 8 Wochen mit Tamoxifen behandelt. Die Tiere, die in ihrer Erbanlage einen Cre-ERT2-Deleter aufwiesen, entwickelten durch diese Behandlung einen Ang-2 KO. Nach Überprüfung der Gendelektion wurden die Tiere in einem Alter von 9 – 10 Wochen mit *S. pneumoniae* infiziert. Zur Gewinnung von primären murinen pulmonalen Endothelzellen (mPEC) für *in vitro* Versuche wurden sowohl weibliche als auch männliche Angiotensin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäuse im Alter von 8 – 11 Wochen verwendet. Die Induktion einer Ang-2-Defizienz (Ang-2 D) erfolgte hierbei *in vitro*. Die in der Arbeitsgruppe etablierten *in vivo* Infektionsversuche erfolgten nach standardisiertem Protokoll. Im Sinne des 3R-Prinzip (Russell and Burch 1960) wurde auf eine Etablierung des Protokolls mit männlichen Tieren verzichtet, so dass mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede in diesem Versuchsdesign nicht ausgeschlossen werden können. Zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Arbeit waren bezüglich der *in vitro* Versuche keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bekannt. Somit wurden, um die Versuchstierzahlen gering zu halten und um ein heterogenes Versuchsbild zu ermöglichen, die männlichen Geschwistertiere in die *in vitro* Versuche einbezogen. Alle durchgeführten Versuche wurden von der zuständigen Landesbehörde, Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, genehmigt (A-0050/15, T-0326/11).

4.1.2 Haltung

Die Tiere wurden in isolierten, ventilerten Käfigen (Typ II-L, Bioscience, Castrop-Rauxel) auf Standardeinstreu gehalten. Es wurden maximal 6 Tiere in einem Käfig gehalten. Neben Nistmaterial und einem Unterschlupf stand den Mäusen elletiertes Futter und Wasser *ad libitum*

zur Verfügung. Ein Wechsel zwischen Hell- und Dunkelphase erfolgte alle 12 h. Die Durchschnittstemperatur lag zwischen 20° – 22° C und die Luftfeuchtigkeit betrug 50 – 60 %.

4.2 Isolierung und Kultivierung primärer muriner pulmonaler Endothelzellen

Angiopoietin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäuse wurden zur Entnahme der Lungen mit einem Gemisch aus 100 mg/kg Körpermasse Ketamin und 20 mg/kg Körpermasse Xylazin (Volumen 200 µl) intraperitoneal narkotisiert und heparinisiert (Volumen 50 µl, Heparin 2500 I.E./ml). Nach Überprüfung des Zwischenzehenreflexes zur Beurteilung der Narkosetiefe wurde die Maus in Rückenlage fixiert und das Operationsfeld mit Braunol® desinfiziert. Nach Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte eine Blutentnahme aus der *Vena cava caudalis*, welche zu einem sofortigen Herz-/Kreislaufstillstand führte. Das Zwerchfell wurde entfernt und der Brustkorb eröffnet. Die Lunge wurde entnommen, in einer Petrischale mit Hanks Balanced Salt Solution w/o (HBSS⁻) gewaschen und mit einer Schere fein zerkleinert. Das Lungengewebe wurde zur enzymatischen Aufspaltung in Verdaumedium (HBSS⁻ + Dispase 5 IE/ml + DNase 0.5 mg/ml) überführt und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Um Gewebefragmente zu entfernen, wurde die Zellsuspension über einen sterilen 70 µM Nylonfilter in ein Reagenzgefäß mit Endothelzellmedium (siehe Anhang, Kapitel 10.3) überführt. Die Aktivität der Enzyme wurde durch das serumhaltige Medium neutralisiert. Die im Filter vorhandenen Gewebereste wurden mit einem sterilen Spritzenstempel durch den Nylonfilter gedrückt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf mehrere Reagenzgefäße aufgeteilt und 5 Minuten bei 4 °C und 700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit Endothelzellwaschpuffer (siehe Anhang, Kapitel 10.3) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde gepoolt und erneut 5 Minuten bei 4 °C und 700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Zur spezifischen Isolierung von mPEC wurden immunmagnetische Partikel verwendet (Dynabeads®Sheep Anti-Rat IgG, Life Technologies, Darmstadt). Diese Partikel, auch Beads genannt, sind 4,5 µM große, antikörperkonjugierte Polystyren-Kügelchen mit einem Eisenoxidkern. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Antigen-/Antikörper-Reaktion. Nach Kopplung der Beads an die Zielzellen konnte durch magnetische Separierung die gewünschte Zellpopulation isoliert werden. Zur Isolierung der mPEC diente als spezifischer primärer Antikörper Purified Rat Anti-Mice CD144 (BD Biosciences, Heidelberg). Als Sekundärantikörper wurde das bereits an die Beads gekoppelte Sheep Anti-Rat IgG eingesetzt. Die Beads wurden in ein steriles Reagenzgefäß mit Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) + 0,5 % Bovines Serum Albumin (BSA) gegeben und dreimal gewaschen. Für den Waschvorgang wurde das Reagenzgefäß an einem Magneten (DynaMag™-Spin Magnet, Life Technologies, Darmstadt) befestigt. Die Beads lagerten sich der dem Magneten zugerichteten Gefäßwand an und die Flüssigkeit konnte entfernt werden. Das Röhrchen wurde vom Magneten genommen und erneut mit Endothelzellwaschpuffer versetzt. Nach dem letzten

Waschvorgang wurden die Beads mit dem primären Antikörper CD144 und Endothelzellwaschpuffer in Suspension gebracht und eine Stunde in einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut dreimal gewaschen. Das wie oben beschrieben gewonnene Zellpellet wurde in Endothelzellwaschpuffer aufgenommen und zu den mit CD144-Antikörper konjugierten Beads hinzugefügt. Es erfolgte eine Inkubation von 30 Minuten in einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension auf mehrere sterile Reagenzgefäße aufgeteilt und fünfmal mit Hilfe der Magnetvorrichtung gewaschen. Dadurch konnten die Zellen, die nicht der Zielpopulation entsprachen, entfernt werden. Im letzten Waschschrift wurde gepoolt und die Flüssigkeit entfernt. Die mit Beads konjugierten mPEC wurden mit Endothelzell-Wachstumsmedium versetzt und auf mit Fibronectin beschichtete Zellkulturplatten gebracht. Die mPEC wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Endothelzell-Wachstumsmedium erneuert. Weitere Mediumwechsel erfolgten alle 48 Stunden. Zur Passagierung sowie Gewinnung kultivierter Endothelzellen für weiteren Analysen wurden die Zellen mit 37 °C warmen PBS gewaschen. Hiernach wurde eine Trypsin-/EDTA-Lösung in die Zellkulturschale gegeben. Nach 2 Minuten wurde der Verdauungsprozess mit fetalem Kälberserum (FCS) gestoppt und der Überstand in ein Reagenzgefäß überführt. Es wurde erneut PBS in die Zellkulturschale gegeben und die noch in der Schale befindlichen Endothelzellen mit einem Zellschaber gelöst. Diese Zellsuspension wurde ebenfalls in das Reagenzgefäß hinzugegeben und zentrifugiert (5 min, 1248 x g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Für eine erneute Kultivierung wurde das Zellpellet mit Endothelzell-Wachstumsmedium versetzt und in gleichen Anteilen auf Fibronectin beschichtete Zellkulturplatten gebracht. Endothelzellen, die anschließend für weitere Untersuchungen verwendet wurden, wurden je nach Analyseprotokoll weiterverarbeitet.

4.3 DNA-Isolierung aus Ohrbiopsien und aus primären murinen pulmonalen Endothelzellen von Angiopoietin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen

4.3.1 Isolierung von DNA aus Ohrbiopsien

Ohrbiopsien von Angiopoietin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité Berlin entnommen. Die Ohrbiopsien der Tamoxifen behandelten Angiopoietin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäuse, wurden nach Ende der Induktion des Ang-2 KO unter Isoflurannarkose (Harvard Apparatus Anesthetic Vaporizer, Harvard Apparatus) entnommen. Die Biopsien wurden für circa 1 h bei 56 °C in 500 µl SNET-Puffer (5 M NaCl, 10 % SDS, 1 M pH 8,0 Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 0,5 M EDTA) + 5 µl Proteinase K inkubiert. Nach dem sich die Biopsien vollständig aufgelöst hatten, wurde

der Biopsieverdau durch eine 10-minütige Inkubation der Proben bei 99 °C gestoppt. Anschließend wurde 2 Minuten bei 16060 x g zentrifugiert. Dem Überstand wurde 300 µl eiskaltes Isopropanol hinzugefügt und das Gemisch leicht geschüttelt. Daraufhin erfolgte eine erneute Zentrifugation der Probe (15 min, 16060 x g). Nach Entfernen des Überstandes wurde der Probe 700 µl Ethanol (70 %) hinzugefügt, 5 min bei 16060 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend entfernt. Zur vollständigen Entfernung des Ethanols wurde die Probe ca. 30 min kopfüber mit geöffnetem Deckel unter einem Abzug gelagert. Danach wurde die isolierte DNA in Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Thylendiamintetraessigsäure-Puffer (TE-Puffer) gelöst und ca. 1 h bei 60 °C inkubiert. Die DNA Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

4.3.2 Isolierung von DNA aus primären murinen pulmonalen Endothelzellen

In vitro isolierte und kultivierte mPEC wurden wie in 4.2 beschrieben von 24 Well Platten gewonnen. Die Isolierung der DNA erfolgte wie in 4.3.1 beschrieben.

4.4 Identifizierung Cre-exprimierender Angiopoietin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Mäuse auf Genomebene

4.4.1 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Identifizierung der Cre-exprimierenden Angiopoietin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Mäuse wurde, ausgehend von der isolierten DNA, eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Hierzu wurde das PerfectTaq Plus DNA Polymerase – 1000U Kit von 5Prime (Hamburg) und dNTP Mix (10 mM) von Thermo Fisher Scientific Germany (Braunschweig) verwendet. Die Primer 1242-1 und 1242-2 (TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin) dienten zur Identifizierung der Cre-exprimierenden Mäuse (siehe Tabelle 2). Die Proben und der Reaktionsansatz wurden auf Eis pipettiert.

Tabelle 2: Reaktionsansatz zur Identifizierung Cre-exprimierender Angiopoietin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Mäuse mittels Polymerase-Kettenreaktion

Master Mix PCR	
PCR Buffer (10x)	5 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,5 µl
1242-1 (5 µM)	0,5 µl

Tabelle 2 (fortgeführt): **Reaktionsansatz zur Identifizierung Cre-exprimierender Angiotensin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Mäuse mittels Polymerase-Kettenreaktion**

1242-2 (5 µM)	0,5 µl
PerfectTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl
PerfectLoad Dye Concentrate	5 µl
Aqua Dest.	8,375 µl
Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz	20 µl

Abkürzungen: PCR – Polymerase-Kettenreaktion

Tabelle 3: **Temperaturprogramm zur Identifizierung Cre-exprimierender Angiotensin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Mäuse mittels Polymerase-Kettenreaktion**

Temperaturprogramm PCR		
Zyklus	Temperatur	Zeit
1 (1x)	94 °C	5 min
2 (30x)	94 °C (Denaturierung)	1 min
	55 °C (Annealing)	1 min
	72 °C (Elongation)	1,5 min
3 (1x)	72 °C	10 min

Abkürzungen: PCR – Polymerase-Kettenreaktion

5 µl DNA der jeweilig zu analysierenden DNA-Probe wurde dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Die Amplifikation der erwünschten DNA-Sequenz erfolgte nach Eingabe des Temperaturprogrammes in einem Thermocycler (siehe Tabelle 3).

4.4.2 Identifizierung des Polymerase-Kettenreaktion-Produktes Cre-exprimierender Angiotensin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Mäuse mittels Agarose-Gelelektrophorese

Nach Amplifikation des gesuchten PCR-Produktes wurden die Proben für maximal 24 Stunden bei 4 °C gelagert. Es wurde ein 1,5 % -iges Agarose-Gel hergestellt. Die Agarose wurde unter Aufkochen in Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Essigsäure-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TAE-Puffer) gelöst und in eine Flachbettapparatur mit Taschenkämmen gegossen. Als

DNA-bindender Farbstoff diente Ethidiumbromid. Nach Aushärten des Gels wurde das Agarose-Gel in eine mit TAE-Puffer befüllte Laufwanne überführt und die Proben in die Geltaschen aufgetragen. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte wurde ein DNA-Leiter (100 bp) mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 1 h bei einer Spannung von 100 V. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mit dem Gel Jet Imager (INTAS Science Imaging Instruments, Göttingen) unter UV-Licht sichtbar gemacht. Bei Cre-exprimierenden Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-}-Mäusen entstand ein DNA-Fragment von 310 Basenpaaren. Bei nicht Cre-exprimierenden Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{-/-} Mäusen war kein DNA-Fragment sichtbar.

4.5 Induktion einer Angiopoietin-2-Defizienz in Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen und in primären murinen pulmonalen Endothelzellen von Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen

4.5.1 *In vivo* Induktion eines Angiopoietin-2-Knockout

Zur Induktion einer Ang-2 KO wurden Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäuse mit Tamoxifen behandelt. Um eine Stocklösung (10 mg/ml) herzustellen, wurde Tamoxifen in Ethanol (99,9 %) mittels eines Ultraschallbades gelöst und anschließend Sonnenblumenkernöl beige-mischt. Das Verhältnis von Ethanol zu Sonnenblumenkernöl betrug 1:10. Die Stocklösung wurde für jeden Induktionszyklus frisch angesetzt, aliquotiert und maximal 5 Tage bei - 20 °C gelagert. Zur Induktion des Knockouts wurden 7 – 8 Wochen alten Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen je 100 µl der Tamoxifen Stocklösung *intra-peritoneal (i.p.)* injiziert. Nach 5 Tagen Wartezeit wurde die Gendeletion mittels PCR überprüft (siehe 4.6.1). Als Probenmaterial dienten hierfür Ohrbiopsien, die unter Inhalationsnarkose (Isofluran, Narkoseeinleitung 5 %, Aufrechterhaltung der Narkose 2 %) entnommen wurden. Die nicht induzierbaren Geschwistertiere wurden in gleicher Weise behandelt.

4.5.2 *In vitro* Induktion einer Angiopoietin-2 Defizienz in primären murinen pulmonalen Endothelzellen

Primäre murine pulmonale Endothelzellen (mPEC) wurden wie in Abschnitt 4.2 beschrieben von induzierbaren und nicht induzierbaren Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen isoliert. Zur Induktion einer Ang-2-Defizienz wurden die mPEC 24 h nach Isolation an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) behandelt. Das 4-OHT wurde in 99,9 % Ethanol gelöst. Die 1 mM Stammlösung wurde bei - 80 °C gelagert und vor Verwendung bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Wachstumsmedium-4-OHT-Lösung wurde täglich frisch an-

gesetzt und ein vollständiger Mediumwechsel durchgeführt. Die Endkonzentration des Liganden im Medium betrug 1 μM . Induzierbare und nicht induzierbare Angiopoietin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2-mPEC wurden auf gleiche Weise behandelt.

4.6 Bestätigung der Angiopoietin-2-Defizienz auf Genomebene

4.6.1 Polymerase-Kettenreaktion

Ausgehend von der isolierten DNA wurde, um eine erfolgreiche Induktion einer Ang-2-Defizienz zu bestätigen, eine PCR durchgeführt. Hierzu wurde das PerfectTaq Plus DNA Polymerase – 1000U Kit von 5Prime (Hamburg) und dNTP Mix (10 mM) von Thermo Fisher Scientific Germany (Braunschweig) verwendet. Zur internen DNA-Kontrolle wurden die Primer 1260_1 und 1260_2 (TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin) verwendet. Die Primer 5676_33 und 5677_40 (TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin) dienten zur Bestätigung der induzierten Defizienz (siehe Tabelle 4). Die Proben und der Reaktionsansatz wurden auf Eis pipettiert.

Tabelle 4: **Reaktionsansatz zur Bestimmung einer Angiopoietin-2-Defizienz mittels Polymerase-Kettenreaktion**

Master Mix PCR	
PCR Buffer (10x)	5 μl
Mg ²⁺ (25 mM)	2 μl
dNTP Mix (10 mM)	1 μl
5676_33 (5 μM)	1 μl
5677_40 (5 μM)	1 μl
1260_1 (5 μM)	1 μl
1260_2 (5 μM)	1 μl
PerfectTaq DNA Polymerase (5 U/ μl)	0,2 μl
PerfectLoad Dye Concentrate	10 μl
Aqua Dest.	22,8 μl
Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz	45 μl

Abkürzungen: PCR – Polymerase-Kettenreaktion

Tabelle 5: Temperaturprogramm zur Bestimmung einer Angiopoietin-2-Defizienz mittels Polymerase-Kettenreaktion

Temperaturprogramm PCR		
Zyklus	Temperatur	Zeit
1 (1x)	95 °C	5 min
2 (36x)	95 °C (Denaturierung)	0,5 min
	60 °C (Annealing)	0,5 min
	72 °C (Elongation)	1 min
3 (1x)	72 °C	10 min

Abkürzung: PCR – Polymerase-Kettenreaktion

5 µl DNA der jeweilig zu analysierenden DNA-Probe wurde dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Die Amplifikation der erwünschten DNA-Sequenz erfolgte nach Eingabe des Temperaturprogrammes in einem Thermocycler (siehe Tabelle 5).

4.6.2 Identifizierung des Polymerase-Kettenreaktion-Produktes einer *in vivo* oder *in vitro* induzierten Angiopoietin-2-Defizienz in Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde wie in 4.4.2 beschrieben durchgeführt. Die Fragmentgröße der internen DNA-Kontrolle betrug 1150 Basenpaare. Bei einer erfolgreichen Induktion einer Ang-2-Defizienz entstand ein DNA-Fragment von 230 Basenpaaren. Bei nicht induzierbaren Kontrolltieren oder bei Tieren, bei denen die Induktion nicht erfolgreich war, zeigte sich ein DNA-Fragment von 585 Basenpaaren.

4.7 Bestätigung einer Angiopoietin-2-Defizienz auf Genexpressionsebene

4.7.1 RNA-Isolierung aus murinen Lungen

Ang-2 KO- und WT-Mäuse wurden wie in 4.2 beschrieben narkotisiert und heparinisiert. Die Narkosetiefe wurde überprüft und die Maus fixiert. Das Operationsfeld wurde mit Braunol® desinfiziert. Nach Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte eine Blutentnahme aus der *Vena cava caudalis*. Diese führte zu einem sofortigen Herz-/Kreislaufstillstand. Das Zwerchfell wurde ent-

fernt und der Brustkorb eröffnet. Die Lunge wurde entnommen mit 1 ml Trizol in einem gentleMacs Tube mit dem gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) homogenisiert. Anschließend wurde das Lungenhomogenat in ein steriles Reagenzgefäß überführt. Zur Isolierung der RNA wurde das Direct-zol™ RNA MiniPrep der Firma Zymo Research (Freiburg im Breisgau) verwendet. Die RNA-Konzentration der Proben wurde mittels spektrophotometrischer Analyse (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) bestimmt.

4.7.2 Isolierung von RNA aus primären murinen pulmonalen Endothelzellen

Primäre murine pulmonale Endothelzellen (mPEC) von Angiotensin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen wurden wie in 4.2 und 4.5.2 beschrieben isoliert, auf Fibronectin beschichteten 12 Well Platten kultiviert und induziert. Nachdem ein Endothelzellmonolayer von circa 80 – 90 % das Well bedeckte, wurden die Zellen mit 37 °C warmer, 1 x konzentrierter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und 500 µl Trizol pro Well auf den Endothelzellmonolayer gegeben. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Endothelzellen vom Wellboden gelöst. Die in Trizol suspendierten Endothelzellen wurden in ein steriles Reagenzgefäß überführt. Unter Zuhilfenahme des Direct-zol™ RNA MiniPrep der Firma Zymo Research (Freiburg im Breisgau) wurde die RNA isoliert. Mit dem Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) wurden die Proben spektrophotometrisch analysiert und die jeweilige RNA-Konzentration bestimmt.

4.7.3 cDNA-Synthese aus RNA-Proben von *in vivo* induzierten Angiotensin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen sowie *in vitro* induzierten primären murinen pulmonalen Endothelzellen von Angiotensin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen

Die RNA wurde wie in 4.7.1 und 4.7.2 beschrieben aus Lungen von Ang-2 KO- und WT-Mäusen sowie aus *in vitro* induzierten mPEC von Angiotensin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen isoliert. Die gewonnene RNA wurde unter Zuhilfenahme des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems (Darmstadt) zu cDNA umgeschrieben. Die Durchführung der cDNA-Synthese erfolgte nach Herstellerangaben.

4.7.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die Überprüfung einer erfolgreichen Induktion der Ang-2-Defizienz auf Genexpressionsebene erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). RNA von Lungen- und Endothelzellproben wurde wie in 4.7.1 und 4.7.2 beschrieben gewonnen und zu cDNA

(siehe 4.7.3) umgeschrieben. Die qPCR wurde mit Hilfe des TaqMan® Gene Expression Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt), eines *Assay on Demand* sowie des ABI 7300-Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Hierbei wurde die Expression des geflochtenen Maus Ang-2 Genabschnittes und der Maus-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welche als endogene Kontrolle (Housekeeping Gen) diente, bestimmt (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7). Die Proben und der Mastermix wurden als Dreifachbestimmung in 96-Well Platten auf Eis pipettiert.

Tabelle 6: Ansatz *Assay on Demand* Angiopoietin-2 (Ang-2) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

<i>Assay on Demand</i> Ang-2		<i>Assay on Demand</i> GAPDH	
Angpt2_EA1_fw	0,3704 µl	m_GAPDH_fw	0,3704 µl
Angpt2_EA1_rv	0,3704 µl	m_GAPDH_rv	0,3704 µl
Angpt2_EA1_probe	0,1 µl	m_GAPDH_probe	0,1 µl
Nuklease freies Wasser	0,1592 µl	Nuklease freies Wasser	0,1592 µl
Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz	1 µl	Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz	1 µl

Tabelle 7: Reaktionsansatz zur Bestimmung der Genexpression von Angiopoietin-2 mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Master Mix qPCR	
TaqMan® Gene Expression Mastermix	10 µl
Nuklease freies Wasser	4 µl
<i>Assay on Demand</i>	1 µl
Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz	15 µl

Abkürzungen: qPCR – quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Tabelle 8: Temperaturprogramm zur Bestimmung der Genexpression von Angiopoietin-2 mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Temperaturprogramm qPCR			
Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1x	50 °C (Inkubation)	2 min
2	1x	95 °C (Inkubation)	10 min
3	40x	95 °C (Denaturierung)	0,15 min
4	1x	60 °C (Elongation)	1 min

Abkürzungen: qPCR – quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Jeweils 5 µl cDNA der zu analysierenden Probe wurden dem Reaktionsansatz auf einer Prism® 96-Well-Optical-Reaction-Plate (Applied Biosystems, Darmstadt) hinzugefügt und bei 1000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mittels des ABI 7300-Real Time PCR System analysiert (siehe Tabelle 8). Zur weiteren Auswertung der Proben wurde die relative Quantifizierung (RQ) des Zielgens in Relation zum Housekeeping Gen mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode errechnet (Livak und Schmittgen 2001)

4.8 *In vitro* Versuche mit primären murinen pulmonalen Endothelzellen

4.8.1 Untersuchung des Einflusses von Angiopoietin-2 auf die Integrität eines mit Pneumolysin stimulierten primären murinen pulmonalen Endothelzellmonolayer mittels Immunfluoreszenzfärbung

Die isolierten mPEC von Angiopoietin-2-^{loxP/loP}-Cre-ERT2 Mäusen wurden wie in 4.2 und 4.5.2 beschrieben auf einer mit sterilen Thermanox™ Coverslips (D=13 mm; Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig) versehenen 24 Well Platte kultiviert und induziert. Damit eine Stimulation der Endothelzellen erfolgen konnte, musste der Zellmonolayer etwa 80 – 90 % des Wells bedecken. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 37 °C warmem 1 x konzentriertem, sterilem PBS gewaschen. Daraufhin wurde frisches Endothelzellmedium auf die Zellen gegeben und circa 5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Kurz vor der Stimulation wurde die Hälfte des Überstandes aus dem Well entnommen und bei -20 °C eingefroren. Das fehlende Volumen des Endothelzellmediums wurde nun mit der Stimulationssubstanz versehen und in das Well gegeben. Zur Stimulation der mPEC wurde PLY (1 µg/ml) verwendet. Als Stimulationsskontrolle diente PBS. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde der Überstand entfernt und bei -20 °C eingefroren. Der Endothelzellmonolayer wurde mit PBS

gewaschen und mit 3 % Paraformaldehyd für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die stimulierten mPEC bei 4 °C in PBS gelagert. Als Marker zur Beurteilung der Integrität der stimulierten Endothelzellmonolayer wurden VE-Cadherin und F-Aktin gewählt. Zu Beginn der Immunfluoreszenzfärbung wurde die Zellmembran der fixierten Endothelzellmonolayer für 15 Minuten mit 1 % Triton-Lösung permeabilisiert und anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Um eine unspezifische Antikörper Bindung zu vermeiden, wurde zunächst der mPEC-Monolayer mit Verdünnungsmedium + 5 % Kaninchenserum geblockt (30 min, Raumtemperatur). Anschließend wurde der primäre Antikörper, VE-Cadherin (goat anti human/mouse, polyklonal, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), in einer Verdünnung von 1:200 (in Verdünnungsmedium) und einem Volumen von 200 µl pro Well, auf die mPEC aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem die mPEC dreimal mit PBS für 5 Minuten gewaschen wurden, wurde ein mit Alexa 488 gelabelter Sekundärantikörper (Alexa fluor 488, rabbit anti goat, IgG, MoBiTec, Göttingen) in Verdünnungsmedium + 1 % Kaninchenserum 1:8000 verdünnt, jeweils 200 µl auf den Endothelzellmonolayer aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die F-Aktin Färbung erfolgte durch Phalloidin (Alexa 546 Phalloidin, MoBiTec, Göttingen) in der Verdünnung 1:200 für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde erneut dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Schließlich erfolgte eine Färbung der Zellkerne mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (10 min, Raumtemperatur). Nachdem der Zellmonolayer erneut dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen wurde, wurde das Thermanoxplättchen mit dem angefärbten Zellmonolayer vorsichtig mittels einer Pinzette aus dem Well entnommen und auf einen bereits mit 8 µl Mowiol beschichteten Objektträger gelegt. Danach wurde der Zellmonolayer mit 8 µl Mowiol beschichtet und mit einem sterilen Glasplättchen versehen. Nachdem das Mowiol ausgehärtet war (ca. 30 min), wurden die Ränder des Glasplättchens mittels farblosen Nagellacks versiegelt. Die Objektträger wurden dunkel bei 4 °C gelagert. Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit dem Axioskop 2 MOT Konfokal Laserscanning Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) und der zugehörigen Software (LSM 5 Pascal Version 2.8 SP1, Carl Zeiss, Oberkochen). Pro Versuch wurde ein unstimulierter Zellmonolayer zur Überprüfung der Gendelektion mittels PCR-Analyse mitgeführt. Die Endothelzellen in diesem Well wurden nach Stimulationsende mit 37 °C warmem PBS gewaschen und anschließend wie in 4.2 beschrieben aus der Zellkulturschale gelöst. Aus dem Zellpellet wurde wie in 4.3.1, 4.6.1 und 4.6.2 beschrieben DNA isoliert und eine PCR-Analyse durchgeführt.

4.9 *In vivo* Infektionsversuche mit Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen

4.9.1 Anzucht von *Streptococcus pneumoniae*

Für *in vivo* Infektionsversuche wurde der Erreger *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC7978) angezüchtet. Hierzu wurden mit einer Impföse mehrere Verdünnungsausstriche des Bakterienstocks auf Columbiaagarplatten (5 % Schafblut) angefertigt. Die mit *S. pneumoniae* beimpften Agarplatten wurden 8 – 9 Stunden bei 37,5 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden Einzelkolonien mittels eines sterilen Wattestäbchens in Todds-Hewitt-5 % Yeast-Bouillon + 10 % FCS eingerührt und die Kokkenanzahl mittels Photometer (Uvikon XS, BioTek Instruments, Bad Friedrichshall) bestimmt. Nachdem eine optische Dichte (OD) von 0,03 – 0,04 erreicht wurde, erfolgte eine Wachstumsphase von circa 2 Stunden in einem Wasserbad bei 37 °C. Die Erregeranzucht wurde nach Beginn der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD von 0,3 – 0,4 durch Zentrifugation (4630 x g, 10min) gestoppt. Eine OD von 0,1 entspricht einer Erregerkonzentration von 1 x 10⁸ koloniebildenden Einheiten (KbE)/ml. Um die erwünschte Infektionsdosis von 1 x 10⁷ KbE/ml zu erhalten, wurde der Überstand nach dem Zentrifugieren abpipettiert und das Erregerpellet mit der entsprechenden Menge 1 x konzentrierter, steriler PBS Lösung resuspendiert. Die Kontrolle der Infektionsdosis erfolgte durch Beimpfen von Agarplatten.

4.9.2 Intranasale Inokulation von *Streptococcus pneumoniae*

Ang-2 KO- und WT-Mäuse wurden durch *intranasale* Inokulation mit *S. pneumoniae* infiziert. Die Erregersuspension wurde wie in Abschnitt 4.9.1 beschrieben vorbereitet. Nachdem das Körpergewicht und die Körpertemperatur erfasst wurden, erfolgte die Narkose der Mäuse durch eine *i.p.* Injektion von 60 µl einer Ketamin-Xylazin-Lösung (Ulmer Mix (siehe Anhang)). Die *intranasale* Inokulation wurde von Dr. med. vet. Birgitt Gutbier und Dipl. biol. Denise Barthel durchgeführt. Pro Nasenloch wurde den Tieren 10 µl der Erregersuspension (Infektionsdosis: 1 x 10⁷ KbE/Tier) appliziert. Den nicht-infizierten Kontrolltieren wurde auf gleiche Weise 20 µl steriles 1 x konzentriertes PBS in die Nasenlöcher verabreicht. Die Tiere wurden bis zum Erwachen aus der Narkose überwacht, mit einer Infrarotlampe gewärmt und die Augen zum Schutz vor Austrocknung mit einem Augengel behandelt. Während des gesamten Versuchszeitraumes wurde zweimal täglich der Gesundheitszustand der Tiere überprüft. Kontrolliert wurden das Allgemeinbefinden, das Sozialverhalten, das Fell, die Körpertemperatur, das Körpergewicht und die Atmung.

4.9.3 Organentnahme bei mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäusen zur histopathologischen Untersuchung und histochemischen Lokalisierung von Angiopoietin-2

Ang-2 KO- und WT-Mäuse wurden wie in Abschnitt 4.9.2 beschrieben mit *S. pneumoniae* infiziert und 48 h *post infectionem* (*p.i.*) präpariert. Um die Organe zu entnehmen, wurden die Tiere wie in 4.2.1 beschrieben narkotisiert und heparinisiert. Nachdem die Narkosetiefe überprüft und die Maus fixiert wurde, wurde das Operationsfeld mit Braunol® desinfiziert. Ein Zugang zur Trachea wurde präpariert, um diese eine (lockere) Ligatur gelegt und das *Abdomen* median eröffnet. Anschließend erfolgte eine Blutentnahme aus der *Vena cava caudalis*. Die Blutentnahme führte zu einem sofortigen Herz-/Kreislaufstillstand. Dem Blut wurden 100 µl entnommen, in ein EDTA-beschichtetes Röhrchen gegeben und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Das restliche entnommene Blut wurde während der weiteren Präparation in einem sterilen Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. In der Inspirationsphase der letzten Atemzüge wurde die Trachea durch Verknotung des Fadens verschlossen. Nachdem das Zwerchfell entfernt und der *Thorax* entlang des Brustbeins eröffnet wurde, wurde das gesamte Herz-Lungen-Paket vorsichtig entlang der Luftröhre herauspräpariert. Des Weiteren erfolgten eine Separierung und Entnahme von Milz, Nieren, Leber und Magen-Darm-Trakt. Die entnommenen Organe wurden in eine histologische Einbettkassette gelegt und in 4 % Paraformaldehyd gelagert. Weitere Arbeitsschritte zur histologischen und immunhistochemischen Analyse der murinen Organe wurden nach Standardprotokoll im Institut für Tierpathologie der FU Berlin durchgeführt (Dietert et al. 2017). Die Proben wurden durch Dr. Kristina Dietert im Institut für Tierpathologie der FU Berlin histopathologisch analysiert und nach immunhistochemischer Färbung auf das Vorkommen von Ang-2 untersucht sowie semiquantitativ ausgewertet. Hierbei erfolgte die immunhistochemische Färbung mittels ABC-AP Methode. Als primärer Antikörper diente Angiopoietin-2 (AF623) (goat anti human, IgG, polyklonal, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt), in einer Verdünnung von 1/10. Zur Visualisierung von Ang-2 wurde Neufuchsin verwendet. Das Auftreten positiver Ang-2-Signale im Lungengewebe wurde mit 1 bis 4 Punkten bewertet (Tabelle 9). Des Weiteren wurde von jedem Tier zur Überprüfung der Gendelektion eine Probe von Schwanz und/oder Ohr entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 9: **Bewertungsschema der immunhistochemischen Untersuchung des Lungengewebes von *Streptococcus pneumoniae* infizierten und scheininfizierten Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen und Kontrollmäusen auf das Vorkommen von Angiopoietin-2 (Ang-2)**

Positive Ang-2-Signale	Bewertung
Vereinzelt	1

Tabelle 9 (fortgeführt): **Bewertungsschema der immunhistochemischen Untersuchung des Lungengewebes von *Streptococcus pneumoniae* infizierten und scheininfizierten Angiotensin-2-Knockout-Mäusen und Kontrollmäusen auf das Vorkommen von Angiotensin-2 (Ang-2)**

Geringgradig	2
Mittelgradig	3
Hochgradig	4

4.9.4 Bestimmung der pulmonalen Permeabilität von *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäusen

Die Quantifizierung der pulmonalen Permeabilität erfolgte durch Messung der Konzentration von zuvor appliziertem humanen Serumalbumin (HSA) in Blutplasma und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) und der Bestimmung des BALF/Plasma-Quotienten aus den ermittelten HSA-Konzentrationen. Beim verwendeten Versuchssetting für diese Analyse war der Hauptfokus, Blut- und Lungenlavageproben zu gewinnen und dafür die Lungengefäße schonend blutfrei zu spülen (und zeitgleich Lungenfunktionsparameter wie Resistance und Compliance zu ermitteln). Hierfür wurde eine spezielle Perfusionsanlage (Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March) verwendet. Diese bestand aus einer doppelwandigen Plexiglaskammer, die mit einem Deckel dicht verschlossen werden konnte. Anschlüsse zur Perfusion, Ventilation und Messung verschiedener Parameter waren in diese Kammer eingelassen. Durch die Perfusionsanlage konnte eine von Körperkreislauf isolierte blutfreie Perfusion und Beatmung der Mauslunge durchgeführt werden. Die konstante Perfusion der Lunge (1 ml/min) wurde durch eine Peristaltikpumpe ermöglicht (Reglo-Analog Isamtec SA, Glattbrugg, Schweiz). Die Perfusionslösung wurde durch einen Wärmeaustauscher und eine Blasenfalle in die kanülierte Lungenarterie gepumpt. Der pulmonalarterielle Druck konnte mit einem Druckaufnehmer (Pressure Transducer P75, Typ 379, Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March) erfasst werden. Die Beatmung der murinen Lunge erfolgte durch eine direkte Verbindung der tracheotomierten und kanülierten Luftröhre mit einer Druckluftpumpe (Ventilation Control Module (VCM); Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March). Bei offener Kammer wurde die murine Lunge durch Überdruckbeatmung in einem Inspirations-Expirations-Verhältnis von 1:1 und 90 Atemzügen pro Minute ventiliert. Der Luftfluss konnte dabei über ein Feinnadelventil reguliert werden. Nach dem Schließen der Kammer erfolgte, durch Umstellen eines Drei-Wege-Hahnes, die Umleitung der Beatmungsluft zu einer Venturidüse. Diese Düse konnte durch eine Verbindung zur Kammer einen negativen Innendruck erzeugen, wodurch bei geschlossener Kammer eine Unterdruckbeatmung der isolierten Lunge möglich war. Mit Hilfe eines Pneumotachometers wurde das

Atemflusssignal in ein proportionales Drucksignal umgewandelt. Über einen Druckaufnehmer (Differential Pressure Transducer Validyne DP45-14, Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March) konnten elektrische Messungen erfolgen und Veränderungen des Kammer- und Trachealdrucks durch weitere Druckaufnehmer erfasst werden (Pressure Transducer MPX, Typ 399/2, Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March). Eine Software ermöglichte die Aufzeichnung der gewonnen Messdaten (Pulmodyn Software, Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March). Ang-2 KO- und WT-Mäuse wurden mit 1×10^7 KbE/Tier *S. pneumoniae intranasal* infiziert und 48 h *p.i.* präpariert. Vor der Präparation wurde den Mäusen von Frau Dr. Birgitt Gutbier 1 mg HSA in einem Volumen von 75 μ l Natriumchloridlösung (0,09 %) in die Schwanzvene appliziert. Die Tiere wurden eine Stunde nach der HSA Injektion wie in 4.2.1 beschrieben narkotisiert und heparinisiert. Nach Überprüfung der Narkosetiefe wurden sie in Rückenlage in der Plexiglaskammer der Perfusionsanlage fixiert und das Operationsfeld mit Braunol® desinfiziert. Zur Gewährleistung einer konstanten Beatmung und um ein Kollabieren der Lunge zu verhindern, wurde die Maus tracheotomiert und für die Ventilation mittels Überdruckbeatmung eine Kanüle in die Trachea eingeführt. Anschließend wurde die Bauchhöhle median eröffnet und es erfolgte eine Blutentnahme aus der *Vena cava caudalis*, welche zu einem sofortigen Herz-/Kreislaufstillstand führte. 100 μ l Blut wurden in ein EDTA- beschichtetes Röhrchen gegeben und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Das restliche entnommene Blut wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und zur Plasmagewinnung wie in 4.9.5 beschrieben zentrifugiert und gelagert. Nachdem das Zwerchfell von der Brustwand gelöst und die aus dem Brustkorb in den Bauchraum ziehenden Strukturen abgesetzt wurden, wurde der Unterkörper mittels eines Scherenschnittes vom Brustkorb abgetrennt. Daraufhin wurde der Brustkorb eröffnet, die Lungenarterie identifiziert, ligiert und mittels Katheter kanüliert. Um einen zufriedenstellenden venösen Abfluss der perfundierten Lunge zu gewährleisten, wurde zuvor der linke Ventrikel per Inzision eröffnet. Die Lunge wurde nach Schließen der Kammer in Unterdruckbeatmung ventiliert und mit Natriumchloridlösung (0,9 %) perfundiert. Bei einem endexpiratorischen und endinspiratorischen Kammerdruck von - 4,5 und - 9 cm H₂O betrug die Atemfrequenz 90 Atemzüge pro Minute und das Verhältnis der Inspirationszeit zur Expirationszeit 1:1. Nach 5 Minuten Ventilation und Perfusion, in denen gleichzeitig die Messung von Lungenfunktionsparametern wie Resistance und Compliance erfolgte, wurde die Lunge zweimal mit 650 μ l sterilem PBS, versetzt mit Protease Inhibitor (cOmplete™ Mini, Roche, Basel, Schweiz), lavagiert. BALF-1 und -2 wurden in Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert. Um die Bakterienlast der Tiere zu ermitteln, wurden 30 μ l aus BALF-1 entnommen und wie in 4.9.7 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde die Lunge vorsichtig herauspräpariert. Des Weiteren erfolgten eine Separierung und Entnahme von Milz, Nieren, Leber und Magen-Darm-Trakt. Von der Leber wurde der linke Leberlappen entnommen. Die Organe wurden bis zur

weiteren Verarbeitung bei - 80 °C gelagert. Von jedem Tier wurde zur Überprüfung der Gen-deletion eine Probe vom Schwanz entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20 °C gelagert. Anschließend wurden die gekühlten BALF-Röhrchen für 10 min bei 2330 x g und 4 °C zentrifugiert. Je 250 µl der Überstände von BALF-1 und -2 wurden zur Ermittlung der pul-monalen Permeabilität gepoolt und bei - 80 °C gelagert. Der verbleibende Überstand wurde jeweils entfernt und ebenfalls bei - 80 °C gelagert. Die Zellpellets der BALF-1 und -2 wurden mit 900 µl FACS-Puffer gepoolt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die Quan-tifizierung der pulmonalen Permeabilität, durch Ermittlung der Konzentration von HSA in Blut-plasma und BALF, wurde mit dem Human Albumin ELISA Quantitation Set von Bethyl Labo-ratories (Montgomery, USA) durchgeführt. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und nach Her-stellerangaben verarbeitet. Bei 450 nm wurde mit dem Anthos ht2 Mikroplate Photometer (Anthos Mikrosysteme, Krefeld) und der zugehörigen Software (WinRead Anthos, Anthos Mik-rossysteme, Krefeld) die OD gemessen und die Konzentration pro Milliliter berechnet. Durch Bildung des Quotienten aus der HSA-Konzentration der BALF- und der Blutplasmaprobe konnte die pulmonale Permeabilität beurteilt werden. Je größer der Quotient dieser Proben, desto größer der alveolokapilläre Schaden infolge der Pneumonie.

4.9.5 Gewinnung von murinem Blutplasma

Blut wurde wie in den Abschnitten 4.9.3 und 4.9.4 beschrieben entnommen und 10 min bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Plasma wurde entnommen und bei - 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.9.6 Quantitative Bestimmung von Angiotensin-2 in murinen Blutplasmaprobe-n von *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäusen

Die quantitative Bestimmung von Ang-2 in Blutplasmaprobe-n von Ang-2 KO- und WT-Mäusen erfolgte mittels ELISA. Hierzu wurde das Quantikine® ELISA Mouse/Rat Angiotensin-2 Kit von R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt) verwendet. Die Probenaufbereitung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei 550 nm wurde mit dem Anthos ht2 Mikroplate Photometer (Anthos Mikrosysteme, Krefeld) und der zugehörigen Software (WinRead Anthos, Anthos Mik-rossysteme, Krefeld) die OD gemessen und die Ang-2 Konzentration pro Milliliter berechnet.

4.9.7 Bestimmung der Bakterienlast in Blut und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäusen

Je 5 µl EDTA-Blut und BALF wurden nach Entnahme von mit *S. pneumoniae* infizierten Ang-2 KO- und WT-Mäusen (siehe 4.9.4) pur und in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 auf 5 % Schafblutagarplatten aufgetragen. Die Platten wurden ca. 18 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Einzelkolonien wurden ausgezählt und die Bakterienlast unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufe berechnet.

4.9.8 Ermittlung der Gesamtleukozytenzahl und des Leukozytendifferentialbildes im Blut von *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäusen

Blut von mit *S. pneumoniae* infizierten und scheininfizierten Ang-2 KO- und WT-Mäusen wurde wie in den Abschnitten 4.9.4 beschrieben gewonnen und in einem EDTA-beschichtetem Röhrchen bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Blutbild Analyse erfolgte mit dem scil Vet abc (scil animal care company, Viernheim).

4.9.9 Durchflusszytometrische Analyse der Gesamtleukozytenzahl und des Leukozytendifferentialbildes von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäusen

Die BALF von mit *S. pneumoniae* infizierten und scheininfizierten Ang-2 KO- und WT-Mäusen wurde wie in Abschnitt 4.9.4 beschrieben gewonnen. Für die durchflusszytometrische Zellanalyse (engl. *fluorescence activated cell sorting*, FACS) wurde die BALF in ein FACS-Tube überführt und bis ca. 1 cm unter dem Gefäßrand mit FACS-Puffer aufgefüllt. Anschließend wurde alles für 5 Minuten bei 1080 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde eine Lösung, bestehend aus Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™, BD Bioscience, Heidelberg) und FACS-Puffer auf das Zellpellet gegeben und 5 min bei 4 °C inkubiert (siehe Tabelle 10). Daraufhin wurden die Antikörper hinzugefügt, das Zellpellet kurz aufgeschüttelt und für 30 min bei 4 °C inkubiert (siehe Tabelle 11).

Tabelle 10: **Master Mix Fc Block Zusammensetzung zur durchflusszytometrischen Analyse**

Master Mix Fc Block	
Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™)	2 µl

Tabelle 10 (fortgeführt): **Master Mix Fc Block Zusammensetzung zur durchflusszytometrischen Analyse**

FACS-Puffer	100 µl
-------------	--------

Abkürzungen: FACS – Durchflusszytometrische Analyse (engl. *fluorescence activated cell sorting*)

Tabelle 11: **Zusammensetzung Master Mix der Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit**

Master Mix Antikörper BALF	
PE F4/80	0,8 µl
V450 Ly6G	1 µl
PerCP CD 45	1 µl
PBS	17,2 µl

Abkürzungen: BALF – bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, PBS – phosphatgepufferte Salzlösung

Das FACS-Tube wurde anschließend mit FACS-Puffer gefüllt und bei 4 °C für 5 min und 1080 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4 °C gelagert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mit dem BD FACS Canto II (BD Biosciences, Heidelberg) und die Auswertung der erhobenen Daten mit der BD FACSDiva™ Software (BD Biosciences, Heidelberg) und GraphPad PRISM 4.0 (Graph Pad Software, San Diego, USA).

4.9.10 Die Zytokin- und Chemokinexpression von *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäusen

4.9.10.1 Quantitative Bestimmung von Interleukin-6 in murinen Blutplasmaproben von *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäusen

Das Blutplasma wurde wie in 4.9.5 beschrieben gewonnen. Die quantitative Bestimmung der IL-6 Konzentration im Blutplasma von mit *S. pneumoniae* infizierten und scheininfizierten Ang-2 KO- und WT-Mäusen erfolgte mittels ELISA (BD OptEIA™ Mouse IL-6 ELISA Kit, BD Biosciences, Heidelberg) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die OD der Proben wurde bei 450 nm mit dem Anthos ht2 Mikroplate Photometer (Anthos Mikrosysteme, Krefeld)

und der zugehörigen Software (WinRead Anthos, Anthos Mikrosysteme, Krefeld) bestimmt. Die IL-6 Konzentration wurde pro Milliliter Blutplasma berechnet.

4.9.10.2 Quantitative Bestimmung von Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand-1 in murinen Blutplasmaproben von *Streptococcus pneumoniae* infizierten Angiotensin-2-Knockout-Mäusen und Kontrollmäusen

Die Konzentration von CXCL-1 im Blutplasma von mit *S. pneumoniae* infizierten und scheininfizierten Ang-2 KO- und WT-Mäusen wurde quantitativ mittels ELISA bestimmt. Die Gewinnung des Blutplasmas erfolgte wie in 4.9.5 beschrieben. Zur Analyse der Proben wurde das Quantikine® ELISA Mouse CXCL1/KC Immunoassay Kit von R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Mittels des Anthos ht2 Mikroplate Photometer (Anthos Mikrosysteme, Krefeld) und der zugehörigen Software (WinRead Anthos, Anthos Mikrosysteme, Krefeld) wurde bei 450 nm die OD der Proben gemessen und die Konzentration von CXCL-1 pro Milliliter Blutplasma berechnet.

4.9.10.3 Quantitative Bestimmung pro- und antiinflammatorischer Zytokine und Chemokine in der zellfreien bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von *Streptococcus pneumoniae* infizierten Angiotensin-2-Knockout Mäusen und Kontrollmäusen

Die quantitative Bestimmung von CXCL-1, IL-6, IL-12p40, IL-10, CXCL-2 und TNF- α in der BALF von scheininfizierten und mit *S. pneumoniae* infizierten Ang-2 KO- und WT-Mäusen erfolgte mittels Multiplex-Immunoassays. Die BALF wurde wie in 4.9.4 beschrieben entnommen und mittels des ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay (Affymetrix eBioscience, San Diego, USA) untersucht. Die Durchführung des Immunoassays erfolgte nach Herstellerangaben. Eine durchflusszytometrische Analyse der Proben erfolgte mit dem Bio-Plex® 200 Systems (Bio-Rad Laboratories, München) und der zugehörigen Software (Bio-Plex Manager Software Version 4.0, Bio-Rad Laboratories, München). Die Zytokinkonzentrationen wurden pro Milliliter berechnet.

4.10 Statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte unter Zuhilfenahme eines Grafik- und Statistikprogramms (GraphPad PRISM 4.0, Graph Pad Software, San Diego, USA). Die

Verlaufsdaten der Körpertemperatur in der Pneumokokkenpneumonie wurden als arithmetischer Mittelwert (*mean*) \pm Standardfehler (engl. *standard error of the mean*, SEM) angegeben. Die einzelnen Zeitpunkte wurden separat getestet und statistisch mittels eines nicht-parametrischen *two-tailed* Mann-Whitney U-Tests analysiert (Abbildung 9 A). Alle weiteren Versuchsdaten wurden als arithmetischer Mittelwert (*mean*) \pm Standardabweichung (engl. *standard deviation*, SD) angegeben. Zur statistischen Auswertung der Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde jeweils ein nicht-parametrischer *two-tailed* Mann-Whitney U-Test verwendet (Abbildung 5, 7, 8, 9 B, 10 A, 10 B, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19). Auf eine Korrektur für multiples Testen wurde verzichtet, da es sich um geplante Vergleiche handelte und ausschließlich ein direkter Vergleich zwischen der Ang-2 KO-Maus und einer nicht induzierbaren Kontrollmaus erfolgte. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde hierbei als statistisch signifikant gewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Induktion eines Angiopoietin-2-Knockout in der Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Maus

5.1.1 Identifizierung Cre-exprimierender Mäuse des Stammes Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2

Um Cre-exprimierende Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Mäuse zu identifizieren, wurden Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité Berlin Ohrbiopsien entnommen. Die DNA der Biopsien wurde isoliert und eine PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese identifiziert. Cre-exprimierende Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Mäuse konnten durch ein PCR-Produkt von 310 Basenpaaren (Bp) erfasst werden (Abbildung 1).

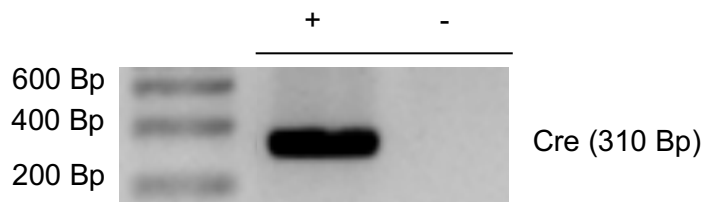


Abbildung 1: **Identifizierung Cre-exprimierender Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Mäuse:** Aus Ohrbiopsien von Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen wurde DNA isoliert und mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese auf das Vorhandensein des Cre-Gens untersucht. Ein positiver Befund zeigte sich auf einer Bandenhöhe von 310 Basenpaaren und war ein Hinweis darauf, dass bei solchen Tieren ein Angiopoietin-2-Knockout (Ang-2 KO) induziert werden konnte. Repräsentatives Gel von 14 Gelen. Abkürzungen: Bp – Basenpaare, Cre – DNA-Fragment Cre-ERT2, + – Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Maus, - – Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{-/-} Maus

5.1.2 Identifizierung induzierter Angiopoietin-2-Knockout-Mäuse

Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} und Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{-/-} Mäuse wurden 5 Tage mit Tamoxifen behandelt. Nach 5 Tagen Wartezeit wurden die Tiere auf die Entwicklung eines Ang-2 KO untersucht. Den Tieren wurde unter Inhalationsnarkose eine Ohrbiopsie entnommen. Die DNA der Ohrbiopsie wurde isoliert und eine PCR durchgeführt. Durch eine Agarose-Gelelektrophorese wurde das PCR-Produkt identifiziert. Ang-2 KO-Mäuse wiesen ein PCR-Produkt mit 230 Bp auf. WT-Mäuse wiesen ein PCR-Produkt mit 1151 Bp auf. Ein PCR-Produkt mit 585 Bp diente als interne DNA-Kontrolle (Abbildung 2).

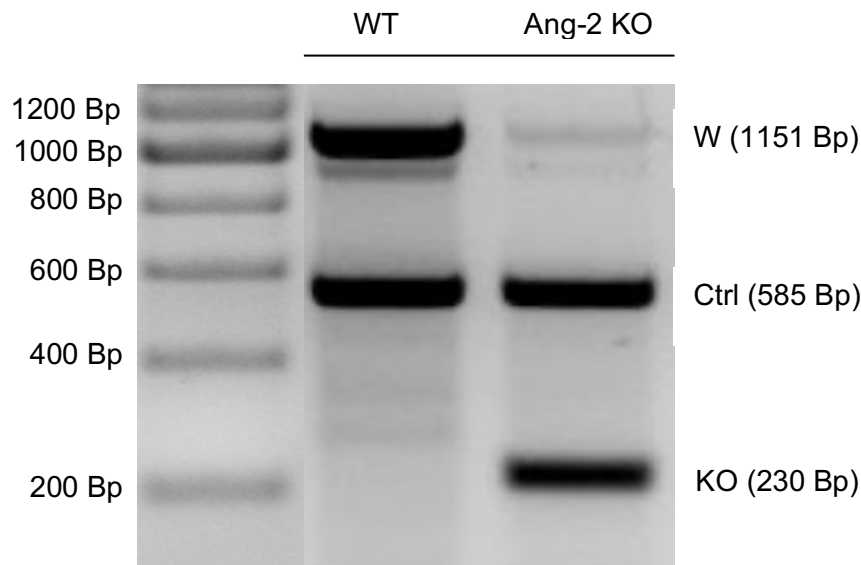


Abbildung 2: **Identifizierung von Angiopoietin-2-Knockout Mäusen:** Ang-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Mäuse und Ang-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2^{-/-} Mäuse wurden 5 Tage mit Tamoxifen behandelt. Nach 5 Tagen Wartezeit wurde eine Ohrbiopsie entnommen, die DNA isoliert, eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt und das PCR-Produkt mittels Agarose-Gelelektrophorese identifiziert. Im Falle eines Angiopoietin-2-Knockout zeigte sich ein PCR-Produkt von 230 Bp. Nicht induzierbare Kontrollmäuse wiesen ein PCR-Produkt von 1151 Bp auf. Als interne DNA-Kontrolle diente ein PCR-Produkt von 585 Bp. Repräsentatives Gel von 16 Gelen. Abkürzungen: Ang-2 KO – Angiopoietin-2-Knockout-Maus, Bp – Basenpaare, Ctrl – interne DNA Kontrolle, KO – DNA-Fragment Angiopoietin-2-Knockout-Maus, W – DNA-Fragment nicht induzierbarer Kontrollmaus, WT – nicht induzierbare Kontrollmaus

5.1.3 Angiopoietin-2-Knockout-Mäuse wiesen in der immunhistochemischen Untersuchung weniger Angiopoietin-2 im Lungengewebe auf als Kontrollmäuse

Angiopoietin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäuse wurden zur Induktion eines Ang-2 Knockouts nach Protokoll (siehe Kapitel 4.5.1) behandelt. Nach 5 Tagen Wartezeit wurde den Tieren wie in 4.9.3 beschrieben, die Lungen entnommen. Die immunhistochemische Ang-2 Färbung und die anschließende mikroskopische Analyse wurden von Frau Dr. Kristina Dietert (Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin) durchgeführt. In den Lungen der WT-Mäuse konnte mittels immunhistochemischer Färbung (Neufuchsin Färbung) eine deutliche physiologische Verteilung von Ang-2 überwiegend im Endothel nachgewiesen werden (Abbildung 3 A). Die Ang-2 KO-Mäuse hingegen wiesen einen deutlich geringeren Anteil an Ang-2 im Endothel der Lungengefäße auf, nur vereinzelt konnten positive Bereiche identifiziert werden (Abbildung 3 B).

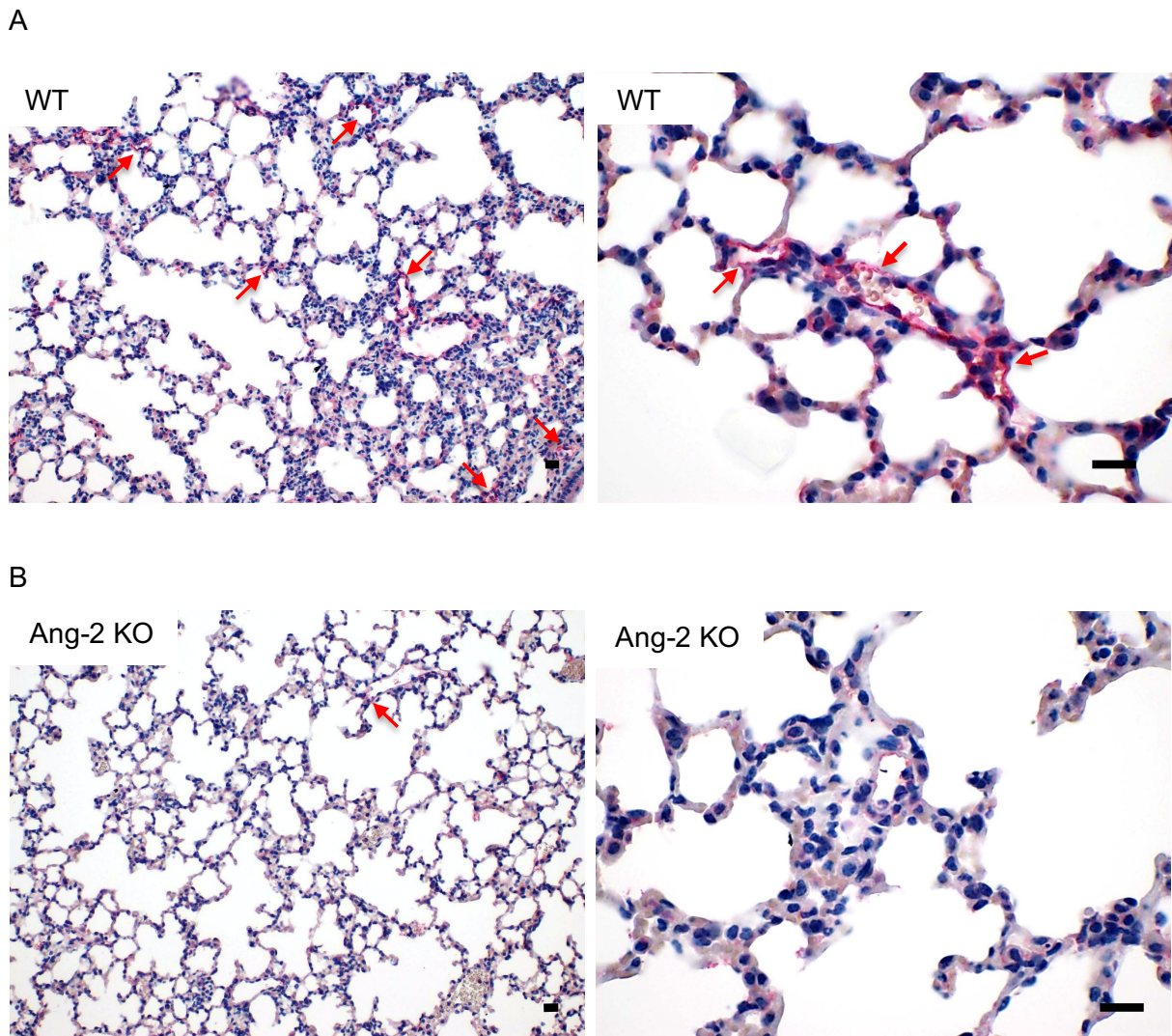


Abbildung 3 (A, B): **Immunohistochemische Färbung von Angiopoietin-2 in murinem Lungengewebe von Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen und nicht induzierbaren Kontrollmäusen:** Die Lungen von nicht induzierbaren Kontroll- und Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen wurden entnommen und pathohistologisch aufgearbeitet. Anschließend erfolgte eine immunhistochemische Färbung (Neufuchsin) von Angiopoietin-2 (rot). Die nicht spezifisch gefärbten Gewebeanteile wurden mit Hämalaun (blau) gegengefärbt. Angiopoietin-2 war überwiegend im Endothel der Lungengefäße zu finden und bei den Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen nur in wenigen vereinzelten Gefäßen exprimiert. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 μm ($n=1$ pro Gruppe).

5.1.4 Identifizierung einer Angiopoietin-2-Defizienz in primären murinen pulmonalen Endothelzellen nach *in vitro* Induktion

Die primären murinen pulmonalen Endothelzellen (mPEC) wurden von Angiopoietin-2^{loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Mäusen bzw. den nicht Cre-exprimierenden Geschwistertieren isoliert und kultiviert. Für die Induktion einer Ang-2-Defizienz wurden die mPEC mit 4-OHT behandelt. Zur

Identifizierung einer Ang-2-Defizienz wurde die DNA der Zellen isoliert und eine PCR durchgeführt. Die mPEC mit einer Ang-2-Defizienz (Ang-2 D-mPEC) wiesen ein PCR-Produkt mit 230 Bp auf. Die nicht induzierten mPEC von WT-Mäusen (WT-mPEC) wiesen ein PCR-Produkt mit 1151 Bp auf. Ein PCR-Produkt mit 585 Bp diente als interne DNA-Kontrolle (Abbildung 4).

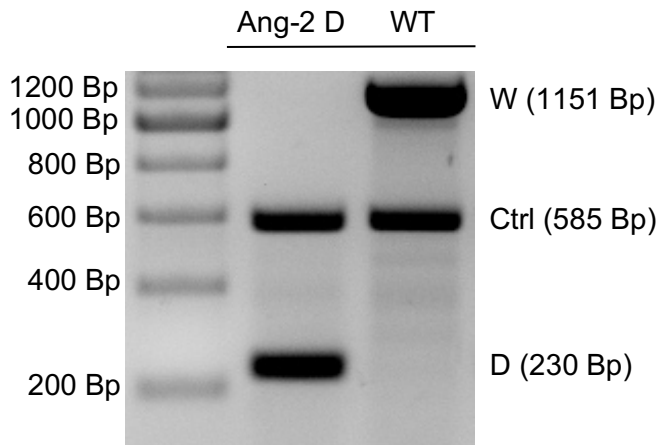


Abbildung 4: Identifizierung einer Angiopoietin-2-Defizienz von primären murinen pulmonalen Endothelzellen nach *in vitro* Induktion: Primäre murine pulmonale Endothelzellen (mPEC) von Angiopoietin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} bzw. -Cre-ERT2^{-/-} Mäusen wurden isoliert und mit 4-Hydroxytamoxifen behandelt, anschließend die DNA isoliert und eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Bei einer vorhandenen Angiopoietin-2-Defizienz zeigte sich eine Bande bei 230 Bp. Nicht induzierte mPEC wiesen ein PCR-Produkt von 1151 Bp auf. Als interne DNA-Kontrolle diente ein PCR-Produkt von 585 Bp. Abkürzungen: Ang-2 D – Angiopoietin-2-defiziente primäre murine pulmonale Endothelzellen, Bp – Basenpaare, Ctrl – interne DNA-Kontrolle, D – DNA-Fragment Angiopoietin-2-defizienter mPEC, W – DNA-Fragment nicht induzierbarer mPEC, WT – nicht induzierbare primäre murine pulmonale Endothelzellen.

5.1.5 Primäre murine pulmonale Endothelzellen wiesen nach der Induktion einer Angiopoietin-2-Defizienz eine tendenziell geringere Angiopoietin-2 Genexpression auf als nicht induzierte primäre murine pulmonale Endothelzellen

Die primären murinen pulmonalen Endothelzellen (mPEC) wurden von Angiopoietin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Mäusen bzw. den nicht Cre-exprimierenden Geschwistertieren isoliert und kultiviert. Für die Induktion einer Ang-2-Defizienz wurden die mPEC mit 4-OHT behandelt. Anschließend erfolgte wie in 4.7 beschrieben eine Aufbereitung und Analyse der Proben mittels qPCR. Hierbei wiesen die Ang-2-D-mPEC eine tendenziell geringere Ang-2 Genexpression im Vergleich zu den WT-mPEC auf (Abbildung 5).

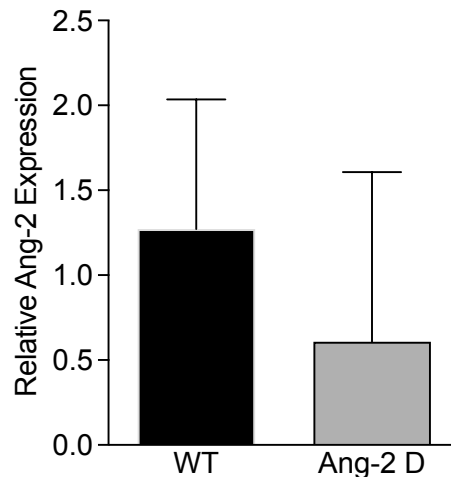


Abbildung 5: **Untersuchung der Angiotensin-2 Genexpression primärer muriner pulmonaler Endothelzellen nach *in vitro* Induktion:** Die Angiotensin-2 Genexpression *in vitro* induzierter primärer muriner pulmonaler Endothelzellen (mPEC) von Angiotensin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2^{+/-} Mäusen bzw. deren nicht Cre-exprimierenden Geschwistertieren wurde mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bestimmt. Als Referenzgen diente GAPDH. Es konnte eine tendenziell verringerte Angiotensin-2 Genexpression in den Ang-2 D-mPEC im Vergleich zu den WT-mPEC gesehen werden. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (n=6 pro Gruppe). Abkürzungen: Ang-2 – Angiotensin-2, Ang-2 D – Angiotensin-2-defiziente primäre murine pulmonale Endothelzellen, WT – nicht induzierbare primäre murine pulmonale Kontrollendothelzellen.

5.2 Kultivierte primäre murine pulmonale Endothelzellmonolayer wiesen nach der Induktion einer Angiotensin-2-Defizienz und Stimulation mit Pneumolysin einen geringeren Integritätsverlust auf als nicht induzierte primäre murine pulmonale Endothelzellmonolayer

Primäre murine pulmonale Endothelzellen (mPEC) wurden von Angiotensin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen isoliert, kultiviert und mit 4-OHT wurde eine Ang-2-Defizienz induziert. Nachdem ein konfluenter Endothelzellmonolayer gewachsen war, wurden die Zellen mit PLY (1 µg/ml) stimuliert und fixiert. Zur Beurteilung der Integrität wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Als Marker dienten das *tight junction* Protein VE-Cadherin und F-Aktin-Fasern des Zytoskeletts. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Auswertung der mPEC erfolgte mikroskopisch. In den untersuchten Monolayern wiesen die PLY stimulierten Ang-2 D-mPEC einen geringeren Integritätsverlust auf als die mPEC der WT-Mäuse. Dies zeigte sich anhand des geringeren Vorkommens von zerstörten Zellkontakten und der stärkeren Expression von VE-Cadherin (Abbildung 6 (A-D)).

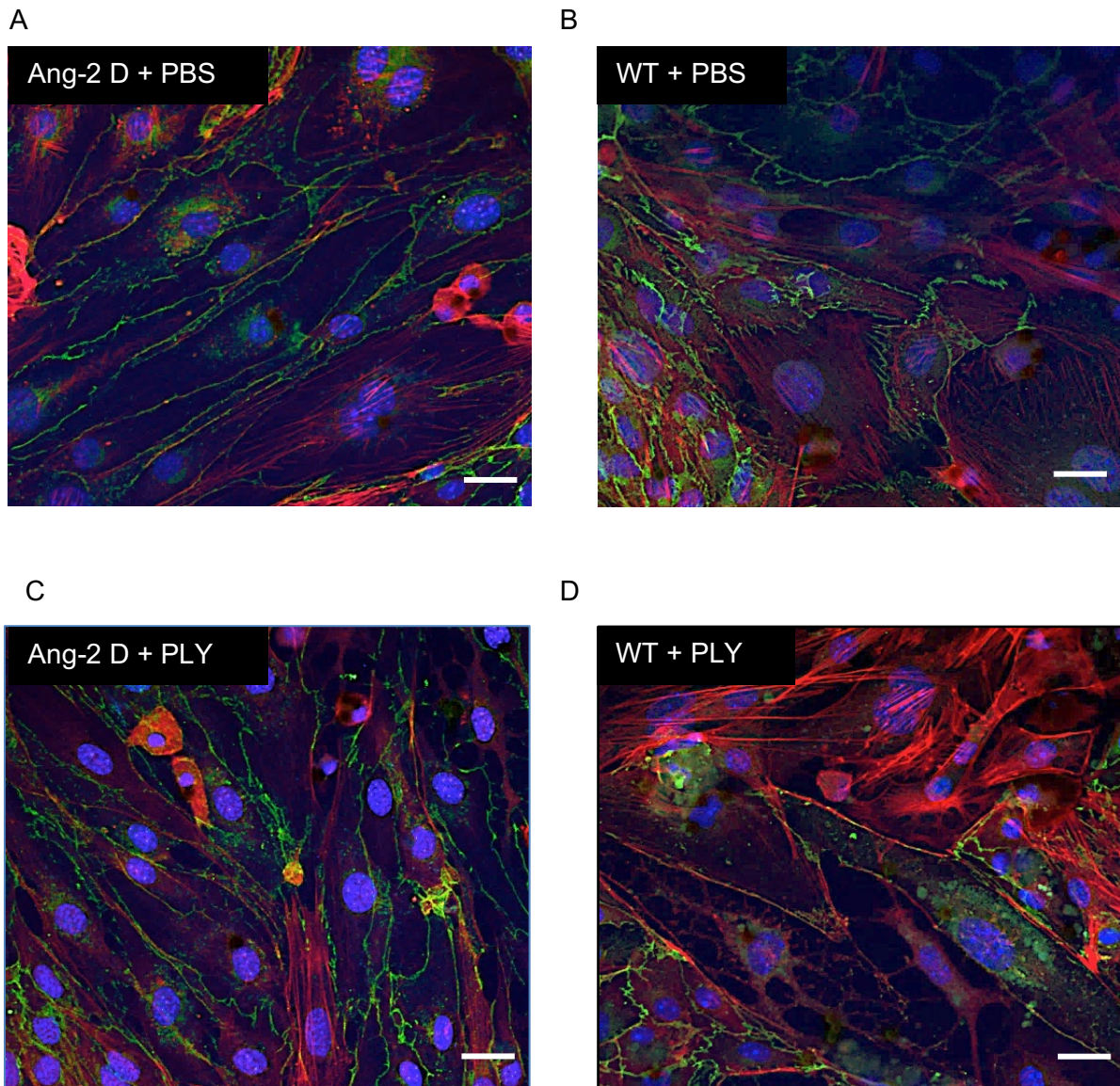


Abbildung 6 (A-D): **Immunfluoreszenzfärbung stimulierter primärer muriner pulmonaler Endothelzellmonolayer:** Primäre murine pulmonale Endothelzellen (mPEC) von Angiopoietin-2-^{loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mäusen wurden isoliert und eine Angiopoietin-2-Defizienz mittels 4-Hydroxytamoxifen induziert. Nach dem Wachstum eines konfluenten Zellmonolayers wurden die mPEC mit Pneumolysin (1 µg/ml) stimuliert, anschließend fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Eine Kontrollstimulation erfolgte mittels phosphatgepufferter Salzlösung. Als Zellmarker dienten VE-Cadherin (grün) und F-Aktin (rot). Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (blau) angefärbt. Die Pneumolysin-induzierte Schädigung des Zellmonolayers war bei den Angiopoietin-2-defizienten Endothelzellen deutlich reduziert, was an der verminderten Anzahl von zerstörten Zellkontakten und der etwas stärkeren VE-Cadherin-Expression zu sehen war. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für die jeweils gezeigte Versuchsgruppe. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 20 µm (Kontrolle: WT n = 4, Ang-2 D n = 6; *S. pneumoniae*: WT n = 4, Ang-2 D n = 6). Abkürzungen: Ang-2 D – Angiopoietin-2-defiziente primäre murine pulmonale Endothelzellen, PBS – phosphatgepufferter Salzlösung, PLY – Pneumolysin, WT – nicht induzierbare primäre murine pulmonale Kontrollendothelzellen.

5.3 Die Pneumokokkenpneumonie in der Angiopoietin-2-Knockout-Maus

Um den Verlauf einer CAP beim Menschen nachzuahmen, wurden weibliche Ang-2 KO-Mäuse und WT-Mäuse intranasal mit 1×10^7 KbE von *S. pneumoniae* pro Tier infiziert.

5.3.1 Angiopoietin-2-Knockout-Mäuse und deren nicht induzierbaren Geschwister-tiere zeigten in der Pneumokokkenpneumonie im Lungengewebe eine ähnliche Angiopoietin-2 Genexpression

Die Lungen von Ang-2 KO- und WT-Mäusen wurden 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* oder einer Scheininfektion mit PBS entnommen (siehe 4.9.4). Anschließend erfolgte wie in 4.7 beschrieben eine Aufbereitung und Analyse der Proben mittels qPCR. Ein Unterschied bezüglich der Genexpression war innerhalb der Gruppe der mit *S. pneumoniae* infizierten Mäuse und der scheininfizierten Mäuse als auch zwischen den Ang-2 KO- und WT-Mäusen nicht erkennbar (Abbildung 7).

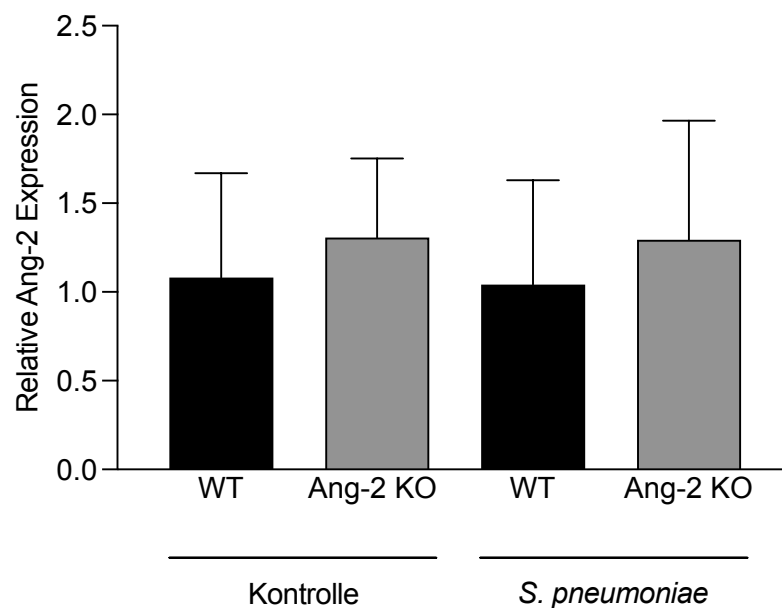


Abbildung 7: **Untersuchung der Angiopoietin-2 Genexpression von Angiopoietin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie:** Die Genexpression von Angiopoietin-2 im Lungengewebe von Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen (Ang-2 KO) und nicht induzierbaren Kontrollmäusen (WT) wurde 48 h nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* oder einer Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion bestimmt. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Ang-2 KO- und den WT-Tieren festgestellt werden. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (Kontrolle: WT n = 6, Ang-2 KO n = 7; *S. pneumoniae*: WT n = 6, Ang-2 KO n = 5). Abkürzungen: Ang-2 – Angiopoietin-2, Kontrolle – Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung, *S. pneumoniae* – Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*.

5.3.2 Die Angiotensin-2-Knockout-Maus zeigte im Gegensatz zur Kontrolle keinen Anstieg der Angiotensin-2-Plasmakonzentration in der Pneumokokkenpneumonie

Ang-2 KO- und WT-Mäusen wurde 48 h nach Infektion Blut entnommen und die Angiotensin-2-Plasmakonzentration mittels ELISA bestimmt. Die WT-Mäuse wiesen 48 h nach einer Infektion mit *S. pneumoniae*, im Vergleich zu den mit PBS scheininfizierten WT-Mäusen, einen signifikanten Anstieg der Angiotensin-2-Plasmakonzentration auf. Dieser Konzentrationsanstieg konnte bei den Ang-2 KO-Tieren nicht beobachtet werden. Innerhalb der *S. pneumoniae* Infektionsgruppen war eine signifikante Differenz der Ang-2-Plasmakonzentration zwischen der Ang-2 KO-Mäusen und den WT-Mäusen erkennbar (Abbildung 8).

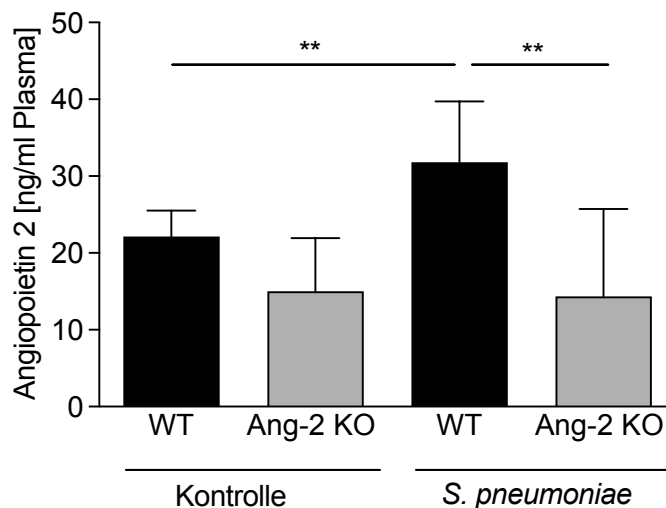


Abbildung 8: Die Angiotensin-2-Plasmakonzentration in der Pneumokokkenpneumonie bei Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen:

Die Angiotensin-2-Plasmakonzentration von Angiotensin-2-Knockout-Mäusen (Ang-2 KO) und nicht induzierbaren Kontrollmäusen (WT) wurde 48 h nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* oder einer Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mittels ELISA bestimmt. Im Gegensatz zu den WT-Tieren, kam es bei den Ang-2 KO-Tieren durch die Infektion nicht zu einem Angiotensin-2 Anstieg im Plasma. Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (** $p < 0,01$; Kontrolle $n = 6$ pro Gruppe; *S. pneumoniae* $n = 11$ pro Gruppe). Abkürzungen: Kontrolle – Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung, *S. pneumoniae* – Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*.

5.3.3 In der Pneumokokkenpneumonie zeigten Angiotensin-2-Knockout-Mäuse eine ähnliche Entwicklung im Verlauf der Körpertemperatur und des Körpergewichtes wie Kontrollmäuse

Die Körpertemperatur und das Körpergewicht wurden 24 h, 36 h und 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* bzw. Scheininfektion durch PBS bestimmt (Abbildung 9 A). Für die Ermittlung

der prozentualen Abweichung des Körpergewichts durch die Infektion, wurde das Ausgangsgewicht der Tiere vor der Infektion und 48 h nach der intranasalen Inokulation verwendet (Abbildung 9 B). Sowohl in der Entwicklung der Körpertemperatur als auch beim Körpergewichtsverlust war kein Unterschied zwischen den Ang-2 KO-Mäusen und den WT-Mäusen erkennbar.

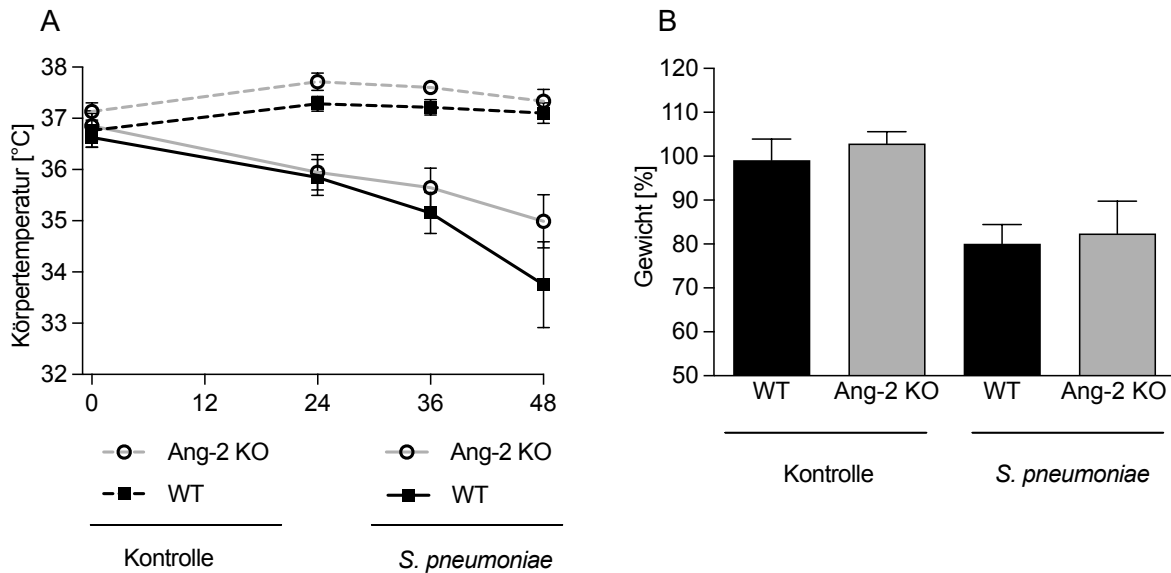


Abbildung 9 (A, B): Körpertemperatur und Körpergewicht im Verlauf einer Pneumokokkenpneumonie:

(A) Eine Messung der Körpertemperatur erfolgte 24 h, 36 h und 48 h nach Infektion. (B) Für die prozentuale Abweichung des Körpergewichts wurden die Messwerte vor und 48 h nach der intranasalen Inokulation mit *Streptococcus pneumoniae* oder einer Scheininfection verwendet. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Angiotensin-2-Knockout-Mäusen und den nicht induzierbaren Kontrollmäusen festgestellt werden. (A) Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (Kontrolle $n = 6$ pro Gruppe, *S. pneumoniae* $n = 11$ pro Gruppe). (B) Die Daten sind als Mittelwert + SD angegeben (Kontrolle $n = 6$ pro Gruppe, *S. pneumoniae* $n = 11$ pro Gruppe). Abkürzungen: Ang-2 KO – Angiotensin-2-Knockout-Maus, Kontrolle – Scheininfection mit phosphatgepufferter Salzlösung, *S. pneumoniae* – Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*, WT – nicht induzierbare Kontrollmaus.

5.3.4 In der Pneumokokkenpneumonie hatten Angiotensin-2-Knockout-Mäuse sowohl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit als auch im Blut eine vergleichbare Bakterienlast wie Kontrollmäuse

Die BALF und das Blut von Ang-2 KO- und WT-Mäusen wurden 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* gewonnen, in einer Verdünnungsreihe auf Schafblutagarplatten ausplattiert, ca. 18 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂) und die Bakterienlast anschließend ausgewertet. In der Bakterienlast der BALF sowie im Blut war, unter den an einer Pneumokokkenpneumonie erkrankten Gruppen, kein signifikanter Unterschied zu beobachten (Abbildung 10).

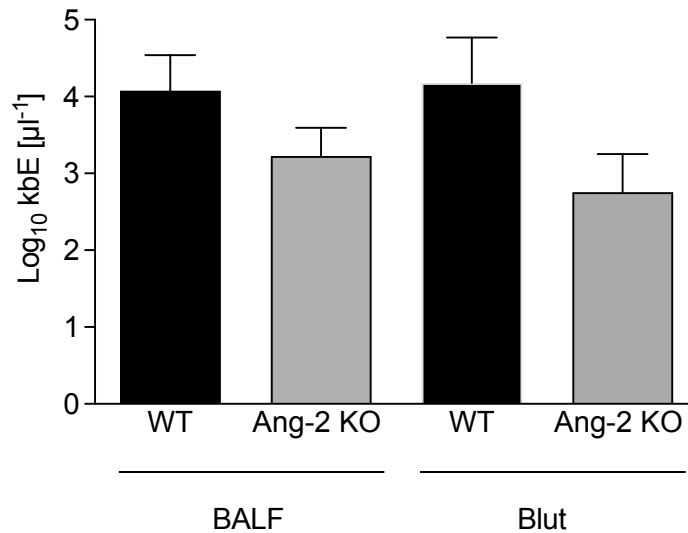


Abbildung 10: **Bakterienlast in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und im Blut:** Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und Blut wurden 48 h nach intranasaler Inokulation von 1×10^7 kbE *Streptococcus pneumoniae* gewonnen und nach 24 h Inkubation auf einer Schafblutagarplatte ausgewertet. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen und Kontrollmäusen beobachtet werden. Die Daten sind als Mittelwert angegeben + SD (n = 11 pro Gruppe). Abkürzungen: Ang-2 KO – Angiopoietin-2-Knockout-Maus, BALF – bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, KbE – koloniebildende Einheit, WT – nicht induzierbare Kontrollmaus.

5.3.5 In der Pneumokokkenpneumonie wies das Differentialblutbild von Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen keinen Unterschied auf

Das Blut von Ang-2 KO- und WT-Mäusen wurde 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* oder der Scheininfektion mit PBS gewonnen und analysiert. Das Differentialblutbild der Ang-2 KO-Mäuse zeigte sowohl in der Scheininfektion als auch in der Pneumokokkeninfektion keine Differenzen zu dem Differentialblutbild der WT-Mäuse. Zwischen den Gruppen der mit *S. pneumoniae* und PBS infizierten Tieren zeigte sich eine Abnahme der Leukozytenzahl (Abbildung 11).

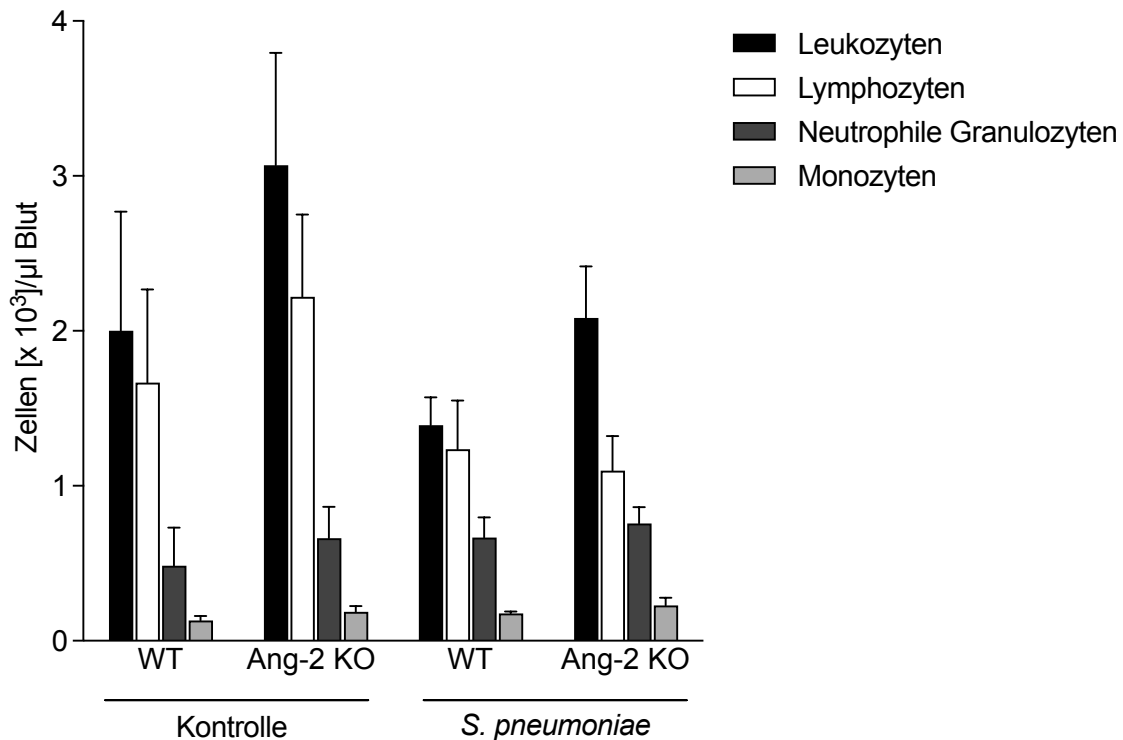


Abbildung 11: **Differentialblutbild in der Pneumokokkenpneumonie bei Angiopoietin-2-Knockout- und Kontrollmäusen:** Aus dem Blut von Angiopoietin-2-Knockout- (Ang-2 KO) und Kontrollmäusen (WT) wurde 48 h nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) oder einer Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) ein Differentialblutbild angefertigt. Es wurde kein Unterschied zwischen den Ang-2 KO-Mäusen und den WT-Mäusen gemessen, lediglich die Gesamtleukozytenzahl war bei allen mit *S. pneumoniae* infizierten Tieren, im Vergleich zu den mit PBS scheininfizierten Gruppen, erniedrigt. Die Daten sind als Mittelwert angegeben + SD (Kontrolle n = 6 pro Gruppe, *S. pneumoniae* n = 11 pro Gruppe). Abkürzungen: Kontrolle – Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung, *S. pneumoniae* – Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*.

5.3.6 Das Leukozytendifferentialbild in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* ähnelte dem von Kontrollmäusen

Die BALF von Ang-2 KO- und WT-Mäusen wurde 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* oder nach Kontrollinfektion mit PBS gewonnen und eine durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten durchgeführt. Es gab 48 h *p.i.* zwischen den Ang-2 KO- und WT-Mäusen keine signifikanten Differenzen im Leukozytendifferentialbild der BALF, weder bei den mit *S. pneumoniae* infizierten Tieren noch bei den scheininfizierten Kontrollgruppen. Insgesamt ließ sich feststellen, dass generell die Gesamtleukozytenzahl von mit *S. pneumoniae* infizierten Mäusen im Vergleich zu den scheininfizierten Kontrollgruppen anstieg (Abbildung 12).

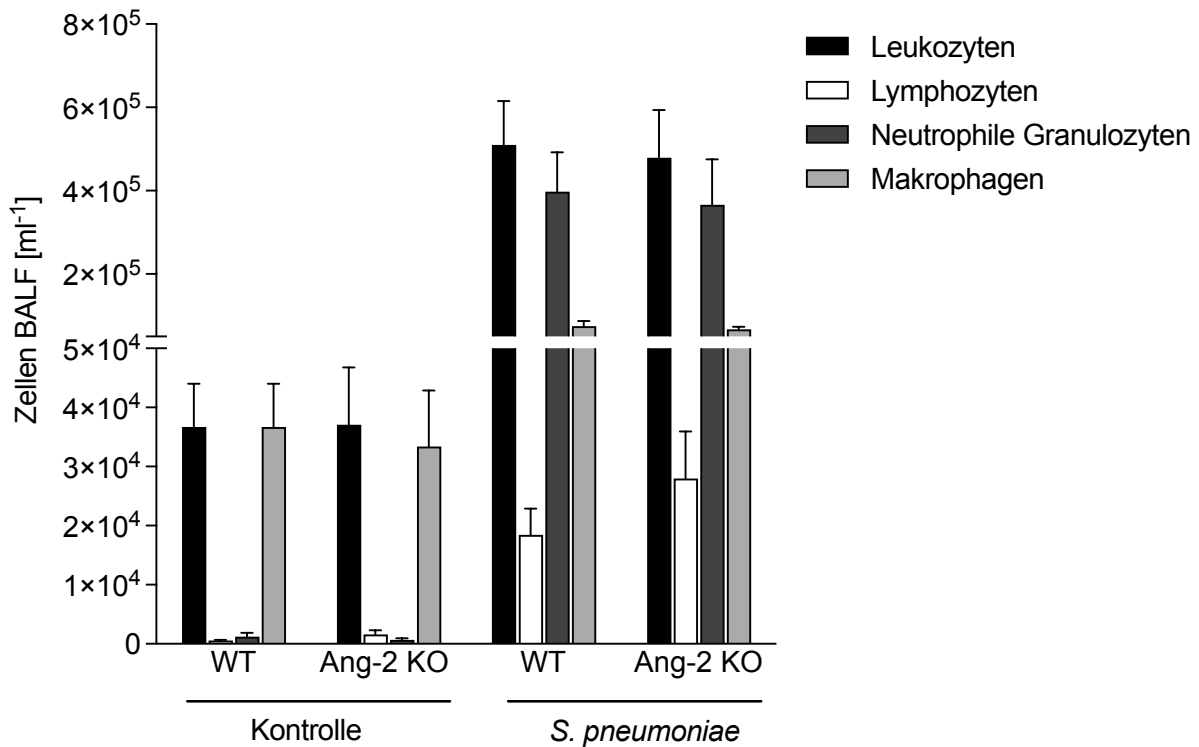


Abbildung 12: **Leukozytendifferentialbild der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie:** Aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Angiotensin-2-Knockout- (Ang-2 KO) und Kontrollmäusen (WT) wurde 48 h nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* oder phosphatgepufferter Salzlösung eine durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten durchgeführt. Es zeigte sich ein Anstieg der Zellpopulationen durch die Pneumokokkeninfektion, jedoch konnten zwischen den Ang-2 KO-Tieren und den WT-Mäusen keine Unterschiede gemessen werden. Die Daten sind als Mittelwert angegeben + SD (Kontrolle n = 6 pro Gruppe, *S. pneumoniae* n = 11 pro Gruppe). Abkürzungen: BALF – bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, Kontrolle – Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung, *S. pneumoniae* – Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*.

5.3.7 In der Pneumokokkenpneumonie war in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Angiotensin-2-Knockout-Mäusen und Kontrollmäusen eine ähnliche Konzentration von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen erkennbar

Die Zytokin- und Chemokinanalyse der BALF von Ang-2 KO- und WT-Mäusen erfolgte mittels einer Multiassay-Analyse 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* oder einer Scheininfektion mit PBS. Die Konzentrationen von CXCL-1, IL-6, IL-12p40, IL-10, CXCL-2 und TNF- α wurden bestimmt. Bei allen Zytokinen und Chemokinen war ein signifikanter Anstieg zwischen der Gruppe der *S. pneumoniae* Infizierten und der Kontrollgruppe zu erkennen. Ein Unterschied in der Zytokin- und Chemokinausschüttung zwischen den Ang-2 KO- und den WT-Mäusen war jedoch nicht vorhanden (Abbildung 13).

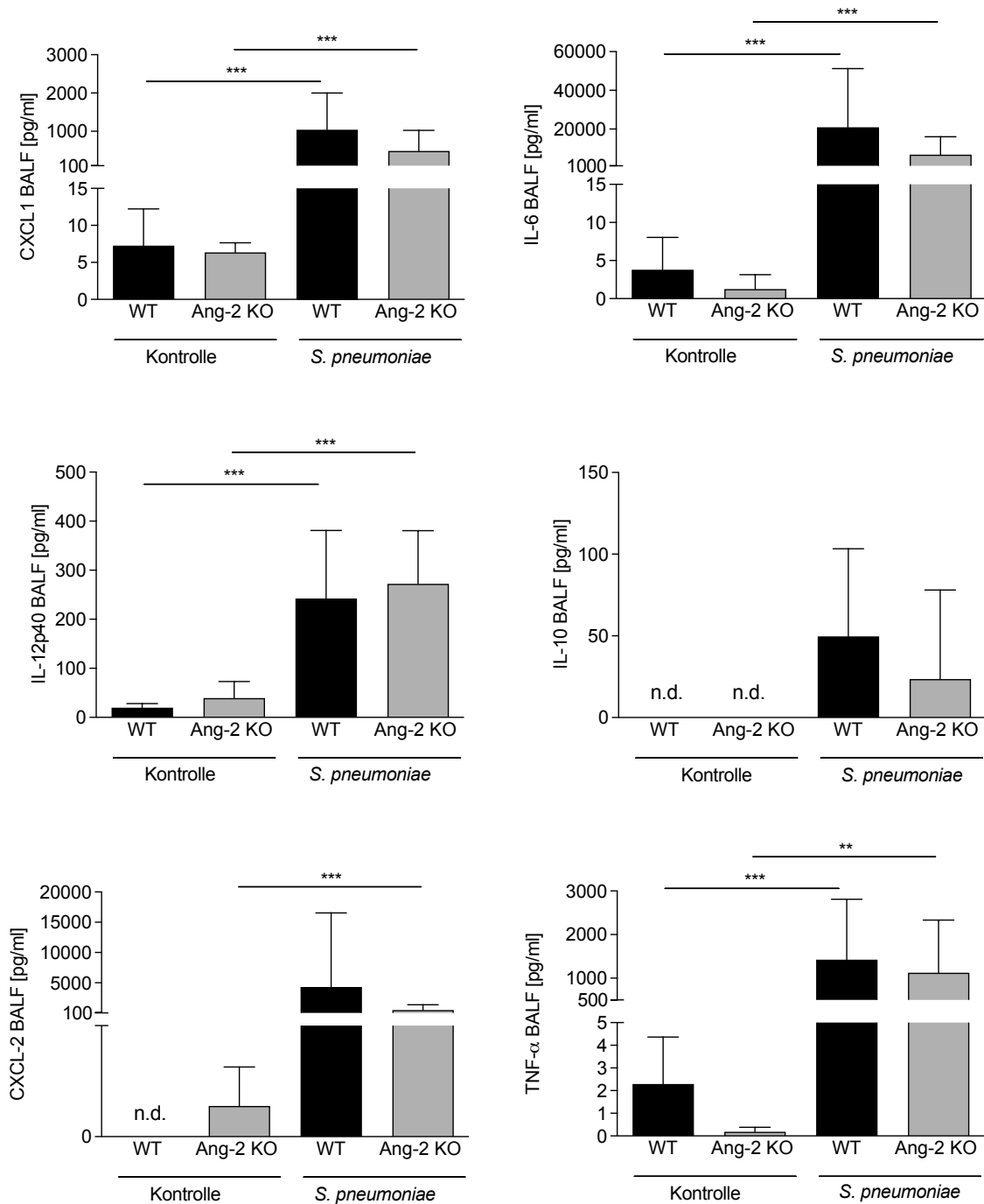


Abbildung 13: **Konzentrationen pro- und antiinflammatorischer Zytokine und Chemokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie:** Aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Angiotensin-2-Knockout-Mäusen (Ang-2 KO) und nicht induzierbaren Kontrollmäusen (WT) wurde 48 h nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) oder einer Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) eine Multiassay Analyse durchgeführt. Bei keinem der Zytokine konnte ein Unterschied zwischen den Ang-2 KO- und den WT-Mäusen festgestellt werden. Die Daten sind als Mittelwert angegeben + SD (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; Kontrolle $n = 6$ pro Gruppe, *S. pneumoniae* $n = 11$ pro Gruppe). Abkürzungen: BALF – Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, Kontrolle – Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung, n.d. – nicht detektierbar.

5.3.8 Die Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand-1-Plasmakonzentration war in der Pneumokokkenpneumonie bei der Angiotensin-2-Knockout-Maus im Vergleich zur Kontrollmaus reduziert

Ang-2 KO- und WT-Mäusen wurde 48 h nach Infektion Blut entnommen und die CXCL-1-Plasmakonzentration mittels ELISA bestimmt. Sowohl Ang-2 KO- als auch WT-Mäuse, die mit *S. pneumoniae* infiziert waren, zeigten im Vergleich zur scheininfizierten Kontrollgruppe einen signifikanten Anstieg der CXCL-1-Plasmakonzentration. Zudem war eine signifikante Differenz zwischen Ang-2 KO- und WT-Mäusen innerhalb der mit *S. pneumoniae* infizierten Gruppen erkennbar (Abbildung 14).

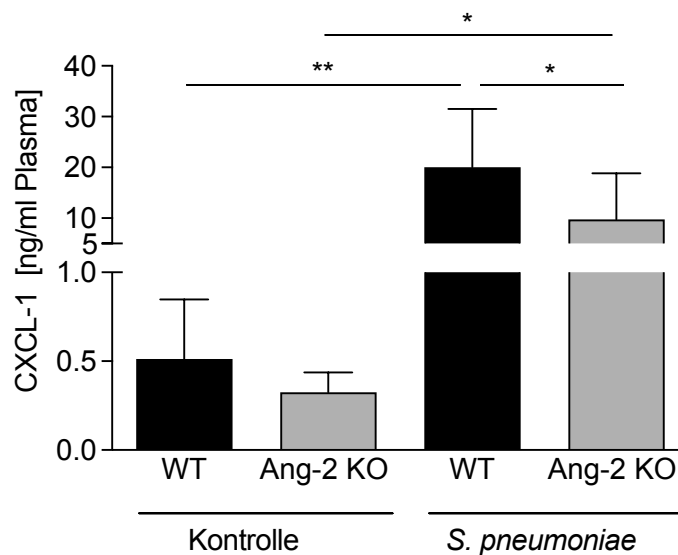


Abbildung 14: Die Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand-1-Plasmakonzentration in der Pneumokokkenpneumonie bei Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen: Die Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand-1 (CXCL-1)-Plasmakonzentration von Angiotensin-2-Knockout-Mäusen (Ang-2 KO) und Kontrollmäusen (WT) wurde 48 h nach intranasaler Inokulation mit *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) oder phosphatgepufferter Salzlösung mittels ELISA bestimmt. Mit *S. pneumoniae* infizierte Ang-2 KO-Mäuse hatten im Vergleich zu den WT-Tieren eine signifikant geringere CXCL-1 Plasmakonzentration (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Kontrolle $n = 6$ pro Gruppe, *S. pneumoniae* $n = 11$ pro Gruppe). Die Daten sind als Mittelwert angegeben + SD. Abkürzungen: Kontrolle – Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung, *S. pneumoniae* – Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*.

5.3.9 Die Interleukin-6-Plasmakonzentration war in der Pneumokokkenpneumonie bei Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen vergleichbar

Ang-2 KO- und WT-Mäusen wurde 48 h nach Infektion Blut entnommen und die IL-6-Plasmakonzentration mittels ELISA bestimmt. In der Kontrollgruppe war sowohl bei den Ang-2 KO-

Mäusen als auch bei den WT-Mäusen IL-6 nicht detektierbar. Jedoch war ein deutlicher Anstieg in den mit *S. pneumoniae* infizierten Gruppen erkennbar. Ein signifikanter Unterschied zwischen Ang-2 KO- und WT-Mäusen war jedoch nicht vorhanden (Abbildung 15).

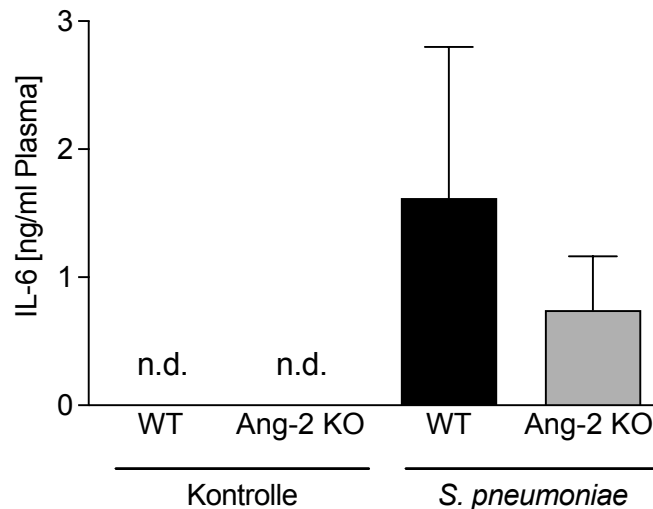


Abbildung 15: **Die Interleukin-6-Plasmakonzentration in der Pneumokokkenpneumonie bei Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen:** Die Interleukin-6-Plasmakonzentration von Angiotensin-2-Knockout-Mäusen (Ang-2 KO) und Kontrollmäusen (WT) wurde 48 h nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* oder einer Scheininfektion mit einer phosphatgepufferten Salzlösung mittels ELISA bestimmt. Zwischen den Ang-2 KO- und WT-Tieren konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Daten sind als Mittelwert angegeben + SD (Kontrolle n = 6 pro Gruppe, *S. pneumoniae* n = 11 pro Gruppe). Abkürzungen: IL-6 Plasma – Interleukin-6-Plasmakonzentration, Kontrolle – Scheininfektion mit phosphatgepuffertes Salzlösung, n.d. – nicht detektierbar, *S. pneumoniae* – Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*.

5.3.10 In der Pneumokokkenpneumonie war bei Angiotensin-2-Knockout-Mäusen und deren nicht induzierbaren Geschwistertieren kein Unterschied bezüglich der Permeabilität der alveolokapillären Barriere erkennbar

Ang-2 KO- und WT-Mäusen wurde 47 h *p.i.* HSA in die Schwanzvene injiziert und 48 h *p.i.* die HSA-Konzentration in der BALF und im Blutplasma mittels ELISA gemessen. Durch die Bildung eines Quotienten aus der gemessenen BALF- und Plasma-HSA-Konzentration konnte ein Rückschluss auf die Permeabilität der alveolokapillären Barriere gezogen werden. Sowohl bei den Ang-2 KO- als auch bei den WT-Mäusen war ein signifikanter Anstieg der Permeabilität der alveolokapillären Barriere in der Pneumokokkenpneumonie im Vergleich zur Kontrollinfektion mit PBS zu sehen. Zwischen den Ang-2 KO- und WT-Mäusen konnte allerdings kein signifikanter Unterschied in der pulmonalen Permeabilität festgestellt werden (Abbildung 16).

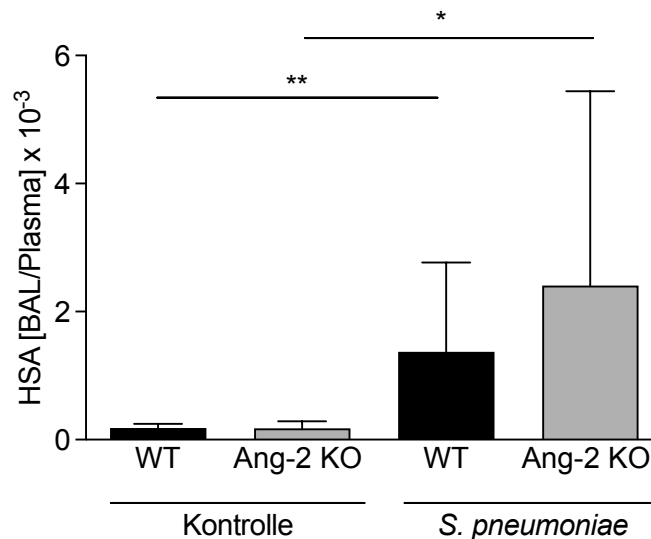


Abbildung 16: **Permeabilität der alveolokapillären Barriere in der Pneumokokkenpneumonie bei Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen:** Angiotensin-2-Knockout-Mäusen (Ang-2 KO) und Kontrollmäusen (WT) wurde 47 h nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* oder einer Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung humanes Serumalbumin (HSA) in die Schwanzvene injiziert. Die HSA-Konzentration in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) und Blut von Ang-2 KO- und WT-Mäusen wurde 48 h *p.i.* mittels ELISA bestimmt. Durch Bildung eines Quotienten aus den HSA-Konzentrationen von BALF und Plasma wurde die Permeabilität der alveolokapillären Barriere beurteilt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Ang-2 KO- und WT-Tieren ermittelt werden (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Kontrolle $n = 6$ pro Gruppe, *S. pneumoniae* $n = 11$ pro Gruppe). Die Daten sind als Mittelwert angegeben + SD. Abkürzungen: Kontrolle – Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung, *S. pneumoniae* – Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*.

5.4 Histopathologische Untersuchung der Angiotensin-2-Knockout-Maus in der Pneumokokkenpneumonie

5.4.1 Die Angiotensin-2-Knockout-Maus zeigte in der Pneumokokkenpneumonie im Gegensatz zur Kontrollmaus keinen Anstieg der Angiotensin-2-Plasmakonzentration

Zur Histopathologischen Untersuchung der Lungen von Ang-2 KO- und WT-Mäusen wurden separate Infektionsversuche durchgeführt.

Ang-2 KO- und WT-Mäuse wurden *intranasal* mit *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) inokuliert. Innerhalb von 48 h entwickelten die Tiere eine schwere Pneumokokkenpneumonie. Zum Analysezeitpunkt von 48 h *p.i.* wurden die Tiere narkotisiert und die Lungen sowie Blut entnommen (Siehe 4.9.3). Auch hier erfolgte, zur Überprüfung des Phänotyps, eine Bestimmung der Angiotensin-2-Plasmakonzentration mittels ELISA. Hier zeigte sich bei den WT-Mäusen ein Anstieg der Ang-2-Plasmakonzentration in der Pneumokokkenpneumonie. Die Angiotensin-2-Plasmakonzentration bei den Ang-2 KO-Mäusen veränderte sich nicht durch

die Pneumokokkeninfektion und war bei mit *S. pneumoniae* infizierten Ang-2 KO-Mäusen tendenziell niedriger als bei den WT-Tieren (Abbildung 17).

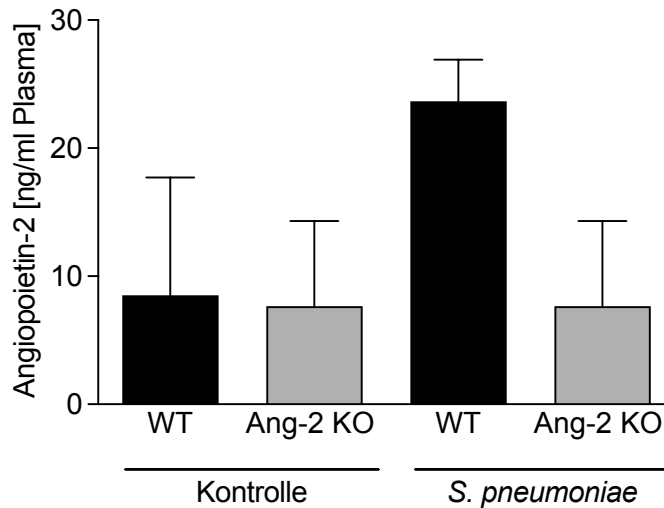


Abbildung 17: **Die Angiotensin-2-Plasmakonzentration von Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie:** Die Angiotensin-2-Plasmakonzentration wurde 48 h nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* oder einer Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung mittels ELISA bestimmt. Bei den Kontrollmäusen stieg die Angiotensin-2-Plasmakonzentration durch die Infektion an, wohingegen sich die Konzentration der Angiotensin-2-Knockout Tiere nicht veränderte. Die Daten sind als Mittelwert angegeben + SD (Kontrolle: WT n = 3 pro Gruppe, Ang-2 KO n = 3 pro Gruppe; *S. pneumoniae*: WT n = 3 pro Gruppe, Ang-2 KO n = 4 pro Gruppe). Abkürzungen: Ang-2 KO – Angiotensin-2-Knockout-Maus, Kontrolle – Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung, *S. pneumoniae* – Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*, WT – nicht induzierbare Kontrollmaus.

5.4.2 In der histopathologischen Untersuchung wies die Angiotensin-2-Knockout-Maus in der Pneumokokkenpneumonie im Vergleich zur Kontrollmaus eine geringere Angiotensin-2 Expression im Lungengewebe auf

Die Lungen wurden zur weiteren Verarbeitung in das Institut für Tierpathologie der FU Berlin versandt. Dort wurden die Lungen durch Dr. Kristina Dietert nach Standardprotokoll aufgearbeitet, immunhistochemisch angefärbt und semiquantitativ ausgewertet.

In der Gruppe der scheininfizierten Tiere wiesen die WT-Mäuse eine ausgeprägtere Ang-2 Expression im Endothel auf als die Ang-2 KO-Tiere. In den infizierten Lungen zeigten alle Tiere der WT-Gruppe vereinzelte Nachweise einer Ang-2 Expression im Endothel. In der Gruppe der Ang-2 KO-Mäuse wies nur ein Tier eine vereinzelte, endotheliale Angiotensin-2-Expression auf (Abbildung 18 (A-D), 19).

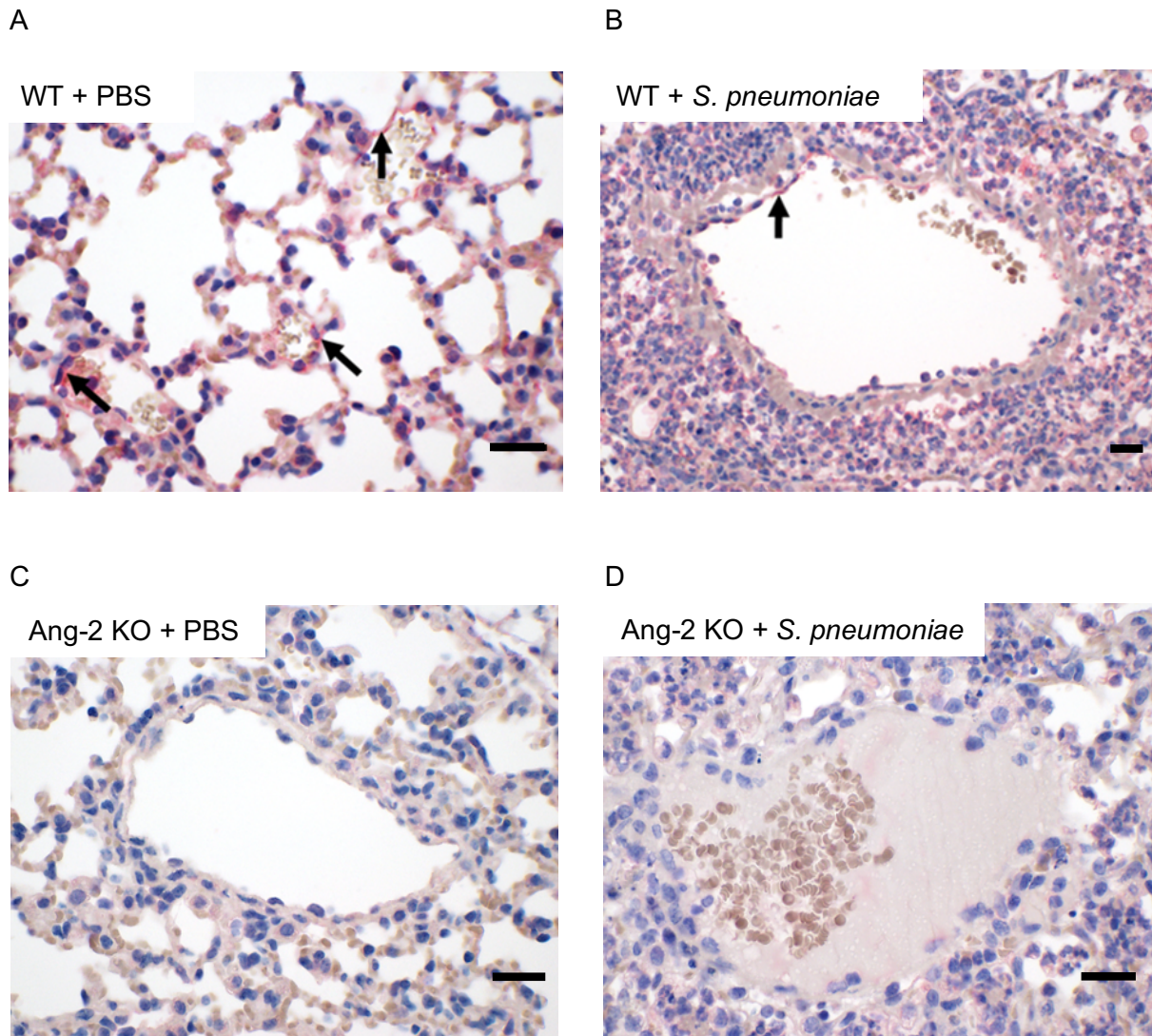


Abbildung 18 (A-D): **Immunhistochemische Untersuchung der Angiotensin-2 Expression in den Lungen von Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie:** Die Lungen wurde 48 h nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* oder einer Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung entnommen und pathohistologisch aufgearbeitet. Anschließend erfolgte eine immunhistochemische Färbung (Neufuchsin) von Angiotensin-2 (rot). Weitere Gewebeanteile wurden mit Hämalaun (blau) unspezifisch gegengefärbt. Die Lungen der Kontrollmäuse zeigen im Vergleich zu den Angiotensin-2-Knockout-Mäusen eine ausgeprägtere Expression von Angiotensin-2 (Pfeile). Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für die jeweils gezeigte Versuchsgruppe. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 20 µm (Kontrolle: WT n = 3, Ang-2 KO n = 3; *S. pneumoniae*: n = 4 pro Gruppe). Abkürzungen: Ang-2 KO – Angiotensin-2-Knockout-Maus, PBS – phosphatgepufferter Salzlösung, *S. pneumoniae* – *Streptococcus pneumoniae*, WT – nicht induzierbare Kontrollmaus.

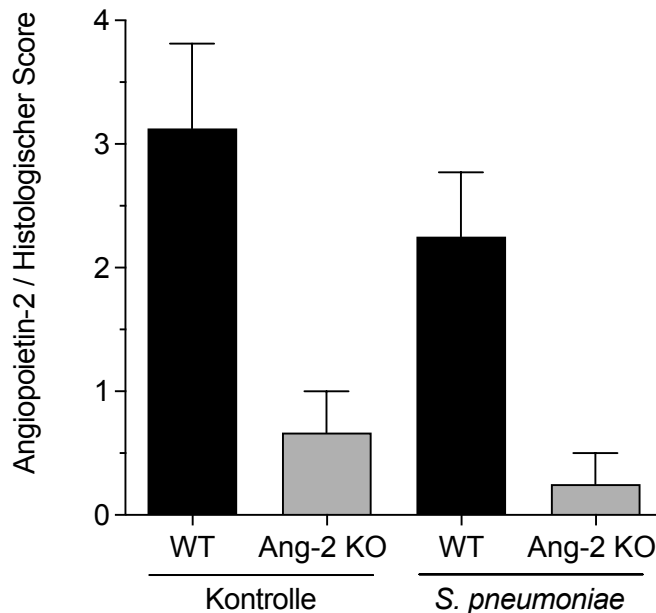


Abbildung 19: **Semiquantitative Auswertung der endothelialen Angiotensin-2 Expression in mittleren und kleinen Lungengefäßen von Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie:** Die Lungen wurden 48 h nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* oder einer Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung entnommen, pathohistologisch aufgearbeitet und semiquantitativ ausgewertet. In den Lungen der Angiotensin-2-Knockout-Mäuse zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine geringere Expression von Angiotensin-2. Die Daten sind als Mittelwert angegeben + SD (Kontrolle: WT n = 3, Ang-2 KO n = 3; *S. pneumoniae*: n = 4 pro Gruppe). Abkürzungen: Ang-2 KO – Angiotensin-2-Knockout-Maus, Kontrolle – Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung, *S. pneumoniae* – Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*, WT – nicht induzierbare Kontrollmaus.

5.4.3 In der histopathologischen Untersuchung wiesen Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäuse nach einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* eine ähnliche Entzündungsreaktion und Bakterienlast auf

In der histopathologischen Untersuchung der Lunge war weder ein qualitativer noch ein quantitativer Unterschied in der Entzündungsreaktion zwischen den infizierten WT- und den Ang-2 KO-Mäusen erkennbar (Abbildung 20). Jedoch war das Ausmaß der Läsionen in der Gruppe der infizierten Ang-2 KO-Tiere sehr variabel. Tendenziell zeigten die infizierten Ang-2 KO-Tiere eine deutlich schwächere bakteriell bedingte Pleuritis und Steatitis. Beiden infizierten Gruppen gleich war eine auffallend stark ausgeprägte Vaskulitis. Die Lungen der Kontrollgruppen zeigten eine ungewöhnlich starke Entzündungsreaktion auf die intranasale Applikation von Flüssigkeit.

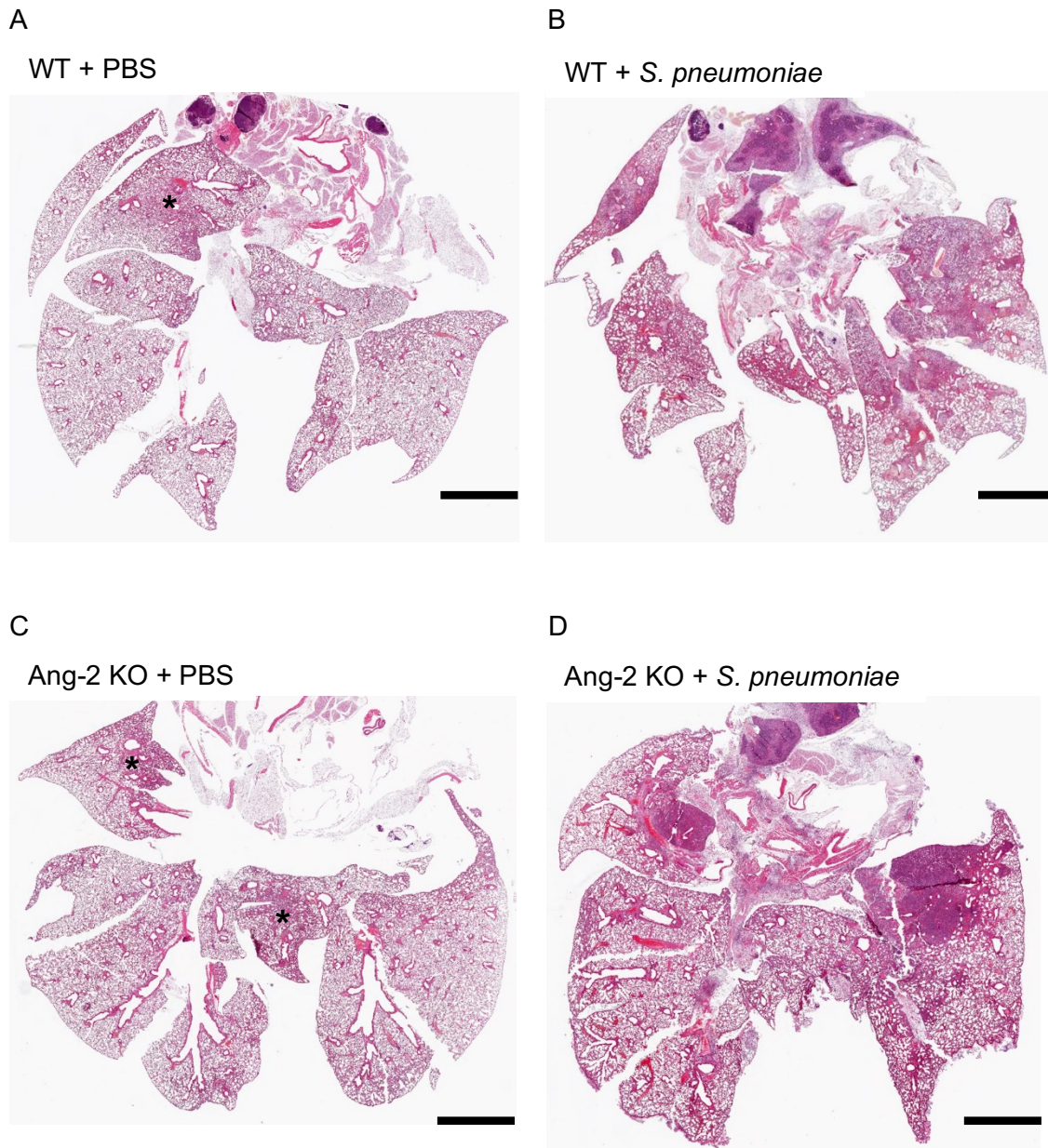


Abbildung 20 (A-D): Histopathologische Untersuchung der Lungen von Angiopoietin-2-Knockout- und Kontrollmäusen in der Pneumokokkenpneumonie: Die Lungen wurden 48 h nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* bzw. Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung entnommen, in Formalin fixiert und immunhistochemisch mittels Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Bezüglich der Entzündungsreaktion war kein Unterschied zwischen den infizierten Lungen der Angiopoietin-2-Knockout- (Ang-2 KO) und nicht induzierbaren Kontrollmäusen (WT) erkennbar. Die Lungen der scheininfizierten Tiere beider Gruppen zeigten, wie anhand einer erhöhten Leukozyteneinwanderung (Sternchen) erkennbar, eine auffällig starke Entzündungsreaktion auf die intranasale PBS Applikation. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für die jeweils gezeigte Versuchsgruppe. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 2 mm (Kontrolle: WT n = 3, Ang-2 KO n = 3; *S. pneumoniae*: n = 4 pro Gruppe).

Die immunhistochemische Untersuchung der Lungen zeigte in beiden Gruppen eine ähnliche Bakterienlast (Abbildung 21 (A,B)). Die semiquantitativen Auswertungen, die durch Dr. Kristina Dietert durchgeführten immunhistochemischen und histopathologischen Untersuchungen, sind im Anhang (10.2) zu finden.

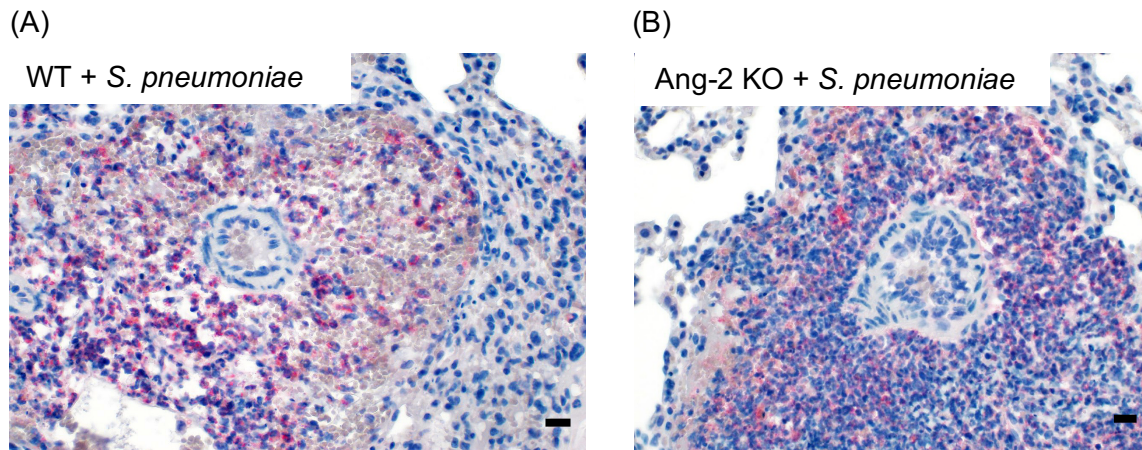


Abbildung 21 (A,B): Immunhistochemischer Nachweis von *Streptococcus pneumoniae* in der Lunge von Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen und Kontrollmäusen: 48 h nach einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* wurden die Lungen der Angiopoietin-2-Knockout-(Ang-2 KO) und Kontrollmäuse (WT) entnommen und histopathologisch aufgearbeitet. Anschließend erfolgte eine immunhistochemische Färbung (Chromogen Neufuchsin) von *Streptococcus pneumoniae* (rot). Weitere Gewebeanteile wurden mit Hämalaun unspezifisch gefärbt. Bezüglich der Bakterienlast war kein Unterschied zwischen der Gruppe der WT und der Gruppe der Ang-2 KO erkennbar. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für die jeweils gezeigte Versuchsgruppe. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 20 µm (n=4 pro Gruppe). Abkürzungen: *S. pneumoniae* – Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*.

6 Diskussion

6.1 Der Angiotensin-2-Knockout auf DNA-, RNA- und Proteinexpressionsebene

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Rolle des körpereigenen Proteins Ang-2 in der Pneumokokkenpneumonie untersucht. Hierbei wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit einem konditionell induzierbaren Ang-2 KO-Mausmodell gearbeitet. Mittels einer PCR-Analyse wurden die gezüchteten Mäuse auf die genetische Voraussetzung zur Expression der in diesem Mausmodell für eine erfolgreiche Induktion bedeutenden Cre-Rekombinase untersucht. Anhand der Ergebnisse war eine Differenzierung in induzierbare Knockout-Mäuse und nicht induzierbare Tiere möglich. Zur Induktion eines Ang-2 KO wurden in den *in vivo* Versuchen die Mäuse beider Gruppen nach einem Standardprotokoll mit Tamoxifen behandelt. In den *in vitro* Versuchen erfolgte nach der Isolation und Anzucht von mPEC eine Behandlung beider Gruppen mit 4-OHT. In den anschließend durchgeführten PCR-Analysen konnte sowohl eine erfolgreiche *in vitro* Induktion einer Ang-2-Defizienz als auch eine erfolgreiche *in vivo* Induktion eines Ang-2 KO in der Mauslinie aufgezeigt werden.

Zur Quantifizierung der Ang-2-Defizienz auf Genexpressionsebene wurde eine RNA-Analyse sowohl *in vivo* induzierter Mäuse als auch der *in vitro* induzierten mPEC durchgeführt. In der qPCR-Analyse zeigte sich *in vivo* zwischen der Knockoutgruppe und der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied bezüglich der Ang-2 Expression. *In vitro* war in der Ang-2-defizienten Gruppe eine tendenziell verringerte RNA-Transkription im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar, welche jedoch nicht statistisch signifikant war. Die Ergebnisse der qPCR-Analysen können auf eine geringe Ausprägung der induzierten Ang-2-Defizienz hinweisen. Jedoch zeigen Studien, dass die Synthese von RNA und die absolute Menge an Protein nicht direkt miteinander korrelieren müssen (Greenbaum et al. 2003; Gygi et al. 1999), so dass die erhobenen qPCR-Daten nicht zwingend einen Rückschluss auf die Effizienz der Gendeletion zulassen. Denn interessanterweise war in den immunhistologischen Untersuchungen der Lungen der Ang-2 KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen eine geringere Ang-2 Expression sowohl im nativen Zustand als auch in der Pneumokokkenpneumonie erkennbar. Dieses Ergebnis, einer verringerten Ang-2-Synthese, konnte auch in den nachfolgenden Untersuchungen anhand der reduzierten Ang-2-Plasmakonzentration innerhalb der Ang-2 KO-Gruppe bestätigt werden.

6.2 Angiopoietin-2-defiziente primäre murine pulmonale Endothelzellen wiesen nach einer Stimulation mit Pneumolysin einen geringeren Integritätsverlust auf als primäre murine pulmonale Kontrollendothelzellen

In vitro konnte ein Unterschied der Ang-2 D-mPEC im Vergleich zu den WT-mPEC aufgezeigt werden. In diesem Versuch wurden die Endothelzellmonolayer beider Gruppen mit PLY stimuliert. Hierbei zeigten die mit PLY stimulierten Ang-2 D-mPEC in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung einen geringeren Integritätsverlust des Zellmonolayers als die zugehörige Kontrollgruppe. Der geringe Integritätsverlust der Ang-2 D-mPEC im Vergleich zu den WT-mPEC kann in diesem Fall auf die bereits bekannte destabilisierende Wirkung von Ang-2 auf die endotheliale Barriere zurückgeführt werden (Gutbier et al. 2018; Scharpfenecker 2005; Parikh et al. 2006). Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die *in vitro* Untersuchungen die Auswirkung einer Ang-2-Defizienz auf rein lokaler zellulärer Ebene wiedergeben und ein simplifiziertes isoliertes Modell einer Gefäßwand darstellen. Zudem wurde hier nur der Einfluss des *S. pneumoniae* Virulenzfaktor PLY auf einen Endothelzellverband untersucht und nicht die Auswirkung einer Infektion mit dem Erreger. Die Reaktionen und Dynamiken eines gesamten Organismus auf eine Infektion mit Pneumokokken im Kontext eines Ang-2 Knockout konnten in diesem Versuchsdesign nicht abgebildet werden. Aus diesen Gründen wurde im weiteren Verlauf ein *in vivo* Infektionsversuch mit *S. pneumoniae* durchgeführt.

6.3 *In vivo* zeigten mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte Angiopoietin-2-Knock-out-Mäuse keinen Anstieg der Angiopoietin-2-Plasmakonzentration

In vivo gab es zwischen den beiden Mausgruppen in der Pneumokokkenpneumonie keine signifikanten Unterschiede im Körpertemperaturverlauf oder beim Körpergewichtsverlust, so dass von einer erfolgreichen gruppengleichen Infektion auszugehen ist. Die Bakterienlast im Blut sowie in der BALF war in beiden Gruppen vergleichbar. Ebenso war in den infizierten Gruppen im Differentialblutbild eine Abnahme und im Leukozytendifferentialbild der BALF eine Zunahme der Entzündungszellen erkennbar. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit dem Verlauf einer Pneumonie und einhergehender Entwicklung eines septischen Geschehens (Levy et al. 2003). *In vivo* wiesen die mit *S. pneumoniae* infizierten WT-Mäuse nach 48 h einen signifikanten Anstieg der Ang-2-Plasmakonzentration im Vergleich zu den scheininfizierten WT-Mäusen auf. Ein Anstieg der Ang-2 RNA-Expression im Lungengewebe nach einer *S. pneumoniae* Infektion wurde von Gutbier et al. (2018, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine) bereits im Mausmodell nachgewiesen. In einer Studie von van der Heijden et al. (2008, Thorax) konnte in Lungenpatienten, die unter ARDS litten, ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Ang-2-Plasmakonzentration und der Entwicklung eines Lungenödems sowie eines pulmonalen Barriereversagens nachgewiesen werden. Hierbei stieg die Ang-2-

Plasmakonzentration und ein gebildeter Ang-2/Ang-1-Quotient parallel mit der pulmonalen Permeabilität an (van der Heijden et al. 2008). Weitere Studien konnten bei schwer erkrankten Patienten ebenfalls einen Ang-2 Konzentrationsanstieg in Folge einer CAP, Sepsis oder eines Traumas belegen (Gutbier et al. 2018; Ganter et al. 2008; Parikh et al. 2006; Bhandari et al. 2006). Obwohl diese Studien eine Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der Plasmakonzentration von Ang-2 ermittelten, ist bisher nicht vollständig geklärt, ob Ang-2 ein wichtiger pathogenetischer Faktor im Krankheitsgeschehen ist oder vor allem als prognostischer Biomarker für eine endotheliale Barrierestörung anzusehen ist (David et al. 2012; Ganter et al. 2008; Giamarellos-Bourboulis et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit war innerhalb der Gruppe der Ang-2 KO-Mäuse kein Anstieg der Ang-2-Plasmakonzentration zwischen den scheininfizierten und infizierten Tieren erkennbar. In der Gruppe der WT-Mäuse stieg der Ang-2-Plasmawert in der Infektion signifikant an, so dass sich ein ebenfalls signifikanter Unterschied in der Ang-2-Plasmakonzentration zwischen den infizierten WT- und den infizierten Ang-2 KO-Mäusen ergab. Diese Ergebnisse, insbesondere der nicht vorhandene Ang-2-Anstieg bei den infizierten KO-Mäusen, weisen zunächst auf eine erfolgte Ang-2 Gendelektion in den Knockouttieren hin, und ergänzen somit die Aussage von 6.2 zu dem immunhistologischen Ergebnis des untersuchten Lungengewebes von naiven Ang-2 KO-Tieren. Trotz dieses signifikanten Unterschiedes war der Krankheitsverlauf beider Mausgruppen ähnlich. Welche Auswirkung die nicht ansteigende, aber weiterhin vorhandene Ang-2-Plasmakonzentration auf den Krankheitsverlauf der Ang-2 KO-Mäuse hatte, ist anhand der ermittelten Daten nicht zu erschließen.

Eine mögliche Erklärung für den gleichbleibend hohen Ang-2-Plasmawert innerhalb der Gruppe der KO-Mäuse könnte in der Pathophysiologie des Proteins liegen. Ang-2 wird in den Endothelzellen in Weibel-Palade-Bodies gespeichert und erst bei Stimulation ausgeschüttet (Fiedler et al. 2004). Es ist möglich, dass sich dieser Basiswert aus oder zu einem Anteil aus präinduziertem, endothelial gespeichertem Ang-2 zusammensetzt. Denn bisher ist unklar, wie lange die Halbwertszeit von gespeichertem Ang-2 in der Endothelzelle ist. Eine Studie von Fiedler et al. (2004, Blood) konnte eine Halbwertszeit von > 16 h nachweisen. Ob und welchen Einfluss das präinduzierte und gespeicherte Ang-2 auf den Versuchsverlauf hat, ist mit den vorhandenen Daten jedoch nicht zu beurteilen. Um hier Klarheit zu schaffen, müssten die Ang-2 Speicher der Endothelzellen vor Beginn des Infektionsversuches entleert werden und den Zellen eine Übergangszeit zur erneuten Synthese gewährt werden. Jedoch ist es fraglich ob *in vivo* ein solcher Versuchsaufbau möglich ist ohne Auswirkungen auf den Gesamtorganismus und das weitere Versuchsvorhaben zu nehmen. Anhand der Möglichkeit, direkten Einfluss auf lokaler zellulärer Ebene zu nehmen, wäre ein solches Versuchsdesign *in vitro* zu erwägen. So könnte durch die Stimulation der Zellen mit Thrombin eine Entleerung der Ang-2

Speicher forciert und die Bedeutung von präinduziertem, gespeichertem Ang-2 besser ergründet werden (Y.-Q. Huang et al. 2002).

6.4 Angiopoietin-2-Knockout-Mäuse wiesen in der Infektion eine vergleichbare IL-6-Konzentration und eine geringere Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand-1-Plasmakonzentration als Kontrollmäuse auf

In den Zytokinkonzentrationen der BALF zeigten die Mausgruppen einen ähnlichen Verlauf. Unterschiede zeigten sich in der CXCL-1-Konzentration im Blutplasma. Hierbei wiesen die infizierten Ang-2 KO-Mäuse eine signifikant geringere CXCL-1-Plasmakonzentration auf als die infizierten WT-Mäuse. Ein Einfluss des erniedrigten zirkulierenden CXCL-1 auf den Krankheitsverlauf konnte mit den erhobenen Daten nicht ermittelt werden. Ein ähnliches Ergebnis konnte eine Studie von Hack et al. (1992) aufweisen. Hier wurde ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der zirkulierenden Plasmakonzentration von IL-8, das als humanes Äquivalent zu dem murinen CXCL-1 gilt, und der Entwicklung eines ARDS gesehen. Eine mögliche Erklärung für den reduzierten CXCL-1 Spiegel könnte in der Ang-1 Plasmakonzentration liegen. Studien zeigen, dass Ang-1 die Expression von IL-8 reduzieren kann, die IL-6-Produktion dadurch aber unbeeinflusst bleibt (Hegeman et al. 2010; Pizurki et al. 2003). Ein zugunsten von Ang-1 verschobener Ang-1/Ang-2-Quotient in den Ang-2 KO-Mäusen könnte möglicherweise den von uns zwischen den infizierten Versuchsgruppen detektierten Unterschied im CXCL-1-Plasmaspiegel und die ähnlichen IL-6-Konzentrationen im Plasma erklären. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung war eine quantitative Messung von Ang-1 im Blutplasma von Mäusen mittels eines ELISA nicht verfügbar. Eine semiquantitative Analyse der Proben mittels eines Western Blot wurde nicht durchgeführt.

6.5 Die Permeabilität der alveolokapillären Barriere war bei Angiopoietin-2-Knockout-Mäusen und Kontrollmäusen nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* vergleichbar hoch

Bezüglich des Einflusses von Ang-2 auf die Permeabilität der alveolokapillären Barriere konnte in der *in vivo* Studie im Vergleich zu den *in vitro* Untersuchungen kein Unterschied zwischen den Ang-2 KO-Tieren und den WT-Tieren gesehen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Mäuse *in vivo* mit dem Erreger *S. pneumoniae* infiziert und entwickelten innerhalb von 48 h eine schwere Pneumonie mit Sepsis. Die Infektion hatte hierbei nicht nur einen Einfluss auf das Lungengewebe, sondern führte, wie die pathologischen Befunde zeigten, zu einem starken inflammatorischen Geschehen im gesamten Organismus. Die Entwicklung einer schweren Pneumokokkenpneumonie ist ein komplexes Geschehen. Der Verlauf dieser Erkrankung wird,

wie bereits in Kapitel 2.5 und 2.7 beschrieben, von einer Vielzahl körpereigener sowie körperfremder Faktoren bestimmt. Ang-2 scheint ein Baustein in diesem Geschehen zu sein, worauf bereits publizierte Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe oder anderer Arbeitsgruppen hinweisen (Gutbier et al. 2018; Lomas-Neira et al. 2014; Stiehl et al. 2014; Calfee et al. 2012; David et al. 2012). Eine Studie von Gutbier et al. (2018) konnte im Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge einen protektiven Einfluss eines Ang-2 Knockdowns aufzeigen. In dieser Studie konnte in den Lungen von Mäusen, bei denen durch eine siRNA-Behandlung ein Ang-2 Knockdown induziert wurde, eine signifikant verringerte PLY-induzierte Permeabilität der alveolokapillären Barriere im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Tieren beobachtet werden. Auch geben die erhobenen *in vitro* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen deutlichen Hinweis darauf, dass eine Ang-2-Defizienz durchaus das Endothel stabilisieren kann. Es ist durchaus denkbar, dass das bereits erwähnte starke inflammatorische Geschehen mögliche protektive Eigenschaften des Ang-2 Knockout auf die alveolokapilläre Barriere maskiert haben könnte

Die Beprobung der Mäuse erfolgte im späten Stadium eines septischen Krankheitsgeschehens pulmonalen Ursprungs. Ein früherer Analysezeitpunkt im Infektionsverlauf, mit einer noch geringen Ausprägung der inflammatorischen Immunantwort, könnte möglicherweise ein klareres Bild bezüglich der potenziellen endothelialen Protektivität eines Ang-2 Knockout *in vivo* abbilden. Eine weitere Modifikationsmöglichkeit des Versuchsdesigns, die zu einer milderen Pneumonie ohne Sepsis führt, könnte das starke inflammatorische Geschehen verringern und darüber hinaus ein klinisch relevantes Krankheitsmodell eines Pneumoniepatienten abbilden. Hierbei würden beide Mausgruppen im Rahmen der Infektion einer antibiotischen Behandlung unterzogen werden. Eine antibiotische Therapie beeinflusst durch eine Verringerung der Erregerlast das inflammatorische Geschehen. Sie bietet jedoch keinen unmittelbaren Schutz vor der Entwicklung einer Schrankenstörung. Eine Ang-2 Deletion hat, wie die erhobenen Daten dieser Arbeit zeigen, keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Erregereliminierung und die generelle Immunantwort und somit kann sie auch die vielseitigen Schädigungen der direkten Erregerwirkung und der gesteigerten Inflammation kaum beeinflussen. Die erwähnten Änderungen im Versuchsdesign könnten das protektive Potential eines Ang-2 Knockout auf die endotheliale Barriere, vermutlich besser darstellen und die Möglichkeit einer Ang-2 inhibierenden Behandlung als adjuvante Therapiestrategie in der Pneumonie näher beleuchten.

6.6 Mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte Angiopoietin-2-Knockout-Mäuse wiesen im Lungengewebe eine ähnliche Pathomorphologie wie Kontrollmäuse auf

Ebenso zeigten sich in den histopathologischen Untersuchungen der Lungen bezüglich der Pathomorphologie keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. In Anbetracht

des ausgeprägten inflammatorischen Geschehens und des hohen Zellinflux ist es sehr wahrscheinlich, dass eventuelle geringgradige Unterschiede in der Endothelzellstruktur histologisch nicht darstellbar waren. In der Gruppe der mit *S. pneumoniae* infizierten WT-Mäuse war im Endothel der Lungengefäße im Vergleich zu den scheininfizierten WT-Mäusen ein reduzierter Ang-2 Gehalt erkennbar. Dieser Unterschied ist höchstwahrscheinlich auf eine erhöhte endotheliale Ang-2 Ausschüttung im Zuge des Infektionsgeschehens zurückzuführen. So wiesen die mit *S. pneumoniae* infizierten WT-Mäuse im Vergleich zu den scheininfizierten WT-Mäusen einen signifikanten Anstieg des Ang-2-Plasmaspiegels auf. Die scheininfizierten Ang-2 KO-Tiere zeigten in der histopathologischen Untersuchung der Lungengefäße im Vergleich zu den WT-Tieren eine deutlich geringere endotheliale Ang-2 Expression, so dass von einer erfolgten Ang-2 Gendeletion in der Gruppe der Ang-2 KO-Mäuse auszugehen ist. In der Infektion war in der Ang-2 KO-Gruppe, bis auf eine Ausnahme, keine endotheliale Ang-2 Expression histopathologisch detektierbar. Dieses Ergebnis weist ebenfalls auf eine erhöhte Ausschüttung endothelialen Ang-2 im Rahmen einer *S. pneumoniae* Infektion hin.

6.7 Die konditionelle Angiopietin-2-Knockout-Maus

Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine kritische Hinterfragung des verwendeten Versuchsdesigns unabdingbar. Ein ausschlaggebender Bestandteil dieser Untersuchungen ist die verwendete Ang-2 KO-Maus. Da konstitutive Ang-2 KO-Mäuse angeborene Defekte im lymphatischen Gefäßsystem und eine erhöhte Sterblichkeitsrate in den ersten Lebenswochen aufweisen, wurde eine konditionelle Ang-2 KO-Maus verwendet (Gale et al. 2002). Die erhobenen Daten zeigen eine verminderte Ang-2 Proteinsynthese, jedoch keine vollständige Ang-2 Gendeletion innerhalb der Knockoutgruppe. Die Gründe für eine verminderte Ausbildung eines konditionellen Knockout können mannigfaltiger Natur sein und sich gegenseitig beeinflussen sowie potenzieren. Eine grundlegende Überlegung ist die Eignung der gewählten Mauslinie für dieses Versuchsdesign. So zeigen Studien von Heffner et al. (2012, Nature Communications) oder Sharma et al. (2014, Current Protocols in Immunology), dass verschiedene Mauslinien unterschiedliche Ansprechbarkeiten auf induktive genetische Alterationen zeigen können. Aufgrund der Novität der Mauslinie sind bisher keine Untersuchungen in diesem Bereich erfolgt, so dass diesbezüglich keine weiteren Aussagen gemacht werden können. Zudem ist in einem induzierbaren Knockoutsystem eine starke mosaikförmige Verteilung der zellulären Cre-Expression möglich, welche in Ihrer generellen, aber auch in ihrer gewebsspezifischen Ausprägung stark variieren kann (Heffner et al. 2012). Auch ist eine unvollständige Entfernung des gewünschten DNA-Abschnittes in einem konditionellen Knockoutsystem eine oft auftretende Komplikation, welche eine verminderte Ausprägung des Knockout zur Folge haben kann (Oka

et al. 2006). Ebenso können Mutationen im Wachstum dazu führen, dass sich das in den Zellen vorhandene CreERT2 in einen nicht aktivierbaren Zustand begibt (Sandlesh et al. 2018). Faktoren wie diese können zu einem sehr ungleichmäßigen Bild der Knockoutexpression innerhalb einer Mauspopulation führen und so die zu erwartenden Effekte verschleiern. Ein deutlicher Hinweis für dieses sehr stark heterogene Induktionsverteilungsmuster innerhalb der von uns verwendeten Mauspopulation ist in den Untersuchungen der Ang-2-Plasmakonzentration zu finden. So wiesen die Ang-2 KO-Mäuse des Versuchsteil 5.4 aufgrund einer starken Streuung im Gegensatz zu den Ang-2 KO-Mäusen des Versuchsteil 5.3.2 keinen signifikanten, sondern nur einen tendenziellen Unterschied der Ang-2-Plasmaspiegel im Vergleich zu WT-Mäusen auf.

Des Weiteren sollte eine mögliche zeitliche Verzögerung zwischen einem effektiven Knockout und den vorhandenen Proteinkonzentrationen in Betracht gezogen werden. Studien zeigen, dass die Expression von Ang-2 dynamisch reguliert wird (Hegen et al. 2004) und dass innerhalb dynamischer Adaptionsprozesse, wie in einem Infektionsgeschehen, zeitliche Verzögerungen zwischen der RNA-Transkription und der Proteinsynthese auftreten können (Fournier et al. 2010). Da sich die zeitlichen Verzögerungen jedoch zumeist nur auf einige Stunden beschränken, sind deren Auswirkungen in diesem Versuchsdesign als unwahrscheinlich anzusehen.

Neben den phänotypischen Voraussetzungen ist auch das verwendete Induktionsprotokoll ein ausschlaggebender Faktor bezüglich der Ausprägung eines konditionellen Knockouts (Andersson et al. 2010). Im Falle dieser Doktorarbeit wurde ein Standardprotokoll bereits bekannter, erprobter konditionaler Cre-Linien mit anderen Targets verwendet, jedoch wurde aufgrund der Novität der gezüchteten Mäuse noch keines der Protokolle an diesen erprobt (Whitfield et al. 2015; Saunders 2011; Andersson et al. 2010). So ist nicht auszuschließen, dass das gewählte Induktionsprotokoll bezüglich dieser Mauslinie nicht optimal ist. Hinzukommend zeigte die histopathologische Untersuchung des Lungengewebes der Kontrollgruppe eine ungewöhnlich starke Entzündungsreaktion auf die stattgefundene Flüssigkeitsapplikation. Eine Vermutung für diese auffällige Reaktion ist ein vorheriges inflammatorisches Geschehen und eine Immunstimulation aufgrund der *i.p.* Tamoxifenapplikation (Whitfield et al. 2015). Es ist nicht auszuschließen, dass dieser additive Reiz einen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen in der Infektion hatte und gegebenenfalls vorhandene Unterschiede im Krankheitsverlauf verschleiert hat. Um das Potenzial dieser Mauslinie besser zu eruieren, müssten zunächst weitere Behandlungsprotokolle erprobt werden.

Ausgehend von der relativ geringen Induktionsfähigkeit der gewählten Mauslinie und der zahlreichen eventuellen negativen Einflussfaktoren wäre die Zucht einer neuen gewebsspezifischen konditionellen Ang-2 KO-Maus denkbar. In unveröffentlichten Untersuchungen wurde

dies bereits durchgeführt. Jedoch war die Induktionsfähigkeit der endothelspezifischen geflochtenen Ang-2 KO-Maus wesentlich geringer als die der verwendeten ubiquitären geflochtenen Ang-2 KO-Maus. Die Verwendung einer konstitutionellen Ang-2 KO-Maus ist aufgrund der bereits erwähnten Entwicklungsdefekte nicht zielführend. Die Generierung einer neuen konditionellen Ang-2 KO-Maus, unter Zuhilfenahme anderer Mauslinien, erscheint aktuell als die sinnvollste Option. Da die Zucht einer neuen Mauslinie mittels homologer Rekombination embryonaler Stammzellen sehr zeit- und kostenintensiv ist, könnte die Anwendung einer Crispr/Cas-Methode zur Generierung einer gewebsspezifischen geflochtenen Ang-2-Maus genutzt werden (Hui Yang et al. 2013). Neben der erwähnten Zeit- und Kostenersparnis ermöglicht diese Methode zusätzlich im Sinne des 3R-Prinzips eine Verringerung der Versuchstierzahlen (Russell and Burch 1960).

7 Zusammenfassung

Die Bedeutung von Angiotensin-2 für die Entwicklung eines akuten Lungenversagens in der schweren Pneumokokkenpneumonie

Schwere bakterielle Pneumonien führen häufig zu einer Schädigung der Lunge. Ein bedeutender Erreger einer schweren Pneumonie ist das grampositive Bakterium *Streptococcus pneumoniae*. Im Verlauf einer Pneumokokkenpneumonie kann es durch direkten Einfluss von Pathogenitätsfaktoren sowie der körpereigenen Abwehrreaktion zu einer erhöhten endothelialen Permeabilität und einem pulmonalen Barriereversagen kommen, welches in schweren Fällen in ein akutes Lungenversagen münden kann. Angiotensin-2 ist ein körpereigener Ligand des endothelial vorkommenden Tyrosinkinase-Rezeptors Tie-2. Das Protein hat einen bekannten proinflammatorischen und destabilisierenden Einfluss auf das Gefäßsystem und wird nach einer Stimulation mit Pneumolysin, einem Virulenzfaktor von *Streptococcus pneumoniae*, vermehrt vom pulmonalen Endothel ausgeschüttet. Die Bedeutung von Angiotensin-2 in der schweren Pneumokokkenpneumonie ist noch unbekannt. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, den Einfluss von Angiotensin-2 auf das inflammatorische Geschehen und die pulmonale Barriestabilität in der schweren Pneumokokkenpneumonie mit einhergehendem akuten Lungenversagen näher zu untersuchen. Hierzu wurde ein konditionelles Angiotensin-2-Knockout-Mausmodell verwendet. Der Knockout der gezüchteten Angiotensin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2 Mauslinie wurde *in vivo* mit Tamoxifen und *in vitro* mit 4-Hydroxytamoxifen induziert. In anschließenden Versuchen wurde die Effizienz des induzierten Angiotensin-2-Knockout untersucht. Hierbei zeigten die Angiotensin-2-Knockout-Mäuse eine lückenhafte Gendeletion. Die induzierten Mäuse wiesen im Vergleich zu ihren nicht induzierbaren Geschwistertieren, welche als Kontrolle dienten, zwar eine deutlich verringerte Expression von Angiotensin-2 auf, eine vollständige Deletion des Proteins konnte jedoch nicht erzielt werden. *In vitro* bestätigten die erhobenen Daten die bereits bekannte destabilisierende Wirkung von Angiotensin-2 auf das pulmonale Endothel. Primäre murine pulmonale Endothelzellen von Angiotensin-2-Knockout-Mäusen wiesen nach einer Stimulation mit Pneumolysin im Vergleich zu pulmonalen Endothelzellen von Kontrollmäusen einen geringeren Integritätsverlust des Zellmonolayers auf. In ergänzenden *in vivo* Studien zeigten die mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten Angiotensin-2-Knockout-Mäuse einen verringerten Angiotensin-2-Plasmaspiegel als die Kontrollmäuse. Ein Unterschied im inflammatorischen Geschehen sowie der alveolokapillären Barrierefunktion war zwischen den Gruppen jedoch nicht ersichtlich, so dass die protektive Wirkung eines Angiotensin-2-Knockout in der Pneumokokkenpneumonie in diesem Versuchsetting nicht bestätigt werden konnte. Gründe für die abweichenden Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Studie könnten in der verwendeten Mauslinie, deren unvollständigen Induzierbarkeit,

sowie im Versuchsdesign liegen. Die Untersuchung des Proteins auch im Hinblick auf die Notwendigkeit neuer innovativer Therapiestrategien bei einem Pneumonie-induzierten akuten Lungenversagen bleibt eine bedeutende Fragestellung. Neben der Erprobung weiterer Tamoxifen-Induktionsprotokolle zum Erreichen einer effektiveren Ang-2 Deletion, oder der Verwendung eines anderen *in vivo* Versuchdesigns (früherer Analysezeitpunkt oder Einsatz einer Antibiotikabehandlung), sollte die Verwendung einer anderen Mauslinie zur Erforschung des Einflusses von Angiotensin-2 im Verlauf einer Pneumokokkenpneumonie in Betracht gezogen werden.

8 Summary

The role of Angiopoietin-2 in the development of acute lung failure in severe pneumococcal pneumonia

Severe bacterial pneumonia frequently leads to permanent lung damage. A significant pathogen of severe pneumonia is the gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae*. In the course of pneumococcal pneumonia, both the pathogen itself and the inflammatory response to the pathogen can lead to increased endothelial permeability and pulmonary barrier failure finally leading to life-threatening respiratory failure. Angiopoietin-2 is an endogenous ligand of the tyrosine kinase receptor Tie-2. Angiopoietin-2 has known pro-inflammatory and destabilizing effects on the vascular system and is increasingly released from the pulmonary endothelium following stimulation with pneumolysin, a virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. However, the precise role of Angiopoietin-2 in severe pneumococcal pneumonia is still unclear. The goal of this study was to elucidate the influence of Angiopoietin-2 on inflammatory processes and alveolar-capillary barrier integrity in severe pneumococcal pneumonia with acute respiratory failure. Therefore, a conditional Angiopoietin-2-knockout mouse model was used. The knockout was induced *in vivo* in the Angiopoietin-2^{-loxP/loxP}-Cre-ERT2-line of mice using Tamoxifen and *in vitro* using 4-Hydroxytamoxifen. In subsequent experiments, the efficiency of the Angiopoietin-2-knockout was determined. The Angiopoietin-2-knockout showed an incomplete gene deletion of Angiopoietin-2. Compared with their non-inducible siblings, which served as controls, the induced mice showed a reduced expression of angiopoietin-2, but a complete deletion of the protein could not be achieved. *In vivo* data confirmed previously established findings that Angiopoietin-2 has a destabilizing effect on the pulmonary endothelium. Pulmonary endothelial cells from Angiopoietin-2-knockout mice showed reduced loss of integrity in their cell monolayers following stimulation with pneumolysin when compared to controls. Further *in vivo* studies also showed reduced Angiopoietin-2 plasma levels in *Streptococcus pneumoniae* infected Angiopoietin-2-knockout mice compared to their controls. No differences were observed between the groups in markers of the inflammatory process or in the state of the alveolar-capillary barrier. Therefore, a protective effect of Angiopoietin-2-knockout in pneumococcal pneumonia could not be demonstrated in this experiment with regard to these parameters. The discrepancies in findings between the *in vitro* and *in vivo* data could be due to the inherent variability between the mice themselves, its incomplete inducibility but also to the study design. Further studies to investigate the significance of this protein for the establishment of new, innovative therapeutic strategies for pneumonia-associated lung failure should be considered. In addition to investigating additional Tamoxifen induction protocols to achieve more effective Ang-2 deletion, or designing another *in vivo* study (e.g., regarding earlier analysis or

initiation of antibiotic treatment), the use of another mouse line to investigate the role of Anti-opoietin-2 in the course of pneumococcal pneumonia should be considered.

9 Literaturverzeichnis

- Ahmed G U, Mehta D, Vogel S, Holinstat M, Paria B C, Tirupathi C, Malik A B (2004): Protein Kinase C α Phosphorylates the TRPC1 Channel and Regulates Store-Operated Ca²⁺ Entry in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 279 (20): 20941–49. doi: 10.1074/jbc.M313975200.
- Ali J, Liao F, Martens E, Muller W A (1997): Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin): Cloning and Role in Endothelial Cell-Cell Adhesion. *Microcirculation* 4 (2): 267–77. doi: 10.3109/10739689709146790.
- Andersson K B, Winer L H, Mørk H K, Molkentin J D, Jaisser F (2010): Tamoxifen Administration Routes and Dosage for Inducible Cre-Mediated Gene Disruption in Mouse Hearts. *Transgenic Research* 19 (4): 715–25. doi:10.1007/s11248-009-9342-4.
- Andonegui G, Bonder C S, Green F, Mullaly S C, Zbytnuik L, Raharjo E, Kubes P (2003): Endothelium-Derived Toll-like Receptor-4 Is the Key Molecule in LPS-Induced Neutrophil Sequestration into Lungs. *Journal of Clinical Investigation* 111 (7): 1011–20. doi: 10.1172/JCI16510.
- Angus D C, Linde-Zwirble W T, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky M R (2001): Epidemiology of Severe Sepsis in the United States: Analysis of Incidence, Outcome, and Associated Costs of Care. *Critical Care Medicine* 29 (7): 1303–10. doi: 10.1097/00003246-200107000-00002.
- Armstrong L, Jordan N, Millar A (1996): Interleukin 10 (IL-10) Regulation of Tumour Necrosis Factor α (TNF- α) from Human Alveolar Macrophages and Peripheral Blood Monocytes. *Thorax* 51 (2): 143–49. doi:10.1136/thx.51.2.143.
- Arock M, Zuany-Amorim C, Singer M, Benhamou M, Pretolani M (1996): Interleukin-10 Inhibits Cytokine Generation from Mast Cells. *European Journal of Immunology* 26 (1): 166–70. doi: 10.1002/eji.1830260126.
- Arpin C, Déchanet J, Van Kooten C, Merville P, Grouard G, Brière F, Banchereau J, Liu Y L (1995): Generation of Memory B Cells and Plasma Cells in Vitro. *Science* 268 (5211): 720–22. doi: 10.1126/science.7537388.
- Asmat T M, Agarwal V, R ath S, Hildebrandt J P, Hammerschmidt S (2011): Streptococcus Pneumoniae Infection of Host Epithelial Cells via Polymeric Immunoglobulin Receptor Transiently Induces Calcium Release from Intracellular Stores. *Journal of Biological Chemistry* 286 (20): 17861–69. doi: 10.1074/jbc.M110.212225.
- Aste Amezaga M, D’Andrea A, Kubin M, Trinchieri G (1994): Cooperation of Natural Killer Cell Stimulatory Factor/Interleukin-12 with Other Stimuli in the Induction of Cytokines and Cytotoxic Cell-Associated Molecules in Human T and NK Cells. *Cellular Immunology* 156 (2): 480–92. doi: 10.1006/cimm.1994.1192.
- Augustin H, Koh Y G, Thurston G. *et al.* (2009): Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 165–177. doi: 10.1038/nrm2639
- Balachandran P, Hollingshead S K, Paton J C, Briles D E (2001): The Autolytic Enzyme LytA of Streptococcus Pneumoniae Is Not Responsible for Releasing Pneumolysin. *Journal of Bacteriology* 183 (10): 3108–16. doi: 10.1128/JB.183.10.3108-3116.2001.
- Banning U, Korholz D, Schneider M, Mario C, Mauz-Korholz C, Bonig H, Klein-Vehne A, Knidmann T, Burdach S (1997): The Role of Interleukin 10 in Interleukin 1s Mediated T-Cell Responses. *Experimental Hematology* 25 (8): 791. doi: 10.1182/blood.v90.11.4513.
- Barton W A, Tzvetkova-Robev D, Miranda E P, Kolev M V, Rajashankar K R, Himanen J P,

- Nikolov D B (2006): Crystal Structures of the Tie2 Receptor Ectodomain and the Angiopoietin-2-Tie2 Complex. *Nature Structural and Molecular Biology* 13 (6): 524–32. doi: 10.1038/nsmb1101.
- Batra S, Cai S, Balamayooran G, Jeyaseelan S (2012): Intrapulmonary Administration of Leukotriene B₄ Augments Neutrophil Accumulation and Responses in the Lung to Klebsiella Infection in CXCL1 Knockout Mice. *The Journal of Immunology* 188 (7): 3458–68. doi: 10.4049/jimmunol.1101985.
- Bauer J, Ganter U, Geiger T, Jacobshagen U, Hirano T, Matsuda T, Kishimoto T, et al. (1988): Regulation of Interleukin-6 Expression in Cultured Human Blood Monocytes and Monocyte-Derived Macrophages. *Blood*. Vol. 72. www.bloodjournal.org.
- Bauer T T, Ewig S, Rodloff A C, Muller E E (2006): Acute Respiratory Distress Syndrome and Pneumonia: A Comprehensive Review of Clinical Data. *Clinical Infectious Diseases* 43 (6): 748–56. doi: 10.1086/506430.
- Bellani G, Laffey J G, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, Gattinoni L, et al. (2016): Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 315 (8): 788–800. doi: 10.1001/jama.2016.0291.
- Bennett W D, Foster W M, Chapman W F (1990): Cough-Enhanced Mucus Clearance in the Normal Lung. *Journal of Applied Physiology* 69 (5): 1670–75. doi: 10.1152/jap.1990.69.5.1670.
- Benton K A, Paton J C, Briles D E (1997): Differences in Virulence for Mice among Streptococcus Pneumoniae Strains of Capsular Types 2, 3, 4, 5, and 6 Are Not Attributable to Differences in Pneumolysin Production. *Infection and Immunity* 65 (4): 1237–44. doi: 10.1128/iai.65.4.1237-1255.1997.
- Berends E T M, Horswill A R, Haste N M, Monestier M, Nizet V, Von Köckritz-Blickwede M (2010): Nuclease Expression by Staphylococcus Aureus Facilitates Escape from Neutrophil Extracellular Traps. *Journal of Innate Immunity* 2 (6): 576–86. doi: 10.1159/000319909.
- Bergmann S, Rohde M, Chhatwal G S, Hammerschmidt S (2001): α -Enolase of Streptococcus Pneumoniae Is a Plasmin(Ogen)-Binding Protein Displayed on the Bacterial Cell Surface. *Molecular Microbiology* 40 (6): 1273–87. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02448.x.
- Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S (2004): Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of Streptococcus Pneumoniae Is A Surface-Displayed Plasminogen-Binding Protein. *Infection and Immunity* 72 (4): 2416–19. doi:10.1128/IAI.72.4.2416-2419.2004.
- Bernad A, Kopf M, Kulbacki R, Weich N, Koehler G, Gutierrez-Ramos J C (1994): Interleukin-6 Is Required in Vivo for the Regulation of Stem Cells and Committed Progenitors of the Hematopoietic System. *Immunity* 1 (9): 725–31. doi: 10.1016/S1074-7613(94)80014-6.
- Bernasconi N L, Traggiai E, Lanzavecchia A (2002): Maintenance of Serological Memory by Polyclonal Activation of Human Memory B Cells. *Science* 298 (5601): 2199–2202. doi: 10.1126/science.1076071.
- Berry A M, Lock R A, Hansman D, Paton J C (1989) Contribution of Autolysin to Virulence of Streptococcus Pneumoniae. *Infection and Immunity* 57 (8): 2324–30. doi: 10.1128/iai.57.8.2324-2330.1989.
- Bevilacqua M P, Pober J S, Majeau G R, Cotran R A, Gimbrone M A (1984): Interleukin 1

- (IL-1) Induces Biosynthesis and Cell Surface Expression of Procoagulant Activity in Human Vascular Endothelial Cells. *Journal of Experimental Medicine* 160 (2): 618–23. doi: 10.1084/jem.160.2.618.
- Bhandari V, Choo-Wing R, Lee C G, Zhu Z, Nedrelow J H, Chupp G L, Zhang X, et al. (2006): Hyperoxia Causes Angiopoietin 2-Mediated Acute Lung Injury and Necrotic Cell Death. *Nature Medicine* 12 (11): 1286–93. doi:10.1038/nm1494.
- Bhardwaj N, Young J W, Nisanian A J, Baggers J, Steinman R M (1993): Small Amounts of Superantigen, When Presented on Dendritic Cells, Are Sufficient to Initiate T Cell Responses. *Journal of Experimental Medicine* 178 (2): 633–42. doi: 10.1084/jem.178.2.633.
- Biemond B J, Levi M, Ten Cate H T, Van der Poll T, Buller H R, Hack C E, Ten Cate J W (1995) : Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor I Release during Experimental Endotoxaemia in Chimpanzees: Effect of Interventions in the Cytokine and Coagulation Cascades. *Clinical Science* 88 (5): 587–94. doi: 10.1042/cs0880587.
- Biron C A, Young H A, Kasaiian M T (1990): Interleukin 2-Induced Proliferation of Murine Natural Killer Cells in Vivo. *Journal of Experimental Medicine* 171 (1): 173–88. doi: 10.1084/jem.171.1.173.
- Biron C A, Sonnenfeld G, Welsh R M (1984): Interferon Induces Natural Killer Cell Blastogenesis In Vivo. *Journal of Leukocyte Biology* 35 (1): 31–37. doi: 10.1002/jlb.35.1.31.
- Björk J, Hedqvist P, Arfors K E (1982): Increase in Vascular Permeability Induced by Leukotriene B₄ and the Role of Polymorphonuclear Leukocytes. *Inflammation* 6 (2): 189–200. doi: 10.1007/BF00916243.
- Bombeli T, Schwartz B R, Harlan J M (1998): Adhesion of Activated Platelets to Endothelial Cells: Evidence for a GPIIb/IIIa-Dependent Bridging Mechanism and Novel Roles for Endothelial Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), $\alpha(v)B3$ Integrin, and GPIb α . *Journal of Experimental Medicine* 187 (3): 329–39. doi: 10.1084/jem.187.3.329.
- Bonnet J, Durmort C, Mortier-Barrière I, Campo N, Jacq M, Moriscot C, Straume D, et al. (2018): Nascent Teichoic Acids Insertion into the Cell Wall Directs the Localization and Activity of the Major Pneumococcal Autolysin LytA. *Cell Surface* 2 (June): 24–37. doi: 10.1016/j.tcs.2018.05.001.
- Borish L C, Steinke J W (2003): 2. Cytokines and Chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc. doi: 10.1067/mai.2003.108.
- Boulnois G J, Paton J C, Mitchell T J, Andrew P W (1991): Structure and Function of Pneumolysin, the Multifunctional, Thiol-Activated Toxin of *Streptococcus Pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 5 (11): 2611–16. doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb01969.x.
- Bozic C R, Gerard N P, Von Uexkull-Guldenband C, Bredow R, Showell H J, Gerard C (1994): The Murine Interleukin 8 Type B Receptor Homologue and Its Ligands. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (November 25): 293355–29358.
- Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies N A, Cooper C E, Singer M (2002): Association between Mitochondrial Dysfunction and Severity and Outcome of Septic Shock. *Lancet* 360 (9328): 219–23. doi: 10.1016/S0140-6736(02)09459-X.
- Brehm M A, Daniels K A, Welsh R M (2005): Rapid Production of TNF- α Following TCR Engagement of Naive CD8 T Cells. *The Journal of Immunology* 175 (8): 5043–49. doi: 10.4049/jimmunol.175.8.5043.

- Briles D E, Crain M J, Gray B M, Forman C, Yother J (1992): Strong Association between Capsular Type and Virulence for Mice among Human Isolates of *Streptococcus Pneumoniae*. *Infection and Immunity* 60 (1): 111–16. doi: 10.1128/iai.60.1.111-116.1992.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss D S, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004): Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 303 (5663): 1532–35. doi: 10.1126/science.1092385.
- Brittan J L, Buckeridge T J, Finn A, Kadioglu A, Jenkinson H F (2012): Pneumococcal Neuraminidase A: An Essential Upper Airway Colonization Factor for *Streptococcus Pneumoniae*. *Molecular Oral Microbiology* 27 (4): 270–83. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00658.x.
- Brook I, Gober A E (2007): Frequency of Recovery of Pathogens from the Nasopharynx of Children with Acute Maxillary Sinusitis before and after the Introduction of Vaccination with the 7-Valent Pneumococcal Vaccine. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 71 (4): 575–79. doi: 10.1016/j.ijporl.2006.10.025.
- Brower R G, Matthay M A, Morris A, Schoenfeld D, Thompson B T, Wheeler A (2000): Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine* 342 (18): 1301–8. doi: 10.1056/NEJM200005043421801.
- Brown M G, Dokun A O, Heusel J W, Smith H R C, Beckman D L, Blattenberger E A, Dubbelde C E, Stone L R, Scalzo A A, Yokoyama W M (2001): Vital Involvement of a Natural Killer Cell Activation Receptor in Resistance to Viral Infection. *Science* 292 (5518): 934–37. doi: 10.1126/science.1060042.
- Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, Bion J et al. (2004): Erratum: Epidemiology and Outcome of Acute Lung Injury in European Intensive Care Units: Results from the ALIVE Study (Intensive Care Medicine (2003) 30 (51-61)). *Intensive Care Medicine*. doi :10.1007/s00134-003-2136-x.
- Brunner T, Heusser C H, Dahinden C A (1993): Human Peripheral Blood Basophils Primed by Interleukin 3 (IL-3) Produce IL-4 in Response to Immunoglobulin E Receptor Stimulation. *Journal of Experimental Medicine* 177 (3): 605–11. doi: 10.1084/jem.177.3.605.
- Burdin N, Péronne C, Banchereau J, Rousset F (1993): Epstein-Barr Virus Transformation Induces B Lymphocytes to Produce Human Interleukin 10. *Journal of Experimental Medicine* 177 (2): 295–304. doi: 10.1084/jem.177.2.295.
- Cai S, Batra S, Lira S A, Kolls J K, Jeyaseelan S (2010): CXCL1 Regulates Pulmonary Host Defense to *Klebsiella* Infection via CXCL2, CXCL5, NF- κ B, and MAPKs. *The Journal of Immunology* 185 (10): 6214–25. doi: 10.4049/jimmunol.0903843.
- Calfee C S, Gallagher D, Abbott J, Thompson B T, Matthay M A; NHLBI ARDS Network. (2012): Plasma angiopoietin-2 in clinical acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Crit Care Med* 40 (6):1731-7. doi: 10.1097/CCM.0b013e3182451c87
- Camara M, Boulnois G J, Andrew P W, Mitchell T J (1994): A Neuraminidase from *Streptococcus Pneumoniae* Has the Features of a Surface Protein. *Infection and Immunity* 62 (9): 3688–95. doi: 10.1128/iai.62.9.3688-3695.1994.
- Carratalà J, Fernández-Sabé N, Ortega L et al. (2005): Outpatient Care Compared with Hospitalization for Community-Acquired Pneumonia: A Randomized Trial in Low-Risk Patients. *Ann Intern Med*.2005;142:165-172. [Epub ahead of print 1 February 2005]. doi:10.7326/0003-4819-142-3-200502010-00006.

- Cassatella M A., Meda L, Gasperini S, D'Andrea A, Ma X, Trinchieri G (1995): Interleukin-12 Production by Human Polymorphonuclear Leukocytes. *European Journal of Immunology* 25 (1): 1–5. doi: 10.1002/eji.1830250102.
- Castell J V, Gómez-Lechón M J, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich P C (1988): Recombinant Human Interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) Regulates the Synthesis of Acute Phase Proteins in Human Hepatocytes. *FEBS Letters* 232 (2): 347–50. doi :10.1016/0014-5793(88)80766-X.
- Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss B M, Nguyen J X, Marques M B, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney M R (2012): Platelets Induce Neutrophil Extracellular Traps in Transfusion-Related Acute Lung Injury. *Journal of Clinical Investigation* 122 (7): 2661–71. doi: 10.1172/JCI61303.
- Cerutti A, Zan H, Schaffer A, Bergsagel L, Harindranath N, Max E E, Casali P (1998): CD40 Ligand and Appropriate Cytokines Induce Switching to IgG, IgA, and IgE and Coordinated Germinal Center and Plasmacytoid Phenotypic Differentiation in a Human Monoclonal IgM+IgD+B Cell Line.” *The Journal of Immunology* 160 (5): 2145 LP – 2157.
- Chadban S J, Tesch G H, Foti R, Lan H Y, Atkins R C, Nikolic-Paterson D J (1998): Interleukin-10 Differentially Modulates MHC Class II Expression by Mesangial Cells and Macrophages in Vitro and in Vivo. *Immunology* 94 (1): 72–78. doi:10.1046/j.1365-2567.1998.00487.x.
- Chen C, Shi L, Li Y, Wang X, Yang S (2016): Disease-Specific Dynamic Biomarkers Selected by Integrating Inflammatory Mediators with Clinical Informatics in ARDS Patients with Severe Pneumonia. *Cell Biology and Toxicology* 32 (3): 169–84. doi: 10.1007/s10565-016-9322-4.
- Cillóniz C, Ewig S, Polverino E, Marcos M A, Esquinas C, Gabarrús A, Mensa J, Torres A (2011): Microbial Aetiology of Community-Acquired Pneumonia and Its Relation to Severity. *Thorax* 66 (4): 340–46. doi: 10.1136/thx.2010.143982.
- Cillóniz C, Polverino E, Ewig S, Aliberti S, Gabarrús A, Menéndez R, Mensa J, Blasi F, Torres A (2013): Impact of Age and Comorbidity on Cause and Outcome in Community-Acquired Pneumonia. *Chest* 144 (3): 999–1007. doi: 10.1378/chest.13-0062.
- Clark S R., Ma A C, Tavener S A, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly M M, Patel K D et al. (2007): Platelet TLR4 Activates Neutrophil Extracellular Traps to Ensnare Bacteria in Septic Blood. *Nature Medicine* 13 (4): 463–69. doi: 10.1038/nm1565.
- Cockeran R, Durandt C, Feldman C, Mitchell, Anderson R (2002): Pneumolysin Activates the Synthesis and Release of Interleukin-8 by Human Neutrophils In Vitro. *The Journal of Infectious Diseases* 186 (4): 562–65. doi:10.1086/341563.
- Coller B S, Beer J H, Scudder L E, Steinberg M H (1989): Collagen-Platelet Interactions: Evidence for a Direct Interaction of Collagen with Platelet GPIa/IIa and an Indirect Interaction with Platelet GPIIb/IIIa Mediated by Adhesive Proteins. *Blood* 74 (1): 182–92. doi: 10.1182/blood.v74.1.182.bloodjournal741182.
- Colucci M, Balconi G, Lorenzet R, Pietra A, Locati D, Donati M B, Semeraro N (1983): Cultured Human Endothelial Cells Generate Tissue Factor in Response to Endotoxin. *Journal of Clinical Investigation* 71 (6): 1893–96. doi: 10.1172/JCI110945.
- Cosgrove D, Gray D, Dierich A, Kaufman J, Lemeur M, Benoist C, Mathis D (1991): Mice Lacking MHC Class II Molecules. *Cell* 66 (5): 1051–66. doi: 10.1016/0092-8674(91)90448-8.
- Coutinho A, Gronowicz E, Bullock W W, Möller G (1974): Mechanism of Thymus-Independent Immunocyte Triggering: Mitogenic Activation of B Cells Results in Specific

- Immune Responses. *Journal of Experimental Medicine* 139 (1): 74–92.
doi: 10.1084/jem.139.1.74.
- Culley F J, Brown A, Girod N, Pritchard D I, Williams T J (2002): Innate and Cognate Mechanisms of Pulmonary Eosinophilia in Helminth Infection. *European Journal of Immunology* 32 (5): 1376–85. doi: 10.1002/1521-4141(200205)32:5<1376::AID-IMMU1376>3.0.CO;2-8.
- Dähne T, Bauer W, Essig A, Schaaf B, Spinner C D, Pletz M W, Rohde G, Rupp J, Witzenzath M, Panning M & Members of the CAPNETZ study group (2021): The impact of the SARS-CoV-2 pandemic on the prevalence of respiratory tract pathogens in patients with community-acquired pneumonia in Germany, *Emerging Microbes & Infections*, 10:1, 1515-1518, doi: 10.1080/22221751.2021.1957402
- Dalhoff K, Abele-Horn M, Andreas S, Deja M, Ewig S, Gastmeier P, Gatermann S et al. (2018): Epidemiology, Diagnosis and Treatment of Adult Patients with Nosocomial Pneumonia - Update 2017: S3 Guideline of the German Society for Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, the German Society for Infectious Diseases, the German Society for Hygiene and Microbiology, the German Respiratory Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Radiological Society and the Society for Virology. *Pneumologie* 72 (1): 15–63. doi: 10.1055/s-0043-121734.
- Daly C, Wong V, Burova E, Wie Y, Zabski S, Griffiths J, Lai K M et al. (2004): Angiopoietin-1 Modulates Endothelial Cell Function and Gene Expression via the Transcription Factor FKHR (FOXO1). *Genes and Development* 18 (9): 1060–71. doi: 10.1101/gad.1189704.
- David S, Mukherjee A, Ghosh C C, Yano M, Khankin E V, Wenger J B, Karumanchi S A, Shapiro N I, Parikh S M. (2012): Angiopoietin-2 May Contribute to Multiple Organ Dysfunction and Death in Sepsis. *Critical Care Medicine* 40 (11): 3034–41. doi: 10.1097/CCM.0b013e31825fdc31.
- Davis S, Aldrich T H, Jones P F, Acheson A, Compton D L, Jain V, Ryan T E et al. (1996): Isolation of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, by Secretion-Trap Expression Cloning. *Cell* 87 (7): 1161–69. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81812-7.
- Davis S, Papadopoulos N, Aldrich T H, Maisonpierre P C, Huang T, Kovac L, Xu A et al. (2003): Angiopoietins Have Distinct Modular Domains Essential for Receptor Binding, Dimerization and Superclustering. *Nature Structural Biology* 10 (1): 38–44. doi: 10.1038/nsb880.
- de Wetering J K van, van Eijk M, van Golde L M G, Hartung T, van Strijp J A G, and Batenburg J J (2001): Characteristics of Surfactant Protein A and D Binding to Lipoteichoic Acid and Peptidoglycan, 2 Major Cell Wall Components of Gram-Positive Bacteria. *The Journal of Infectious Diseases* 184 (9): 1143–51. doi: 0.1086/323746.
- Dellinger R P, Levy Mitchell, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal S M, Sevransky J E et al. (2013): Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. *Critical Care Medicine* 41 (2): 580–637. doi: 10.1097/CCM.0b013e31827e83af.
- Dhainaut J F, Shorr A F, Macias W L, Kollef M J, Levi M, Reinhart K, Nelson D R (2005): Dynamic Evolution of Coagulopathy in the First Day of Severe Sepsis: Relationship with Mortality and Organ Failure. *Critical Care Medicine* 33 (2): 341–48. doi: 10.1097/01.ccm.0000153520.31562.48.
- Dietert K, Gutbier B, Wienhold S M, Reppe K, Jiang X, Yao L, Chaput C et al. (2017): Spectrum of Pathogen- and Model-Specific Histopathologies in Mouse Models of Acute Pneumonia. *PLoS One* 12 (11): e0188251. doi: 10.1371/journal.pone.0188251.

- Ding L, Linsley P S, Huang L Y, Germain R N, Shevach E M (1993): IL-10 Inhibits Macrophage Costimulatory Activity by Selectively Inhibiting the up-Regulation of B7 Expression. *Journal of Immunology* 151 (3): 1224–34.
- Dintzis R Z, Middleton M H, Dintzis H M (1983): Studies on the Immunogenicity and Tolerogenicity of T-Independent Antigens. *Journal of Immunology*. 131 (5): 2196–2203.
- Dubravec D B, Spriggs D R, Mannick J A, Rodrick M L (1990): Circulating Human Peripheral Blood Granulocytes Synthesize and Secrete Tumor Necrosis Factor Alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (17).
- Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Klein O, Goldman M, Tavernier J, Capron A, Capron M (1994): Interleukin 5 Synthesis by Eosinophils: Association with Granules and Immunoglobulin-Dependent Secretion. *Journal of Experimental Medicine* 179 (2): 703–8. doi: 10.1084/jem.179.2.703.
- Dumont D J, Gradwohl G, Fong G H, Puri M C, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman M L (1994): Dominant-Negative and Targeted Null Mutations in the Endothelial Receptor Tyrosine Kinase, Tek, Reveal a Critical Role in Vasculogenesis of the Embryo. *Genes and Development* 8 (16): 1897–1909. doi: 10.1101/gad.8.16.1897.
- Duthy T G, Ormsby R J, Giannakis E, Ogunniyi A D, Stroehrer U W, Paton K C, Gordon D L (2002): The Human Complement Regulator Factor H Binds Pneumococcal Surface Protein PspC via Short Consensus Repeats 13 to 15. *Infection and Immunity* 70 (10): 5604–11. doi: 10.1128/IAI.70.10.5604-5611.2002.
- Eardley D D, Shen F W, Gershon R K, Ruddle N H (1980): Lymphotoxin Production by Subsets of T Cells. *Journal of Immunology*. 124 (3): 1199–1202.
- Ehlenberger AG, Nussenzweig V (1977): The Role of Membrane Receptors for C3b and C3d in Phagocytosis*. *Journal of Experimental Medicine* 145 (2): 357–71. <https://doi.org/10.1084/jem.145.2.357>.
- Eklund L, Olsen B R (2006): Tie Receptors and Their Angiopoietin Ligands Are Context-Dependent Regulators of Vascular Remodeling. *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.09.002.
- Eklund L, Saharinen P (2013): Angiopoietin Signaling in the Vasculature. *Experimental Cell Research*. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.03.011.
- Elias J A, Lentz V (1990): IL-1 and Tumor Necrosis Factor Synergistically Stimulate Fibroblast IL-6 Production and Stabilize IL-6 Messenger RNA. *Journal of Immunology*. 145 (1): 161–66.
- Endharti A T, Rifa' M, Shi Z, Fukuoka Y, Nakahara Y, Kawamoto Y, Takeda K, Isobe K I, Suzuki H (2005): Cutting Edge: CD8 + CD122 + Regulatory T Cells Produce IL-10 to Suppress IFN- γ Production and Proliferation of CD8 + T Cells. *The Journal of Immunology* 175 (11): 7093–97. doi: 10.4049/jimmunol.175.11.7093.
- Engelhardt W von, Breves G (2005): Physiologie Der Haustiere; 2. Auflage; Stuttgart: Enke Verlag - ISBN 3-8304-10395
- Ertel W, Kremer J P, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, Schildberg F W (1995): Downregulation of Proinflammatory Cytokine Release in Whole Blood from Septic Patients. *Blood* 85 (5): 1341–47. doi: 10.1182/blood.v85.5.1341.bloodjournal8551341.
- Esmon C T (1989): The Roles of Protein C and Thrombomodulin in the Regulation of Blood Coagulation. *Journal of Biological Chemistry*. doi :10.2491/jbsth1970.15.607.
- Ewig S, Höffken G, Kern W V, Rohde G, Flick H, Krause R, Ott S et al. (2016a): S3-Leitlinie

- Behandlung von Erwachsenen Patienten Mit Ambulant Erworbener Pneumonie Und Prävention-Update 2016 Sprecher Für Die Deutsche Gesellschaft Für Infektiologie e.V. 4 Sprecher Für Das Kompetenz-Netzwerk CAPNETZ Deutschland e.V. 5 Sprecher Für Österreichische Gesellschaft Für Pneumologie 6 Sprecher Für Die Österreichische Gesellschaft Für Infektionskrankheiten Und Tropenmedizin 7 Sprecher Für Die Schweizerische Gesellschaft Für Pneumologie." *Pneumologie* 2016; 70(03): 151-200 doi: 10.1055/s-0042-101873
- Ewig S (2016b): Die Ambulant Erworbene Pneumonie Als Terminale Komplikation Am Lebensende. In *Ambulant Erworbene Pneumonie*, 259–66. Berlin, Heidelberg: Springer - ISBN 978-3662-47311-5.
- Ewig S, Kolditz M, Pletz M, Altiner A, Albrich W, Drömann D, Flick H, Gatermann S, Krüger S, Nehls W, Panning M, Rademacher J, Rohde G, Rupp J, Schaaf B, Heppner HJ, Krause R, Ott S, Welte T, Witzernath M (2021): Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie – Update 2021 [Management of Adult Community-Acquired Pneumonia and Prevention - Update 2021 - Guideline of the German Respiratory Society (DGP), the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy (PEG), the German Society for Infectious Diseases (DGI), the German Society of Medical Intensive Care and Emergency Medicine (DGIIIN), the German Viological Society (DGV), the Competence Network CAPNETZ, the German College of General Practitioners and Family Physicians (DEGAM), the German Society for Geriatric Medicine (DGG), the German Palliative Society (DGP), the Austrian Society of Pneumology Society (ÖGP), the Austrian Society for Infectious and Tropical Diseases (ÖGIT), the Swiss Respiratory Society (SGP) and the Swiss Society for Infectious Diseases Society (SSI)]. *Pneumologie*. 2021 Sep;75(9):665-729. German. doi: 10.1055/a-1497-0693. Epub 2021 Jul 1. PMID: 34198346.
- Falati S, Edmead C E, Poole A W (1999): Glycoprotein Ib-V-IX, a Receptor for von Willebrand Factor, Couples Physically and Functionally to the Fc Receptor γ -Chain, Fyn, and Lyn to Activate Human Platelets. *Blood* 94 (5): 1648–56. doi: 10.1182/blood.v94.5.1648.417k31_1648_1656.
- Faunce D E, Sonoda K H, Stein-Streilein J (2001): MIP-2 Recruits NKT Cells to the Spleen During Tolerance Induction. *The Journal of Immunology* 166 (1): 313–21. doi: 10.4049/jimmunol.166.1.313.
- Feistritzer C, Mosheimer B A, Sturn D H, Bijuklic K, Patsch J R, Wiedermann C J (2004): Expression and Function of the Angiopoietin Receptor Tie-2 in Human Eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114 (5): 1077–84. doi: 10.1016/j.jaci.2004.06.045.
- Ferguson N D, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Beale R, Brochard L et al. (2012): The Berlin Definition of ARDS: An Expanded Rationale, Justification, and Supplementary Material. *Intensive Care Medicine* 38 (10): 1573–82. doi: 10.1007/s00134-012-2682-1.
- Fernandez EJ, Lolis E (2002): Structure, Function, and Inhibition of Chemokines. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 42 (1): 469–99. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.091901.115838.
- Fernebro J, Andersson I, Sublett J, Morfeldt E, Novak R, Tuomanen E, Normark S, Henriques Normark B (2004): Capsular Expression in *Streptococcus Pneumoniae* Negatively Affects Spontaneous and Antibiotic-Induced Lysis and Contributes to Antibiotic Tolerance . *The Journal of Infectious Diseases* 189 (2): 328–38. doi: 10.1086/380564.
- Ferrante A, Rowan-Kelly B, Paton J C (1984): Inhibition of in Vitro Human Lymphocyte

- Response by the Pneumococcal Toxin Pneumolysin. *Infection and Immunity* 46 (2): 585–89.
- Ferring M, Vincent J L (1997): Is Outcome from ARDS Related to the Severity of Respiratory Failure? *European Respiratory Journal* 10 (6): 1297–1300.
- Fiedler U, Augustin H G (2006): Angiopoietins: A Link between Angiogenesis and Inflammation. *Trends in Immunology* 27 (12): 552-558. doi: 10.1016/j.it.2006.10.004.
- Fiedler U, Krissl T, Koidl S, Weiss C, Koblizek T, Deutsch U, Martiny-Baron G, Marmé D, Augustin H G (2003): Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 Share the Same Binding Domains in the Tie-2 Receptor Involving the First Ig-like Loop and the Epidermal Growth Factor-like Repeats. *Journal of Biological Chemistry* 278 (3): 1721–27. doi: 10.1074/jbc.M208550200.
- Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt J M, Kriz W, Thurston G, Augustin H G (2004): The Tie-2 Ligand Angiopoietin-2 Is Stored in and Rapidly Released upon Stimulation from Endothelial Cell Weibel-Palade Bodies. *Blood* 103 (11): 4150–56. doi: 10.1182/blood-2003-10-3685.
- Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston Gavin, Gale N W et al. (2006): Angiopoietin-2 Sensitizes Endothelial Cells to TNF- α and Has a Crucial Role in the Induction of Inflammation. *Nature Medicine* 12 (2): 235–39. doi: 10.1038/nm1351.
- Fillion I, Ouellet N, Simard M, Bergeron Y, Sato S, Bergeron M G (2001): Role of Chemokines and Formyl Peptides in Pneumococcal Pneumonia-Induced Monocyte/Macrophage Recruitment. *The Journal of Immunology* 166 (12): 7353–61. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7353.
- Fine M J, Auble T E, Yealy D M, Hanusa B H, Weissfeld L A, Singer D E, Coley C M, Marrie T J, Kapoor W N (1997): A Prediction Rule to Identify Low-Risk Patients with Community-Acquired Pneumonia. *New England Journal of Medicine* 336 (4): 243–50. doi: 10.1056/NEJM199701233360402.
- Flaumenhaft R (2003): Molecular Basis of Platelet Granule Secretion. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23:1152-1160. doi: 10.1161/01.ATV.0000075965.88456.48.
- Fletcher M A, Laufer D S, McIntosh E D G, Cimino C, Malinoski F J (2006): Controlling Invasive Pneumococcal Disease: Is Vaccination of at-Risk Groups Sufficient? *International Journal of Clinical Practice* 60 (4): 450–56. doi: 10.1111/j.1368-5031.2006.00858.x.
- Fournier M L, Paulson A, Pavelka N, Mosley A L, Gaudenz K, Bradford W D, Glynn E et al. (2010): Delayed Correlation of mRNA and Protein Expression in Rapamycin-Treated Cells and a Role for Ggc1 in Cellular Sensitivity to Rapamycin. *Molecular and Cellular Proteomics* 9 (2): 271–84. doi: 10.1074/mcp.M900415-MCP200.
- Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, Hendrycx S, Caron C, Rime A, Marey A, Lestavel P (1992): Septic Shock, Multiple Organ Failure, and Disseminated Intravascular Coagulation; Compared Patterns of Antithrombin III, Protein C, and Protein S Deficiencies. In *Chest*, 101:816–23. doi: 10.1378/chest.101.3.816.
- French J E, Macfarlane R G, Sanders A G (1964): THE STRUCTURE OF HAEMOSTATIC PLUGS AND EXPERIMENTAL THROMBI IN SMALL. *British Journal of Experimental Pathology* 45 (5): 467–74.
- Freudenberg N, Kortsik C, Ross A (2002): *Grundlagen Der Zytopathologie: Kurzlehrbuch Und Atlas Der Allgemeinen Und Speziellen Zytodiagnostik*. Basel: Karger Publishers - ISBN 978-3-8055-7255-2

- Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim H Z, Kodama T, Shibuya M, Takakura N, Koh G Y, Mochizuki N (2008) : Differential Function of Tie2 at Cell-Cell Contacts and Cell-Substratum Contacts Regulated by Angiopoietin-1. *Nature Cell Biology* 10 (5): 513–26. doi: 10.1038/ncb1714.
- Fulton S A, Johnsen J M, Wolf S F, Sieburth D S, Boom W H (1996): Interleukin-12 Production by Human Monocytes Infected with Mycobacterium Tuberculosis: Role of Phagocytosis. *Infection and Immunity* 64 (7): 2523.
- Fung-Leung W P, Schilham M W, Rahemtulla A, Kündig T M, Vollenweider M, Potter J, van Ewijk W, Mak TW (1991): CD8 Is Needed for Development of Cytotoxic T but Not Helper T Cells. *Cell* 65 (3): 443–49. doi: 10.1016/0092-8674(91)90462-8.
- Furchgott R F, Zawadzki J V (1980): The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature* 288 (5789): 373–76. doi :10.1038/288373a0.
- Gago S, Esteban C, Valero C, Zaragoza O, Puig De La Bellacasa J, José Buitrago M (2014): A Multiplex Real-Time PCR Assay for Identification of Pneumocystis Jirovecii, Histoplasma Capsulatum, and Cryptococcus Neoformans/Cryptococcus Gattii in Samples from AIDS Patients with Opportunistic Pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* 52 (4): 1168–76. doi: 10.1128/JCM.02895-13.
- Gale N W, Thurston G, Hackett S F, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C et al. (2002): Angiopoietin-2 Is Required for Postnatal Angiogenesis and Lymphatic Patterning, and Only the Latter Role Is Rescued by Angiopoietin-1. *Developmental Cell* 3 (3): 411–23. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00217-4.
- Gamble J R, Drew J, Trezise L, Underwood A, Parsons M, Kasminkas L, Rudge J, Yancopoulos G, Vadas M A (2000): Angiopoietin-1 Is an Antipermeability and Anti-Inflammatory Agent in Vitro and Targets Cell Junctions. *Circulation Research* 87 (7): 603–7. doi: 10.1161/01.RES.87.7.603.
- Ganter M T, Cohen M J, Brohi K, Chesebro B B, Staudenmayer K L, Rahn P, Christiaans S C, Bir N D, Pittet J F (2008): Angiopoietin-2, Marker and Mediator of Endothelial Activation with Prognostic Significance Early after Trauma? *Annals of Surgery* 247 (2): 320–26. doi: 10.1097/SLA.0b013e318162d616.
- Gauchat J F, Henchoz S, Mazzei G, Aubry J P, Brunner T, Blasey H, Life P et al. (1993): Induction of Human IgE Synthesis in B Cells by Mast Cells and Basophils. *Nature* 365 (6444): 340–43. doi: 10.1038/365340a0.
- Gauldie J, Richards C, Northemann W, Fey G, Baumann H (1989): IFN Beta 2/BSF2/IL-6 Is the Monocyte-Derived HSF That Regulates Receptor-Specific Acute Phase Gene Regulation in Hepatocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 557: 46–58; discussion 58-9.
- Gavard J, Gutkind J S (2006): VEGF Controls Endothelial-Cell Permeability Promoting β -Arrestin-Dependent Endocytosis VE-Cadherin. *Nature Cell Biology* 8 (11): 1223–34. doi: 10.1038/ncb1486.
- Gavard J, Patel V, Gutkind J S (2008): Angiopoietin-1 Prevents VEGF-Induced Endothelial Permeability by Sequestering Src through MDia. *Developmental Cell* 14 (1): 25–36. doi: 10.1016/j.devcel.2007.10.019.
- Geelen S, Bhattacharyya C, Tuomanen E (1992): Induction of Procoagulant Activity on Human Endothelial Cells by Streptococcus Pneumoniae. *Infection and Immunity* 60 (10): 4179–83.
- Gerok, Huber, Meinertz, and Zeidler (2007): *Die Innere Medizin - Referenzwerk Für Den*

Facharzt: 11 Ausgabe ; Stuttgart: Schattauer - ISBN 978-3-7945-2222-4.

- Ghebreyesus T A (2020): WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on Covid-19 - 11 March 2020. Abgerufen am 20.09.2021 um 17:53 Uhr, von <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
- Ghosh C C, Thamm K, Berghelli A V, Schimpf C, Maski M R, Abid T, Milam K E, et al. (2015): Drug Repurposing Screen Identifies Foxo1-Dependent Angiotensin-2 Regulation in Sepsis. *Critical Care Medicine* 43 (7): e230–40. doi: 10.1097/CCM.0000000000000993.
- Giamarellos-Bourboulis E J, Kanellakopoulou K, Pelekanou A, Tsaganos T, Kotzampassi K (2008): Kinetics of Angiotensin-2 in Serum of Multi-Trauma Patients: Correlation with Patient Severity. *Cytokine* 44 (2): 310–13. doi: 10.1016/j.cyto.2008.09.003.
- Gong J L, McCarthy K M, Rogers R A, Schneeberger E E (1994): Interstitial Lung Macrophages Interact with Dendritic Cells to Present Antigenic Peptides Derived from Particulate Antigens to T Cells. *Immunology* 81 (3): 343–51.
- Gonzalo J A, Lloyd C M, Kremer L, Finger E, Martinez-A C, Siegelman M H, Cybulsky M, Gutierrez-Ramos J C (1996): Eosinophil Recruitment to the Lung in a Murine Model of Allergic Inflammation: The Role of T Cells, Chemokines, and Adhesion Receptors. *Journal of Clinical Investigation* 98 (10): 2332–45. doi: 10.1172/JCI119045.
- Goodman M G, Chenoweth D E, Weigle W O (1982): Induction of Interleukin 1 Secretion and Enhancement of Humoral Immunity by Binding of Human C5a to Macrophage Surface C5a Receptors. *Journal of Experimental Medicine* 156 (3): 912–17. doi: 10.1084/jem.156.3.912.
- Gordon J R, Galli S J (1990): Mast Cells as a Source of Both Preformed and Immunologically Inducible TNF- α /Cachectin. *Nature* 346 (6281): 274–76. doi: 10.1038/346274a0.
- Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M (2003): Comparing Protein Abundance and mRNA Expression Levels on a Genomic Scale. *Genome Biology*. doi: 10.1186/gb-2003-4-9-117.
- Greenberger M J, Strieter R M, Kunkel S L, Danforth J M, Laichalk L L, McGillicuddy D C, Standiford T J (1996): Neutralization of Macrophage Inflammatory Protein-2 Attenuates Neutrophil Recruitment and Bacterial Clearance in Murine Klebsiella Pneumonia. *Journal of Infectious Diseases* 173 (1): 159–65. doi: 10.1093/infdis/173.1.159.
- Grewe M, Czech W, Morita A, Werfel T, Klammer M, Kapp A, Ruzicka T, Schöpf E, Krutmann J (1998): Human Eosinophils Produce Biologically Active IL-12: Implications for Control of T Cell Responses. *The Journal of Immunology* 161 (1): 415 LP – 420.
- Griffin G K, Newton G, Tarrío M L, Bu D, Maganto-García E, Azcutia V, Alcaide P, et al. (2012): IL-17 and TNF- α Sustain Neutrophil Recruitment during Inflammation through Synergistic Effects on Endothelial Activation. *The Journal of Immunology* 188 (12): 6287–99. doi: 10.4049/jimmunol.1200385.
- Grogan J L, Mohrs M, Harmon B, Lacy D A, Sedat J W, Locksley R M (2001): Early Transcription and Silencing of Cytokine Genes Underlie Polarization of T Helper Cell Subsets. *Immunity* 14 (3): 205–15. doi: 10.1016/S1074-7613(01)00103-0.
- Grossman R M, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy D P, May L T, Kupper T S, Sehgal P B, Gottlieb A B (1989): Interleukin 6 Is Expressed in High Levels of Psoriatic Skin and Stimulates Proliferation of Cultured Human Keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (16): 6367–71. doi: 10.1073/pnas.86.16.6367.

- Günther A, Mosavi P, Heinemann S, Ruppert C, Muth H, Markart P, Grimminger F, Walmrath D, Temmesfeld-Wollbrück B, Seeger W (2000): Alveolar Fibrin Formation Caused by Enhanced Procoagulant and Depressed Fibrinolytic Capacities in Severe Pneumonia: Comparison with the Acute Respiratory Distress Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161 (2 I): 454–62. doi: 10.1164/ajrccm.161.2.9712038.
- Gupta S (2002): Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis in T Cells from Aged Humans: A Role of TNFR-I and Downstream Signaling Molecules. *Experimental Gerontology* 37 (2–3): 293–99. doi: 10.1016/S0531-5565(01)00195-4.
- Gutbier B, Neuhauß A K, Reppe K, Ehrler C, Santel A, Kaufmann J, Scholz M, et al. (2018): Prognostic and Pathogenic Role of Angiopoietin-1 and -2 in Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 198 (2): 220–31. doi: 10.1164/rccm.201708-1733OC.
- Gygi S P, Rochon Y, Franza B R, Aebersold R (1999): Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Molecular and Cellular Biology* 19 (3): 1720–30. doi: 10.1128/mcb.19.3.1720.
- Hakanpaa L, Sipila T, Leppanen V M, Gautam P, Nurmi H, Jacquemet G, Eklund L, Ivaska J, Alitalo K, Saharinen P (2015): Endothelial Destabilization by Angiopoietin-2 via Integrin B1 Activation. *Nature Communications* 6 (January) 5962. doi: 10.1038/ncomms6962.
- Håkansson A, Roche H, Mirza S, McDaniel L S, Brooks-Walter A, Briles D E (2001): Characterization of Binding of Human Lactoferrin to Pneumococcal Surface Protein A. *Infection and Immunity* 69 (5): 3372–81. doi: 10.1128/IAI.69.5.3372-3381.2001.
- Hamid Q, Barkans J, Meng Q, Ying S, Abrams J S, Kay A B, Moqbel R (1992): Human Eosinophils Synthesize and Secrete Interleukin-6, in Vitro. *Blood* 80 (6): 1496–1501. doi: 10.1182/blood.v80.6.1496.bloodjournal8061496.
- Hanna N, Burton R C (1981): Definitive Evidence That Natural Killer (NK) Cells Inhibit Experimental Tumor Metastases in Vivo. *Journal of Immunology* 127 (5): 1754–58.
- Hartmann K, Henz B M, Krüger-Krasagakes S, Köhl J, Burger R, Gurtl S, Haase I, Lippert U, Zuberbier T (1997): C3a and C5a Stimulate Chemotaxis of Human Mast Cells. *Blood* 89 (8): 2863–70. doi: 10.1182/blood.v89.8.2863.
- Hawighorst T, Skobe M, Streit M, Hong Y K, Velasco P, Brown L F, Riccardi L, Lange-Asschenfeldt B, Detmar M (2002): Activation of the Tie2 Receptor by Angiopoietin-1 Enhances Tumor Vessel Maturation and Impairs Squamous Cell Carcinoma Growth. *American Journal of Pathology* 160 (4): 1381–92. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62565-5.
- Hedrich, H (2012): *The Laboratory Mouse*. *The Laboratory Mouse*; Amsterdam :Elsevier Ltd. - ISBN 978-0-12-382008-2.
- Hees H, Sinowatz F (2000): *Histologie : Kurzlehrbuch Der Zytologie Und Mikroskopischen Anatomie*; 4 Auflage; Köln: Deutsche Ärzte-Verlag - ISBN 9783000023156
- Heffner C S, Pratt C H, Babiuk R P, Sharma Y, Rockwood S F, Donahue L R, Eppig J T, Murray S A (2012): Supporting Conditional Mouse Mutagenesis with a Comprehensive Cre Characterization Resource. *Nature Communications* 3. doi: 10.1038/ncomms2186.
- Hegeman M A, Hennis M P, Meurs M van, Cobelens P M, Kavelaars A, Jansen N J, Schultz M J, van Vught A J, Molema G, Heijnen C J (2010): Angiopoietin-1 Treatment Reduces Inflammation but Does Not Prevent Ventilator-Induced Lung Injury. *PLoS ONE* 5 (12). doi: 10.1371/journal.pone.0015653.

- Hegen A, Koidl S, Weindel K, Marmé D, Augustin H G, Fiedler U (2004): Expression of Angiopoietin-2 in Endothelial Cells Is Controlled by Positive and Negative Regulatory Promoter Elements. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (10): 1803–9. doi: 10.1161/01.ATV.0000140819.81839.0e.
- Heijden M van der, Nieuw Amerongen G P van, Koolwijk P, Hinsbergh V W M van, Groeneveld a B J (2008): Angiopoietin-2, Permeability Oedema, Occurrence and Severity of ALI/ARDS in Septic and Non-Septic Critically Ill Patients. *Thorax* 63 (10): 903–9. doi: 10.1136/thx.2007.087387.
- Heine G, Drozdenko G, Grün J R, Chang H-D, Radbruch A, Worm M (2014): Autocrine IL-10 Promotes Human B-Cell Differentiation into IgM- or IgG-Secreting Plasmablasts. *European Journal of Immunology* 44 (6): 1615–21. doi: 10.1002/eji.201343822.
- Heiskanen-Kosma T, Korppi M, Jokinen C, Heinonen K (1997): Risk Factors for Community-Acquired Pneumonia in Children: A Population-Based Case-Control Study. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 29 (3): 281–85. doi: 10.3109/00365549709019043.
- Henrichsen J (1995): Six Newly Recognized Types of Streptococcus Pneumoniae. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*.33 (10): 2759–2762
- Herberman R B, Nunn M E, Lavrin D H (1975): Natural Cytotoxic Reactivity of Mouse Lymphoid Cells against Syngeneic and Allogeneic Tumors. I. Distribution of Reactivity and Specificity. *International Journal of Cancer* 16 (2): 216–29. doi: 10.1002/ijc.2910160204.
- Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman R M, Romani N, Schuler G (1996): Interleukin-12 Is Produced by Dendritic Cells and Mediates T Helper 1 Development as Well as Interferon- γ Production by T Helper 1 Cells. *European Journal of Immunology* 26 (3): 659–68. doi: 10.1002/eji.1830260323.
- Heyen J R R, Ye S M, Finck B N, Johnson R W (2000): Interleukin (IL)-10 Inhibits IL-6 Production in Microglia by Preventing Activation of NF- κ B. *Molecular Brain Research* 77 (1): 138–47. doi: 10.1016/S0169-328X(00)00042-5.
- Holash J, Maisonpierre P C, Compton D, Boland P, Alexander C R, Zagzag D, Yancopoulos G D, Wiegand S J (1999): Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF. *Science* 284 (5422): 1994–98. doi: 10.1126/science.284.5422.1994.
- Holmes A R, McNab R, Millsap K W, Rohde M, Hammerschmidt S, Mawdsley J L, Jenkinson H F (2001): The PavA Gene of Streptococcus Pneumoniae Encodes a Fibronectin-Binding Protein That Is Essential for Virulence. *Molecular Microbiology* 41 (6): 1395–1408. doi :10.1046/j.1365-2958.2001.02610.x.
- Horikawa K, Takatsu K (2006): Interleukin-5 Regulates Genes Involved in B-Cell Terminal Maturation. *Immunology* 0 (0): 060530020504002. doi: 10.1111/j.1365 2567.2006.02382.x.
- Hotchkiss R S, Swanson P E, Freeman B D, Tinsley K W, Cobb J P, Matuschak G M, Buchman T G, Karl I E (1999): Apoptotic Cell Death in Patients with Sepsis, Shock, and Multiple Organ Dysfunction. *Critical Care Medicine*. doi: 10.1097/00003246-199907000-00002.
- Houldsworth S, Andrew P W, Mitchell T J (1994): Pneumolysin Stimulates Production of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-1 Beta by Human Mononuclear Phagocytes. *Infection and Immunity* 62 (4): 1501–3.
- Hsu H E, Shutt K A, Moore M R, Beall B W, Bennett N M, Craig A S, Farley M M, et al.

- (2009): Effect of Pneumococcal Conjugate Vaccine on Pneumococcal Meningitis. *New England Journal of Medicine* 360 (3): 244–56. doi: 10.1056/NEJMoa0800836.
- Huang S, Paulauskis J D, Kobzik L (1992): Rat KC CDNA Cloning and MRNA Expression in Lung Macrophages and Fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184 (2): 922–29. doi: 10.1016/0006-291x(92)90679-f.
- Huang Y-Q, Li J-J, Hu L, Lee M, Karparkin S (2002): Thrombin Induces Increased Expression and Secretion of Angiopoietin-2 from Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Blood* 99 (5): 1646–50. doi: 10.1182/blood.v99.5.1646.
- Hughes D P, Marron M B, Brindle N P J (2003): The Antiinflammatory Endothelial Tyrosine Kinase Tie2 Interacts with a Novel Nuclear Factor-KB Inhibitor ABIN-2. *Circulation Research* 92 (6): 630–36. doi: 10.1161/01.RES.0000063422.38690.DC.
- Humphrey J H (1944): Hyaluronidase Production by Pneumococci. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 56 (2): 273–75. doi: 10.1002/path.1700560226.
- Hunter C A, Subauste C S, Van Cleave V H, Remington J S (1994): Production of Gamma Interferon by Natural Killer Cells from Toxoplasma Gondii-Infected SCID Mice: Regulation by Interleukin-10, Interleukin-12, and Tumor Necrosis Factor Alpha. *Infection and Immunity* 62 (7): 2818–24. doi: 10.1128/IAI.62.7.2818-2824.1994.
- Hutchins D, Cohen B B, Steel C M (1990): Production and Regulation of Interleukin 6 in Human B Lymphoid Cells. *European Journal of Immunology* 20 (5): 961–68. doi: 10.1002/eji.1830200503.
- Hyams C, Camberlein E, Cohen J M, Bax K, Brown J S (2010): The Streptococcus Pneumoniae Capsule Inhibits Complement Activity and Neutrophil Phagocytosis by Multiple Mechanisms. *Infection and Immunity* 78 (2): 704–15. doi: 10.1128/IAI.00881-09.
- Idell S, Koenig K B, Fair D S, Martin T R, McLarty J, Maunder R J (1991): Serial Abnormalities of Fibrin Turnover in Evolving Adult Respiratory Distress Syndrome. *The American Journal of Physiology* 261 (4 Pt 1): L240-8. doi: 10.1152/ajplung.1991.261.4.L240.
- Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, Pack M, et al. (1998): Efficient Presentation of Phagocytosed Cellular Fragments on the Major Histocompatibility Complex Class II Products of Dendritic Cells. *Journal of Experimental Medicine* 188 (11): 2163–73. doi: 10.1084/jem.188.11.2163.
- Ingulli E, Mondino A, Khoruts A, Jenkins M K (1997): In Vivo Detection of Dendritic Cell Antigen Presentation to CD4+ T Cells. *Journal of Experimental Medicine* 185 (12): 2133–41. doi: 10.1084/jem.185.12.2133.
- Irvin C G, Bates J H T (2003): Measuring the Lung Function in the Mouse: The Challenge of Size. *Respiratory Research* 4: 4. doi: 10.1186/rr199.
- Ishizaka T, De Bernardo R, Tomioka H, Lichtenstein L M, Ishizaka K (1972): Identification of Basophil Granulocytes as a Site of Allergic Histamine Release. *Journal of Immunology* 108 (4): 1000–1008.
- Ishizuka T, Okayama Y, Kobayashi H, Mori M (1999): Interleukin-10 Is Localized to and Released by Human Lung Mast Cells. *Clinical Experimental Allergy* 29 (10): 1424–32. doi: 10.1046/j.1365-2222.1999.00636.x.
- Iwaarden J F Van, Pikaar J C, Storm J, Brouwer E, Verhoef J, Oosting R S, Golde L M G van, Strijp J A G van (1994): Binding of Surfactant Protein A to the Lipid A Moiety of Bacterial Lipopolysaccharides. *Biochemical Journal* 303 (2): 407–11.

doi: 10.1042/bj3030407.

- Jamieson A M, Diefenbach A, McMahon C W, Xiong N, Carlyle J R, Raulet D H (2002): The Role of the NKG2D Immunoreceptor in Immune Cell Activation and Natural Killing. *Immunity* 17 (1): 19–29. doi :10.1016/S1074-7613(02)00333-3.
- Jho D, Mehta D, Ahmmed G, Gao X-P, Tiruppathi C, Broman M, Malik A B (2005): Angiopoietin-1 Opposes VEGF-Induced Increase in Endothelial Permeability by Inhibiting TRPC1-Dependent Ca²⁺ Influx. *Circulation Research* 96 (12): 1282–90. doi: 10.1161/01.RES.0000171894.03801.03.
- Jin L, Batra S, Douda D N, Palaniyar N, Jeyaseelan S (2014): CXCL1 Contributes to Host Defense in Polymicrobial Sepsis via Modulating T Cell and Neutrophil Functions. *The Journal of Immunology* 193 (7): 3549–58. doi: 10.4049/jimmunol.1401138.
- Jirik F R, Podor T J, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff D J, Carson D A, Lotz M (1989): Bacterial Lipopolysaccharide and Inflammatory Mediators Augment IL-6 Secretion by Human Endothelial Cells. *Journal of Immunology*. 142 (1): 144–47.
- Johansen M E, Johansson P I, Ostrowski S R, Bestle M H, Hein L, Jensen A L G, Soe-Jensen P, et al. (2015): Profound Endothelial Damage Predicts Impending Organ Failure and Death in Sepsis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 41 (1): 19–25. doi: 10.1055/s-0034-1398377.
- Junqueira L, Carneiro J (2005): Basic Histology: Text & Atlas ; 11. Ausgabe; New York: Mcgraw-Hill Professional - ISBN 9780071440912
- Kang K, Kubin M, Cooper K D, Lessin S R, Trinchieri G, Rook A H (1996): IL-12 Synthesis by Human Langerhans Cells. *Journal of Immunology*.156 (4): 1402–7.
- Kanno Y, Loewenstein W R (1964): Low-Resistance Coupling between Gland Cells. Some Observations on Intercellular Contact Membranes and Intercellular Space [30]. *Nature*. doi: 10.1038/201194a0.
- Karlhofer F M, Ribaldo R K, Yokoyama W M (1992): MHC Class I Alloantigen Specificity of Ly-49+ IL-2-Activated Natural Killer Cells. *Nature* 358 (6381): 66–70. doi: 10.1038/358066a0.
- Kärre K, Ljunggren H G, Piontek G, Kiessling R (1986): Selective Rejection of H-2-Deficient Lymphoma Variants Suggests Alternative Immune Defence Strategy. *Nature* 319 (6055): 675–78. doi: 10.1038/319675a0.
- Kayser F H, Deplazes P, Voll M, Buscher-Ehrt S, Böttger E C, Zinkernagel R M, Haller O, Eckert J (2010): *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie : Immunologie, Hygiene, Infektiologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie*; 12 Auflage; New York: Thieme - ISBN 978-3-13-444812-2.
- Khwaja A, Carver J E, Linch D C (1992): Interactions of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF), Granulocyte CSF, and Tumor Necrosis Factor Alpha in the Priming of the Neutrophil Respiratory Burst. *Blood* 79 (3): 745–53.
- Kidokoro A, Iba T, Fukunaga M, Yagi Y (1996): Alterations in Coagulation and Fibrinolysis during Sepsis. *Shock* 5 (3): 223–28. doi: 10.1097/00024382-199603000-00010.
- Kiessling R, Klein E, Wigzell H (1975): „Natural” Killer Cells in the Mouse. I. Cytotoxic Cells with Specificity for Mouse Moloney Leukemia Cells. Specificity and Distribution According to Genotype. *European Journal of Immunology* 5 (2): 112–17. doi: 10.1002/eji.1830050208.
- Kim I, Kim H G, Moon S O, Chae S W, So J N, Koh K N, Ahn B C, Koh G Y (2000):

- Angiopoietin-1 Induces Endothelial Cell Sprouting Through the Activation of Focal Adhesion Kinase and Plasmin Secretion. *Circulation Research* 86 (9):952-9. doi: 10.1161/01.res.86.9.952.
- Kim I, Moon S O, Sung K P, Soo W C, Gou Y K (2001): Angiopoietin-1 Reduces VEGF-Stimulated Leukocyte Adhesion to Endothelial Cells by Reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-Selectin Expression. *Circulation Research* 89 (6): 477-79. doi: 10.1161/hh1801.097034.
- Kim I, Oh J L, Ryu Y S, So J N, Sessa W C, Walsh K, Koh G Y (2002): Angiopoietin-1 Negatively Regulates Expression and Activity of Tissue Factor in Endothelial Cells. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (1): 126-28. doi: 10.1096/fj.01-0556fje.
- Kim M, Allen B, Korhonen E A, Nitschké M, Yang H W, Baluk P, Saharinen P, et al. (2016): Opposing Actions of Angiopoietin-2 on Tie2 Signaling and FOXO1 Activation. *Journal of Clinical Investigation* 126 (9): 3511-25. doi: 10.1172/JCI84871.
- Kim S R, Bae S K, Park H J, Kim M K, Kim K, Park S Y, Jang H O, et al. (2010): Thromboxane A2 Increases Endothelial Permeability through Upregulation of Interleukin-8. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397 (3): 413-19. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.106.
- King S J, Hippe K R, Weiser J N (2006): Deglycosylation of Human Glycoconjugates by the Sequential Activities of Exoglycosidases Expressed by *Streptococcus Pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 59 (3): 961-74. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04984.x.
- Kirchhofer D, Tschopp T B, Hadvary P, Baumgartner H R (1994): Endothelial Cells Stimulated with Tumor Necrosis Factor- α Express Varying Amounts of Tissue Factor Resulting in Inhomogenous Fibrin Deposition in a Native Blood Flow System. Effects of Thrombin Inhibitors. *Journal of Clinical Investigation* 93 (5): 2073-83. doi: 10.1172/JCI117202.
- Knaus W A, Sun X, Hakim R B, Wagner D P (1994): Evaluation of Definitions for Adult Respiratory Distress Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 150 (2): 311-17. doi: 10.1164/ajrccm.150.2.8049808.
- Knox A L, Brown N H (2002): Rap1 GTPase Regulation of Adherens Junction Positioning and Cell Adhesion. *Science* 295 (5558): 1285-88. doi: 10.1126/science.1067549.
- Kobayashi S D, Braughton K R, Whitney A R, Voyich J M, Schwan T G, Musser J M, DeLeo F R (2003): Bacterial Pathogens Modulate an Apoptosis Differentiation Program in Human Neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (19): 10948-53. doi: 10.1073/pnas.1833375100.
- Koch, Robert (2016): Empfehlungen Der Ständigen Impfkommision (STIKO) Am. doi: 10.17886/EpiBull-2016-051.4.
- Köhler A, De Filippo K, Hasenberg M, Brandt C van den, Nye E, Hosking M P, Lane T E, et al. (2011): G-CSF-Mediated Thrombopoietin Release Triggers Neutrophil Motility and Mobilization from Bone Marrow via Induction of Cxcr2 Ligands. *Blood* 117 (16): 4349-57. doi: 10.1182/blood-2010-09-308387.
- König H E, Liebich HG (2005): Anatomie Der Haussäugetiere : Lehrbuch Und Farbatlas Für Studium Und Praxis ; 3. Ausgabe; Stuttgart: Schattauer - ISBN 9783794526505
- Kopf M, Abel B, Gallimore A, Carroll M, Bachmann M F (2002): Complement Component C3 Promotes T-Cell Priming and Lung Migration to Control Acute Influenza Virus Infection. *Nature Medicine* 8 (4): 373-78. doi: 10.1038/nm0402-373.

- Korhonen E A, Lampinen A, Giri H, Anisimov A, Kim M, Allen B, Fang S, et al. (2016): Tie1 Controls Angiopoietin Function in Vascular Remodeling and Inflammation. *Journal of Clinical Investigation* 126 (9): 3495–3510. doi: 10.1172/JCI84923.
- Kosaka S, Tamauchi H, Terashima M, Maruyama H, Habu S, Kitasato H (2011): IL-10 Controls Th2-Type Cytokine Production and Eosinophil Infiltration in a Mouse Model of Allergic Airway Inflammation. *Immunobiology* 216 (7): 811–20. doi: 10.1016/j.imbio.2010.12.003.
- Koski C L, Ramm L E, Hammer C H, Mayer M M, Shin M L (1983): Cytolysis of Nucleated Cells by Complement: Cell Death Displays Multi-Hit Characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (12 I): 3816–20. doi: 10.1073/pnas.80.12.3816.
- Kralt D, Light B, Cheang M, MacNair T, Wiebe L, Limerick B, Sarsfield P, et al. (2009): Clinical Characteristics and Outcomes in Patients with Pulmonary Blastomycosis. *Mycopathologia* 167 (3): 115–24. doi:10.1007/s11046-008-9163-7.
- Kräutler N J, Suan D, Butt D, Bourne K, Hermes J R, Chan T D, Sundling C, et al. (2017): Differentiation of Germinal Center B Cells into Plasma Cells Is Initiated by High-Affinity Antigen and Completed by Tfh Cells. *Journal of Experimental Medicine* 214 (5): 1259–67. doi: 10.1084/jem.20161533.
- Krebs P, Barnes M J, Lampe K, Whitley K, Bahjat K S, Beutler B, Janssen E, Hoebe K (2009): NK Cell-Mediated Killing of Target Cells Triggers Robust Antigen-Specific T Cell-Mediated and Humoral Responses. *Blood* 113 (26): 6593–6602. doi: 10.1182/blood-2009-01-201467.
- Kunkel D, Kirchhoff D, Volkmer-Engert R, Radbruch A, Scheffold A (2003): Sensitive Visualization of Peptide Presentation in Vitro and Ex Vivo. *Cytometry* 54A (1): 19–26. doi: 10.1002/cyto.a.10055.
- Kupfer A, Swain S L, Janeway C A, Singer S J (1986): The Specific Direct Interaction of Helper T Cells and Antigen-Presenting B Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (16): 6080–83. doi: 10.1073/pnas.83.16.6080.
- Lampugnani M G, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco L P, Dejana E (1992): A Novel Endothelial-Specific Membrane Protein Is a Marker of Cell-Cell Contacts. *Journal of Cell Biology* 118 (6): 1511–22. doi: 10.1083/jcb.118.6.1511.
- Lancefield R C (1933): A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. *Journal of Experimental Medicine* 57 (4): 571–94. doi: 10.1084/jem.57.4.571.
- Lane P, Traunecker A, Hubele S, Inui S, Lanzavecchia A, Gray D (1992): Activated Human T Cells Express a Ligand for the Human B Cell-Associated Antigen CD40 Which Participates in T Cell-Dependent Activation of B Lymphocytes. *European Journal of Immunology* 22 (10): 2573–78. doi: 10.1002/eji.1830221016.
- Langer H, May A E, Bültmann A, Gawaz M (2005): ADAM15 Is an Adhesion Receptor for Platelet GPIIb-IIIa and Induces Platelet Activation. *Thrombosis and Haemostasis* 94 (3): 555–61. doi: 10.1160/TH04-12-0784.
- Law S K, Levine R P (1977): Interaction between the Third Complement Protein and Cell Surface Macromolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (7): 2701–5. doi: 10.1073/pnas.74.7.2701.
- Lebman D A, Coffman R L (1988): Interleukin 4 Causes Isotype Switching to IgE in T Cell-Stimulated Clonal B Cell Cultures. *Journal of Experimental Medicine* 168 (3): 853–62.

doi: 10.1084/jem.168.3.853.

- Lederman S, Yellin M J, Cleary A M, Pernis A, Inghirami G, Cohn L E, Covey L R, Lee J J, Rothman P, Chess L (1994): T-BAM/CD40-L on Helper T Lymphocytes Augments Lymphokine-Induced B Cell Ig Isotype Switch Recombination and Rescues B Cells from Programmed Cell Death. *Journal of Immunology*.152 (5): 2163–71.
- Lee J, Cacalano G, Camerato T, Toy K, Moore M W, Wood W I (1995): Chemokine Binding and Activities Mediated by the Mouse IL-8 Receptor. *Journal of Immunology*. 155 (4): 2158–64.
- Levy M M, Fink M P, Marshall J C, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal S M, Vincent J L, Ramsay G (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. In *Critical Care Medicine*, 31:1250–56. doi: 10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B.
- Li H, Sim T C, Alam R (1996): IL-13 Released by and Localized in Human Basophils. *Journal of Immunology*. 156 (12): 4833–38.
- Li J J, Huang Y Q, Basch R, Karparkin S (2001): Thrombin Induces the Release of Angiopoietin-1 from Platelets. *Thrombosis and Haemostasis* 85 (2): 204–6. doi: 01020204 [pii].
- Li X, Stankovic M, Bonder C S, Hahn C N, Parsons M, Pitson S M, Xia P, Proia R L, Vadas M A, Gamble J R (2008): Basal and Angiopoietin-1 Mediated Endothelial Permeability Is Regulated by Sphingosine Kinase-1. *Blood* 111 (7): 3489–97. doi: 10.1182/blood-2007-05-092148.
- Linder T E, Daniels R L, Lim D J, DeMaria T F (1994): Effect of Intranasal Inoculation of Streptococcus Pneumoniae on the Structure of the Surface Carbohydrates of the Chinchilla Eustachian Tube and Middle Ear Mucosa. *Microbial Pathogenesis* 16 (6): 435–41. doi: 10.1006/mpat.1994.1043.
- Linß W (1999): *Histologie : Zytologie, Allgemeine Histologie, Mikroskopische Anatomie*; Berlin; New York : De Gruyter - ISBN 3-11-014032-2
- Liu Q, Wang Y, Thorlacius H (2000): Dexamethasone Inhibits Tumor Necrosis Factor- α -Induced Expression of Macrophage Inflammatory Protein-2 and Adhesion of Neutrophils to Endothelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271 (2): 364–67. doi: 10.1006/bbrc.2000.2641.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lomas-Neira J, Venet F, Chung CS, Thakkar R, Heffernan D, Ayala A (2014): Neutrophil-endothelial interactions mediate angiopoietin-2-associated pulmonary endothelial cell dysfunction in indirect acute lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 50(1):193-200. doi: 10.1165/rcmb.2013-0148OC.
- Longphre M, Zhang L Y, Paquette N, Kleeberger S R (1996): PAF-Induced Airways Hyperreactivity Is Modulated by Mast Cells in Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 14 (5): 461–69. doi: 10.1165/ajrcmb.14.5.8624251.
- Mahon B P, Ryan M S, Griffin F, Mills K H G (1996): Interleukin-12 Is Produced by Macrophages in Response to Live or Killed Bordetella Pertussis and Enhances the Efficacy of an Acellular Pertussis Vaccine by Promoting Induction of Th1 Cells. *INFECTION AND IMMUNITY*. Dec;64(12):5295-301. doi: 10.1128/iai.64.12.5295-5301.
- Maisonpierre P C, Suri C, Jones P F, Bartunkova S, Wiegand S J, Radziejewski C, Compton

- D, et al. (1997): Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in Vivo Angiogenesis." *Science* 277 (5322): 55–60. doi: 10.1126/science.277.5322.55.
- Mammoto T, Parikh S M, Mammoto A, Gallagher D, Chan B, Mostoslavsky G, Ingber D E, Sukhatme V P (2007): Angiopoietin-1 Requires P190 RhoGAP to Protect against Vascular Leakage in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 282 (33): 23910–18. doi: 10.1074/jbc.M702169200.
- Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon T I, Bushkin Y, Davis D M, Strominger J L, Yewdell J W, Porgador A (2001): Recognition of Haemagglutinins on Virus-Infected Cells by NKp46 Activates Lysis by Human NK Cells. *Nature* 409 (6823): 1055–60. doi: 10.1038/35059110.
- Marcus A J, Broekman M J, Drosopoulos J H F, Islam N, Alyonycheva T N, Safier L B, Hajjar K A, et al. (1997): The Endothelial Cell Ecto-ADPase Responsible for Inhibition of Platelet Function Is CD39. *Journal of Clinical Investigation* 99 (6): 1351–60. doi: 10.1172/JCI119294.
- Martín-Fontecha A, Thomsen L L, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2004): Induced Recruitment of NK Cells to Lymph Nodes Provides IFN- γ for TH1 Priming. *Nature Immunology* 5 (12): 1260–65. doi :10.1038/ni1138.
- Matthay M A, Zimmerman G A (2005): Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome: Four Decades of Inquiry into Pathogenesis and Rational Management. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. doi: 10.1165/rcmb.F305.
- Mattila P, Majuri M L, Mattila P S, Renkonen R (1992): "TNF α -Induced Expression of Endothelial Adhesion Molecules, ICAM-1 and VCAM-1, Is Linked to Protein Kinase C Activation." *Scandinavian Journal of Immunology* 36 (2): 159–66. doi: 10.1111/j.1365-3083.1992.tb03087.x.
- Maus U, Rosseau S, Knies U, Seeger W, Lohmeyer J (1998): Expression of Pro-Inflammatory Cytokines by Flow-Sorted Alveolar Macrophages in Severe Pneumonia. *The European Respiratory Journal* 11 (3): 534–41.
- McBride JT (1992): Treatise on pulmonary toxicology: Comparative biology of the normal lung; Volume 1; Boca Raton, Florida: CRC Press - ISBN 0-8493-8839-2
- McCarter S D, Lai P F H, Suen R S, Stewart D J (2006): Regulation of Endothelin-1 by Angiopoietin-1: Implications for Inflammation. In *Experimental Biology and Medicine*, 231:985–91. doi: 10.3181/00379727-231-2310985.
- McCarter S D, Mei S H J, Lai P F H, Qiu W Z, Parker C H, Suen R S, Hood R D, et al. (2007): Cell-Based Angiopoietin-1 Gene Therapy for Acute Lung Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175 (10): 1014–26. doi: 10.1164/rccm.200609-1370OC.
- Meduri G U, Belenchia J M, Estes R J, Wunderink, El Torky M, Leeper K V (1991): Fibroproliferative Phase of ARDS; Clinical Findings and Effects of Corticosteroids. In *Chest*, 100:943–52. Elsevier. doi: 10.1378/chest.100.4.943.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C A (1997): A Human Homologue of the Drosophila Toll Protein Signals Activation of Adaptive Immunity. *Nature* 388 (6640): 394–97. doi: 10.1038/41131.
- Mehrotra P T, Donnelly R P, Wong S, Kanegane H, Geremew A, Mostowski H S, Furuke K, Siegel J P, Bloom E T (1998): Production of IL-10 by Human Natural Killer Cells Stimulated with IL-2 and/or IL-12. *The Journal of Immunology* 160 (6): 2637 LP – 2644.
- Mei S H J, McCarter S D, Deng Y, Parker C H, Liles W C, Stewart D J (2007): Prevention of

- LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice by Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Angiopoietin 1. *PLoS Medicine* 4 (9): e269. doi: 10.1371/journal.pmed.0040269.
- Mellroth P, Daniels R, Eberhardt A, Rönnlund D, Blom H, Widengren J, Normark S, Henriques-Normark B (2012): LytA, Major Autolysin of *Streptococcus Pneumoniae*, Requires Access to Nascent Peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry* 287 (14): 11018–29. doi: 10.1074/jbc.M111.318584.
- Menéndez R, Montull B, Reyes S, Amara-Elori I, Zalacain R, Capelastegui A, Aspa J, et al. (2016): Pneumonia Presenting with Organ Dysfunctions: Causative Microorganisms, Host Factors and Outcome. *Journal of Infection* 73 (5): 419–26. doi: 10.1016/j.jinf.2016.08.001.
- Mocellin S, Panelli M, Wang E, Rossi C R, Pilati P, Nitti D, Lise M, Marincola F M (2004): IL-10 Stimulatory Effects on Human NK Cells Explored by Gene Profile Analysis. *Genes and Immunity* 5 (8): 621–30. doi: 10.1038/sj.gene.6364135.
- Moisés J, Badía J R, Ferrer M, Gabamus A, Cilloniz C, Polverino E, Sellares J, Arnaro R, Torres A (2014): Acute Respiratory Distress Syndrome in Patients Admitted for Community-Acquired Pneumonia. *European Respiratory Journal* 44 (Suppl 58) P4894
- Mongardon N, Max A, Bouglé A, Pène F, Lemiale V, Charpentier J, Cariou A, Chiche J D, Bedos J P, Mira J P (2012): Epidemiology and Outcome of Severe Pneumococcal Pneumonia Admitted to Intensive Care Unit: A Multicenter Study. *Critical Care* 16 (4): 1–9. doi: 10.1186/cc11471.
- Montull B, Menéndez R, Torres A, Reyes S, Méndez R, Zalacain R, Capelastegui A, et al. (2016): Predictors of Severe Sepsis among Patients Hospitalized for Community-Acquired Pneumonia. *PLoS ONE* 11 (1). doi: 10.1371/journal.pone.0145929.
- Morinobu A, Kumagai S, Yanagida H, Ota H, Ishida H, Matsui M, Yodoi J, Nakao K (1996): IL-10 Suppresses Cell Surface CD23/Fc Epsilon RII Expression, Not by Enhancing Soluble CD23 Release, but by Reducing CD23 mRNA Expression in Human Monocytes. *Journal of Clinical Immunology* 16 (6): 326–33. doi: 10.1007/bf01541668.
- Moser B, Loetscher P (2001): Lymphocyte Traffic Control by Chemokines. *Nature Immunology* 2 (2):123-8. doi: 10.1038/84219.
- Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W, Giedlin M A, Coffman R L (1986): Two Types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins. *The Journal of Immunology* 136 (7): 2348 LP – 2357.
- Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K, Kishimoto T (1988): The Essential Role of B Cell Stimulatory Factor 2 (BSF-2/IL-6) for the Terminal Differentiation of B Cells. *Journal of Experimental Medicine* 167 (2): 332–44. doi: 10.1084/jem.167.2.332.
- Murdoch C, Tazzyman S, Webster S, Lewis C E (2007): Expression of Tie-2 by Human Monocytes and Their Responses to Angiopoietin-2. *The Journal of Immunology* 178 (11): 7405–11. doi: 10.4049/jimmunol.178.11.7405.
- Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C A (2012): *Janeway's Immunobiology*; 8th Edition; New York: Garland Science - ISBN 978-0815342434.
- Musher D M, Thorner A R (2014): Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med*. 2014 Oct 23;371(17):1619-28. doi: 10.1056/NEJMra1312885.
- Nandoskar M, Ferrante A, Bates E J, Hurst N, Paton J C (1986): Inhibition of Human Monocyte Respiratory Burst, Degranulation, Phospholipid Methylation and Bactericidal Activity by Pneumolysin. *Immunology* 59 (4): 515–20.

- Nauta A J, Daha M R, Tijmsa O, Water B van de, Tedesco F, Roos A (2002): The Membrane Attack Complex of Complement Induces Caspase Activation and Apoptosis." *European Journal of Immunology* 32 (3): 783–92. doi: 10.1002/1521-4141(200203)32:3<783::AID-IMMU783>3.0.CO;2-Q.
- Nelson A L, Roche A M, Gould J M, Chim K, Ratner A J, Weiser J N (2007): Capsule Enhances Pneumococcal Colonization by Limiting Mucus-Mediated Clearance. *Infection and Immunity* 75 (1): 83–90. doi: 10.1128/IAI.01475-06.
- Nieswandt B, Watson S P (2003): Platelet-Collagen Interaction: Is GPVI the Central Receptor? *Blood*. American Society of Hematology. doi: 10.1182/blood-2002-12-3882.
- Niiya K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziol J A, Plow E F, Ruggeri Z M (1987): Increased Surface Expression of the Membrane Glycoprotein IIb/IIIa Complex Induced by Platelet Activation. Relationship to the Binding of Fibrinogen and Platelet Aggregation. *Blood* 70 (2): 475–83. doi: 10.1182/blood.V70.2.475.475.
- Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda S (1999): Hypoxia and Vascular Endothelial Growth Factor Selectively up Regulate Angiopoietin-2 in Bovine Microvascular Endothelial Cell. *Journal of Biological Chemistry* 274 (22): 15732–39. doi: 10.1074/jbc.274.22.15732.
- Oka T, Mailliet M, Watt A J, Schwartz R J, Aronow B J, Duncan S A, Molkenin J D (2006): Cardiac-Specific Deletion of Gata4 Reveals Its Requirement for Hypertrophy, Compensation, and Myocyte Viability. *Circulation Research* 98 (6): 837–45. doi: 10.1161/01.RES.0000215985.18538.c4.
- Oliva A, Kinter A L, Vaccarezza M, Rubbert A, Catanzaro A, Moir S, Monaco J A, et al. (1998): Natural Killer Cells from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Individuals Are an Important Source of CC-Chemokines and Suppress HIV-1 Entry and Replication in Vitro. *Journal of Clinical Investigation* 102 (1): 223–31. doi: 10.1172/JCI2323.
- Opal S M, Kessler C M, Roemisch J, Knaub S (2002): Antithrombin, Heparin, and Heparan Sulfate. In *Critical Care Medicine*. Vol. 30. doi: 10.1097/00003246-200205001-00024.
- Opal S M, Garber G E, LaRosa S P, Maki D G, Freebairn R C, Kinasewitz G T, Dhainaut J F, et al. (2003): Systemic Host Responses in Severe Sepsis Analyzed by Causative Microorganism and Treatment Effects of Drotrecogin Alfa (Activated). *Clinical Infectious Diseases* 37 (1): 50–58. doi: 10.1086/375593.
- Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S, Miyazaki S (1996): Involvement of Fas Ligand and Fas-Mediated Pathway in the Cytotoxicity of Human Natural Killer Cells. *Journal of Immunology* 157 (7): 2909–15.
- Osuchowski M F, Welch K, Siddiqui J, Remick D G (2006): Circulating Cytokine/Inhibitor Profiles Reshape the Understanding of the SIRS/CARS Continuum in Sepsis and Predict Mortality. *The Journal of Immunology* 177 (3): 1967–74. doi: 10.4049/jimmunol.177.3.1967.
- Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Honda Y (2001): Angiotensin II Induces Expression of the Tie2 Receptor Ligand, Angiopoietin-2, in Bovine Retinal Endothelial Cells. *Diabetes* 50 (4): 867–75. doi: 10.2337/diabetes.50.4.867.
- Owen W F, Soberman R J, Yoshimoto T, Sheffer A L, Lewis R A, Austen K F (1987): Synthesis and Release of Leukotriene C4 by Human Eosinophils. *Journal of Immunology* 138 (2): 532–38.
- Pachon J, Prados M D, Capote F, Cuello J A, Garnacho J, Verano A (2012): Severe Community-Acquired Pneumonia: Etiology, Prognosis, and Treatment. *Am Rev Respir*

- Dis. 1990 Aug;142(2):369-73. doi: 10.1164/ajrccm/142.2.369.
- Page M J, Bester J, Pretorius E (2018): The Inflammatory Effects of TNF- α and Complement Component 3 on Coagulation. *Scientific Reports* 8 (1): 1–9. doi: 10.1038/s41598-018-20220-8.
- Panesar N, Tolman K, Mazuski J E (1999): Endotoxin Stimulates Hepatocyte Interleukin-6 Production. *Journal of Surgical Research* 85 (2): 251–58. doi: 10.1006/jsre.1999.5648.
- Papadimitriou E, Manolopoulos V G, Hayman G T, Maragoudakis M E, Unsworth B R, Fenton J W, Lelkes P I (1997): Thrombin Modulates Vectorial Secretion of Extracellular Matrix Proteins in Cultured Endothelial Cells. *The American Journal of Physiology* 272 (4 Pt 1): C1112-22. doi: 10.1152/ajpcell.1997.272.4.C1112.
- Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb R G, O'Connor D S, Li F, Altieri D C, Sessa W C (2000): Angiopoietin-1 Inhibits Endothelial Cell Apoptosis via the Akt/Survivin Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 275 (13): 9102–5. doi: 10.1074/jbc.275.13.9102.
- Pappenheimer J R, Renkin E M, Borrero L M (1951): Filtration, Diffusion and Molecular Sieving through Peripheral Capillary Membranes; a Contribution to the Pore Theory of Capillary Permeability. *The American Journal of Physiology* 167 (1): 13–46. doi: 10.1152/ajplegacy.1951.167.1.13.
- Parikh S M, Mammoto T, Schultz A, Yuan H T, Christiani D, Karumanchi S A, Sukhatme V P (2006): Excess Circulating Angiopoietin-2 May Contribute to Pulmonary Vascular Leak in Sepsis in Humans. *PLoS Medicine* 3 (3): 356–70. doi: 10.1371/journal.pmed.0030046.
- Park H, Li Z, Yang X O, Chang S H, Nurieva R, Wang Y H, Wang Y, et al. (2005): A Distinct Lineage of CD4 T Cells Regulates Tissue Inflammation by Producing Interleukin 17. *Nature Immunology* 6 (11): 1133–41. doi: 10.1038/ni1261.
- Park S W, Yun J H, Kim J H, Kim K W, Cho C H, Kim J H (2014): Angiopoietin 2 Induces Pericyte Apoptosis via A3 β 1 Integrin Signaling in Diabetic Retinopathy. *Diabetes* 63 (9): 3057–68. doi: 10.2337/db13-1942.
- Partanen J, Armstrong E, Mäkelä T P, Korhonen J, Sandberg M, Renkonen R, Knuutila S, Huebner K, Alitalo K (1992): A Novel Endothelial Cell Surface Receptor Tyrosine Kinase with Extracellular Epidermal Growth Factor Homology Domains. *Molecular and Cellular Biology* 12 (4): 1698–1707. doi: 10.1128/mcb.12.4.1698.
- Patan, S (1998) "TIE1 and TIE2 Receptor Tyrosine Kinases Inversely Regulate Embryonic Angiogenesis by the Mechanism of Intussusceptive Microvascular Growth." *Microvascular Research* 56 (1): 1–21. doi: 10.1006/mvre.1998.2081.
- Paton J C, Ferrante A (1983): Inhibition of Human Polymorphonuclear Leukocyte Respiratory Burst, Bactericidal Activity, and Migration by Pneumolysin. *Infection and Immunity* 41 (3): 1212–16. doi: 10.1128/iai.41.3.1212-1216.1983.
- Paton J C, Kelly B R, Ferrante A (1984): Activation of Human Complement by the Pneumococcal Toxin Pneumolysin. *Infection and Immunity* 43 (3): 1085–87. doi: 10.1128/iai.43.3.1085-1087.1984.
- Paya C V, Kenmotsu N, Schoon R A, Leibson P J (1988): Tumor Necrosis Factor and Lymphotoxin Secretion by Human Natural Killer Cells Leads to Antiviral Cytotoxicity. *Journal of Immunology*.141 (6): 1989–95.
- Peake J L, Pinkerton K E (2015): Gross and Subgross Anatomy of Lungs, Pleura, Connective Tissue Septa, Distal Airways, and Structural Units. In *Comparative Biology*

- of the Normal Lung: Second Edition*, 21–31. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-404577-4.00003-5.
- Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M (1990): A Nonsecretable Cell Surface Mutant of Tumor Necrosis Factor (TNF) Kills by Cell-to-Cell Contact. *Cell* 63 (2): 251–58. doi: 10.1016/0092-8674(90)90158-b.
- Peters P J, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, Slot J W, Geuze H J (1991): Cytotoxic T Lymphocyte Granules Are Secretory Lysosomes, Containing Both Perforin and Granzymes. *Journal of Experimental Medicine* 173 (5): 1099–1109. doi: 10.1084/jem.173.5.1099.
- Petrache I, Birukova A, Ramirez S I, Garcia J G N, Verin A D (2003): The Role of the Microtubules in Tumor Necrosis Factor- α -Induced Endothelial Cell Permeability. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 28 (5): 574–81. doi: 10.1165/rcmb.2002-0075OC.
- Pizurki L, Zhou Z, Glynos K, Roussos C, Papapetropoulos A (2003): Angiopoietin-1 Inhibits Endothelial Permeability, Neutrophil Adherence and IL-8 Production. *British Journal of Pharmacology* 139 (2): 329–36. doi:10.1038/sj.bjp.0705259.
- Podack E R, Esser A F, Biesecker G, Muller-Eberhard H J (1980): Membrane Attack Complex of Complement. A Structural Analysis of Its Assembly. *Journal of Experimental Medicine* 151 (2): 301–13. doi: 10.1084/jem.151.2.301.
- Podlaski F J, Nanduri V B, Hulmes J D, Pan Y C E, Levin W, Danho W, Chizzonite R, Gately M K, Stern A S (1992): Molecular Characterization of Interleukin 12. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 294 (1): 230–37. doi: 10.1016/0003-9861(92)90162-P.
- Ponnuraj K, Jedrzejewski M J (2000): Mechanism of Hyaluronan Binding and Degradation: Structure of Streptococcus Pneumoniae Hyaluronate Lyase in Complex with Hyaluronic Acid Disaccharide at 1.7 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* 299 (4): 885–95. doi: 10.1006/jmbi.2000.3817.
- Pratt P C, Vollmer R T, Shelburne J D, Crapo J D (1979): Pulmonary Morphology in a Multihospital Collaborative Extracorporeal Membrane Oxygenation Project. I. Light Microscopy. *The American Journal of Pathology* 95 (1): 191.
- Prete G Del, Carli M De, Almerigogna F, Giudizi M G, Biagiotti R, Romagnani S (1993): Human IL-10 Is Produced by Both Type 1 Helper (Th1) and Type 2 Helper (Th2) T Cell Clones and Inhibits Their Antigen-Specific Proliferation and Cytokine Production. *Journal of Immunology* 150 (2): 353–60.
- Pross H F, Jondal M (1975): Cytotoxic Lymphocytes from Normal Donors. A Functional Marker of Human Non-T Lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology* 21 (2): 226–35.
- Puchelle E, Zahm J M, Girard F, Bertrand A, Polu J M, Aug F, Sadoul P (1980): Mucociliary Transport in Vivo and in Vitro. Relations to Sputum Properties in Chronic Bronchitis. *European Journal of Respiratory Diseases* 61 (5): 254–64..
- Puri M C, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J (1995): The Receptor Tyrosine Kinase TIE Is Required for Integrity and Survival of Vascular Endothelial Cells. *The EMBO Journal* 14 (23): 5884–91. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00276.x.
- Qiao H, Andrade M V, Lisboa F A, Morgan K, Beaven M A (2006): Fc ϵ R1 and Toll-like Receptors Mediate Synergistic Signals to Markedly Augment Production of Inflammatory Cytokines in Murine Mast Cells. *Blood* 107 (2): 610–18. doi: 10.1182/blood-2005-06-2271.

- Ranieri V M, Rubenfeld G D, Thompson B T, Ferguson N D, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky A S (2012): Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 307 (23): 2526–33. doi: 10.1001/jama.2012.5669.
- Ranta V, Orpana A, Carpén O, Turpeinen U, Ylikorkala O, Viinikka L (1999): Human Vascular Endothelial Cells Produce Tumor Necrosis Factor- α in Response to Proinflammatory Cytokine Stimulation. *Critical Care Medicine* 27 (10): 2184–87. doi: 10.1097/00003246-199910000-00019.
- Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, Porat N, Shainberg B, Pinco E, Keller N, Rubinstein E. (2004): Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus Pneumoniae* by Adults and Children in Community and Family Settings. *Clinical Infectious Diseases* 38 (5): 632–39. doi: 10.1086/381547.
- Ren B, Szalai A J, Hollingshead S K, Briles D E (2004): Effects of PspA and Antibodies to PspA on Activation and Deposition of Complement on the Pneumococcal Surface. *Infection and Immunity* 72 (1): 114–22. doi: 10.1128/IAI.72.1.114-122.2004.
- Richter J, Andersson T, Olsson I (1989): Effect of Tumor Necrosis Factor and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor on Neutrophil Degranulation. *Journal of Immunology*. 142 (9): 3199–3205.
- Rieger C, Hardt H von der, Sennhauser F H, Wahn U, Zach M S (2004): *Pädiatrische Pneumologie*; 2 Auflage; Berlin: Springer Verlag - ISBN 9783540436270
- Rijneveld A W, Weijer S, Bresser P, Florquin S, Vlasuk G P, Rote W E, Spek C A, et al. (2006): Local Activation of the Tissue Factor-Factor VIIa Pathway in Patients with Pneumonia and the Effect of Inhibition of This Pathway in Murine Pneumococcal Pneumonia. *Critical Care Medicine* 34 (6): 1725–30. doi: 10.1097/01.CCM.0000218807.20570.C2.
- Rougier F, Cornu E, Praloran V, Denizot Y (1998): IL-6 and IL-8 Production by Human Bone Marrow Stromal Cells. *Cytokine* 10 (2): 93–97. doi: 10.1006/cyto.1997.0262.
- Roussel L, Houle F, Chan C, Yao Y, Bérubé J, Olivenstein R, Martin J G, et al. (2010): IL-17 Promotes P38 MAPK-Dependent Endothelial Activation Enhancing Neutrophil Recruitment to Sites of Inflammation. *The Journal of Immunology* 184 (8): 4531–37. doi: 10.4049/jimmunol.0903162.
- Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu D H, Kastelein R, Moore K W, Banchereau J (1992): Interleukin 10 Is a Potent Growth and Differentiation Factor for Activated Human B Lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (5): 1890–93. doi: 10.1073/pnas.89.5.1890.
- Rozenbaum M H, Pechlivanoglou P, Werf T S van der, Lo-Ten-Foe J R, Postma M J, Hak E (2013): The Role of *Streptococcus Pneumoniae* in Community-Acquired Pneumonia among Adults in Europe: A Meta-Analysis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. doi: 10.1007/s10096-012-1778-4.
- Rubins J B, Duane P G, Charboneau D, Janoff E N (1992): Toxicity of Pneumolysin to Pulmonary Endothelial Cells in Vitro. *Infection and Immunity* 60 (5): 1740.
- Rubins J B, Duane P G, Clawson D, Charboneau D, Young J, Niewoehner D E (1993): Toxicity of Pneumolysin to Pulmonary Alveolar Epithelial Cells. *Infection and Immunity* 61 (4): 1352–58.
- Russell, W.M.S., and R.L. Burch. 1960. "The Principles of Humane Experimental Technique." *Medical Journal of Australia* 1 (13): 500–500. doi: 10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x.

- Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser M A, Lochnit G, Barreto G, Galuska S P, Lohmeyer J, Preissner K T (2012): Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLoS ONE* 7 (2). doi: 10.1371/journal.pone.0032366.
- Saharinen P, Eklund L, Miettinen J, Wirkkala R, Anisimov A, Winderlich M, Nottebaum A, et al. (2008): Angiopoietins Assemble Distinct Tie2 Signalling Complexes in Endothelial Cell-Cell and Cell-Matrix Contacts. *Nature Cell Biology* 10 (5): 527–37. doi: 10.1038/ncb1715.
- Sakihama T, Smolyar A, Reinherz E L (1995): Molecular Recognition of Antigen Involves Lattice Formation between CD4, MHC Class II and TCR Molecules. *Immunology Today* 16 (12): 581–87. doi: 10.1016/0167-5699(95)80081-6.
- Salyer J L, Bohnsack J F, Knape W A, Shigeoka A O, Ashwood E R, Hill H R (1990): Mechanisms of Tumor Necrosis Factor-Alpha Alteration of PMN Adhesion and Migration. *The American Journal of Pathology* 136 (4): 831–41..
- Sanctis J B De, Blanca I, Bianco N E (1997): Secretion of Cytokines by Natural Killer Cells Primed with Interleukin-2 and Stimulated with Different Lipoproteins. *Immunology* 90 (4): 526–33. doi: 10.1046/j.1365-2567.1997.00174.x.
- Sandlesh P, Juang T, Safina A, Higgins M J, Gurova K V (2018): Uncovering the Fine Print of the CreERT2-LoxP System While Generating a Conditional Knockout Mouse Model of Ssrp1 Gene. *PLoS ONE* 13 (6). doi: 10.1371/journal.pone.0199785.
- Sándor M, Pap D, Prechl J, Erdei A, Bajtay Z (2009): A Novel, Complement-Mediated Way to Enhance the Interplay between Macrophages, Dendritic Cells and T Lymphocytes. *Molecular Immunology* 47 (2–3): 438–48. doi: 10.1016/j.molimm.2009.08.025.
- Sanin D E, Prendergast C T, Mountford A P (2015): IL-10 Production in Macrophages Is Regulated by a TLR-Driven CREB-Mediated Mechanism That Is Linked to Genes Involved in Cell Metabolism. *The Journal of Immunology* 195 (3): 1218–32. doi: 10.4049/jimmunol.1500146.
- Santin A D, Hermonat P L, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Roman J J, Parham G P, Cannon M J (2000): Interleukin-10 Increases Th1 Cytokine Production and Cytotoxic Potential in Human Papillomavirus-Specific CD8+ Cytotoxic T Lymphocytes. *Journal of Virology* 74 (10): 4729–37. doi: 10.1128/JVI.74.10.4729-4737.2000.
- Sato S, Kishikawa T (2001): Ultrastructural Study of the Alveolar Lining and the Bronchial Mucus Layer by Block Staining with Oolong Tea Extract: The Role of Various Surfactant Materials. *Medical Electron Microscopy* 34 (2): 142–51. doi: 10.1007/s007950170008.
- Sato T N, Qin Y, Kozak C A, Audus K L (1993): Tie-1 and Tie-2 Define Another Class of Putative Receptor Tyrosine Kinase Genes Expressed in Early Embryonic Vascular System. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (20): 9355–58. doi: 10.1073/pnas.90.20.9355.
- Sato T N, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg Buchholz K, Yuko Fujiwara, Gendron Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y (1995): Distinct Roles of the Receptor Tyrosine Kinases Tie-1 and Tie-2 in Blood Vessel Formation. *Nature*. doi: 10.1038/376070a0.
- Satoguina J S, Weyand E, Larbi J, Hoerauf A (2005): T Regulatory-1 Cells Induce IgG4 Production by B Cells: Role of IL-10. *The Journal of Immunology* 174 (8): 4718–26. doi: 10.4049/jimmunol.174.8.4718.
- Saunders T L (2011): Inducible Transgenic Mouse Models. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 693: 103–15. doi: 10.1007/978-1-60761-974-1_7.

- Savant S, La Porta S, Budnik A, Busch K, Hu J, Tisch N, Korn C, et al. (2015): The Orphan Receptor Tie1 Controls Angiogenesis and Vascular Remodeling by Differentially Regulating Tie2 in Tip and Stalk Cells. *Cell Reports* 12 (11): 1761–73. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.024.
- Sawant K V, Xu R, Cox R, Hawkins H, Sbrana E, Kolli D, Garofalo R P, Rajarathnam K (2015): Chemokine CXCL1-Mediated Neutrophil Trafficking in the Lung: Role of CXCR2 Activation. *Journal of Innate Immunity* 7 (6): 647–58. doi: 10.1159/000430914.
- Sawant K V, Poluri K M, Dutta A K, Sepuru K M, Troshkina A, Garofalo R P, Rajarathnam K (2016): Chemokine CXCL1 Mediated Neutrophil Recruitment: Role of Glycosaminoglycan Interactions. *Scientific Reports* 6 (September). doi: 10.1038/srep33123.
- Scapini P, Carletto A, Nardelli B, Calzetti F, Roschke V, Merigo F, Tamassia N, et al. (2005): Proinflammatory Mediators Elicit Secretion of the Intracellular B-Lymphocyte Stimulator Pool (BLyS) That Is Stored in Activated Neutrophils: Implications for Inflammatory Diseases. *Blood* 105 (2): 830–37. doi: 10.1182/blood-2004-02-0564.
- Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin H G (2005): The Tie-2 Ligand Angiopoietin-2 Destabilizes Quiescent Endothelium through an Internal Autocrine Loop Mechanism. *Journal of Cell Science* 118 (4): 771–80. doi: 10.1242/jcs.01653.
- Scharton-Kersten T, Afonso L C, Wsocka M, Trinchieri, Scott P (1995): IL-12 Is Required for Natural Killer Cell Activation and Subsequent T Helper 1 Cell Development in Experimental Leishmaniasis. *Journal of Immunology* 154 (10): 5320–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7730635>.
- Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark S C, Dinarello C A (1990): Correlations and Interactions in the Production of Interleukin-6 (IL-6), IL-1, and Tumor Necrosis Factor (TNF) in Human Blood Mononuclear Cells: IL-6 Suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75 (1): 40–47. doi: 10.1182/blood.v75.1.40.bloodjournal75140.
- Schleimer R P, Macglashan D W, Peters S P, Pinckard R N, Adkinson N F, Lichtenstein L M (1986): Characterization of Inflammatory Mediator Release from Purified Human Lung Mast Cells. *American Review of Respiratory Disease* 133 (4): 614–17. doi: 10.1164/arrd.1986.133.4.614.
- Schnitzer J E, Oh P (1994): Albondin-Mediated Capillary Permeability to Albumin. Differential Role of Receptors in Endothelial Transcytosis and Endocytosis of Native and Modified Albumins. *Journal of Biological Chemistry* 269 (8): 6072–82.
- Schnurch H, Risau W (1993): Expression of Tie-2, a Member of a Novel Family of Receptor Tyrosine Kinases, in the Endothelial Cell Lineage. *Development* 119 (3): 957–68.
- Schröter M, Lowin B, Borner C, Tschopp J (1995): Regulation of Fas(Apo-1/CD95)- and Perforin-mediated Lytic Pathways of Primary Cytotoxic T Lymphocytes by the Protooncogene bcl-2. *European Journal of Immunology* 25 (12): 3509–13. doi: 10.1002/eji.1830251245.
- Schultze J L, Michalak S, Lowne J, Wong A, Gilleece M H, Gribben J G, Nadler L M (1999): Human Non-Germinal Center B Cell Interleukin (IL)-12 Production Is Primarily Regulated by T Cell Signals CD40 Ligand, Interferon γ , and IL-10: Role of B Cells in the Maintenance of T Cell Responses. *Journal of Experimental Medicine* 189 (1): 1–11. doi: 10.1084/jem.189.1.1.
- Seeger W, Stohr G, Wolf H R D, Neuhof H (1985): Alteration of Surfactant Function Due to Protein Leakage: Special Interaction with Fibrin Monomer. *Journal of Applied Physiology* 58 (2): 326–38. doi: 10.1152/jappl.1985.58.2.326.

- Serrano I, Melo-Cristino J, Ramirez M (2006): Heterogeneity of Pneumococcal Phase Variants in Invasive Human Infections. *BMC Microbiology* 6 (July). doi: 10.1186/1471-2180-6-67.
- Sertl K, Takemura T, Tschachler F, Ferrans V J, Kaliner M A, Shevach E M (1986): Dendritic Cells with Antigen-Presenting Capability Reside in Airway Epithelium, Lung Parenchyma, and Visceral Pleura. *Journal of Experimental Medicine* 163 (2): 436–51. doi: 10.1084/jem.163.2.436.
- Shimamura K, Oka K, Nakazawa M, Kojima M (1983): Distribution Patterns of Microthrombi in Disseminated Intravascular Coagulation. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 107 (10): 543–47.
- Shin D I, Banning U, Kim Y M, Verheyen J, Hannen M, Bönig H, Körholz D (1999): Interleukin 10 Inhibits TNF-Alpha Production in Human Monocytes Independently of Interleukin 12 and Interleukin 1 Beta. *Immunological Investigations* 28 (2–3): 165–75. doi: 10.3109/08820139909061145.
- Silverthorn Unglaub D (2013): *Human Physiology an Integrated Approach 6th Edition*. Pearson. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Simionescu, N (1981): Transcytosis and Traffic of Membranes in the Endothelial Cell. In *International Cell Biology 1980–1981*, 657–72. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-67916-2_73.
- Simpson S Q, Singh R, Bice D E (1994): Heat-Killed Pneumococci and Pneumococcal Capsular Polysaccharides Stimulate Tumor Necrosis Factor-Alpha Production by Murine Macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 10 (3): 284–89. doi: 10.1165/ajrcmb.10.3.8117447.
- Singer M, Deutschman C S, Seymour C W, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, et al. (2016): The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association. doi: 10.1001/jama.2016.0287.
- Siré J, Sareneva T, Pirhonen J, Strengell M, Veckman V, Julkunen I, Matikainen S (2004): Cytokine and Contact-Dependent Activation of Natural Killer Cells by Influenza A or Sendai Virus-Infected Macrophages. *Microbiologyresearch.Org* 85 (8): 2357–64. doi: 10.1099/vir.0.80105-0.
- Sitrin, R G, Pan P M, Srikanth S, Todd R F (1998): Fibrinogen Activates NF-Kappa B Transcription Factors in Mononuclear Phagocytes. *Journal of Immunology*. 161 (3): 1462–70. PM 9686612.
- Smith K A, Maizels R M (2014): IL-6 Controls Susceptibility to Helminth Infection by Impeding Th2 Responsiveness and Altering the Treg Phenotype in Vivo. *European Journal of Immunology* 44 (1): 150–61. doi: 10.1002/eji.201343746.
- Smith T J, Ducharme L A, Weis K H (1994): Preferential Expression of Interleukin-12 or Interleukin-4 by Murine Bone Marrow Mast Cells Derived in Mast Cell Growth Factor or Interleukin-3. *European Journal of Immunology* 24 (4): 822–26. doi: 10.1002/eji.1830240408.
- So R K, Kyung S L, Seoung J P, Kyung H M, Ka Y L, Yeong H C, Sang H H, Gou Y K, Yong C L (2008): Angiopoietin-1 Variant, COMP-Ang1 Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Acute Lung Injury. *Experimental and Molecular Medicine* 40 (3): 320–31. doi: 10.3858/emm.2008.40.3.320.
- Sorensen U B S, Blom J, Birch-Andersen A, Henrichsen J (1988): Ultrastructural Localization of Capsules, Cell Wall Polysaccharide, Cell Wall Proteins, and F Antigen in

- Pneumococci. *Infection and Immunity* 56 (8): 1890–96.
doi: 10.1128/iai.56.8.1890-1896.1988.
- Spreer A, Kerstan H, Böttcher T, Gerber J, Siemer A, Zysk G, Mitchell T J, Eiffert H, Nau R (2003): Reduced Release of Pneumolysin by *Streptococcus Pneumoniae* in Vitro and in Vivo after Treatment with Nonbacteriolytic Antibiotics in Comparison to Ceftriaxone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (8): 2649–54.
doi: 10.1128/aac.47.8.2649-2654.2003.
- Stern D, Nawroth P, Handley D, Kisiel W (1985): An Endothelial Cell-Dependent Pathway of Coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (8): 2523–27. doi: 10.1073/pnas.82.8.2523.
- Stiehl T, Thamm K, Kaufmann J, Schaeper U, Kirsch T, Haller H, Santel A, Ghosh C C, Parikh S M, David S (2014): Lung-Targeted RNA Interference Against Angiopoietin-2 Ameliorates Multiple Organ Dysfunction and Death in Sepsis. *Critical Care Medicine* 42 (10): 654–662. doi: 10.1097/CCM.0000000000000524
- Strieter R M, Polverini P J, Kunkel S L, Arenberg D A, Burdick M D, Kasper J, Dzuiba J, et al. (1995): The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-Mediated Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 270 (45): 27348–57.
doi: 10.1074/jbc.270.45.27348.
- Sun S, Sursal T, Adibnia Y, Zhao C, Zheng Y, Li H, Otterbein L E, Hauser C J, Itagaki K (2013): Mitochondrial DAMPs Increase Endothelial Permeability through Neutrophil Dependent and Independent Pathways. *PLoS ONE* 8 (3).
doi: 10.1371/journal.pone.0059989.
- Suri C, Jones P F, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre P C, Davis S, Sato T N, Yancopoulos G D (1996): Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis. *Cell* 87 (7): 1171–80.
doi: 10.1016/S0092-8674(00)81813-9.
- Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald D M, Zhou H, Oldmixon E H, Sato T N, Yancopoulos G D (1998): Increased Vascularization in Mice Overexpressing Angiopoietin-1. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.282.5388.468>.
- Tannenbaum C S, Major J A, Poptic E J, DiCorleto P E, Hamilton T A (1990): Lipopolysaccharide Induces Competence Genes JE and KC in Balb/C 3T3 Cells. *Journal of Cellular Physiology* 144 (1): 77–83. doi: 10.1002/jcp.1041440111.
- Thille A W, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodriguez J M, Aramburu J A, Vargas-Errázuriz P, Martín-Pellicer A, Lorente J A, Frutos-Vivar F (2013): Chronology of Histological Lesions in Acute Respiratory Distress Syndrome with Diff Use Alveolar Damage: A Prospective Cohort Study of Clinical Autopsies. *The Lancet Respiratory Medicine* 1 (5): 395–401. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70053-5.
- Thomassen M J, Divis L T, Fisher C J (1996): Regulation of Human Alveolar Macrophage Inflammatory Cytokine Production by Interleukin-10. *Clinical Immunology and Immunopathology* 80 (3 II): 321–24. doi: 10.1006/clin.1996.0130.
- Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato T N, Yancopoulos G D, McDonald D M (1999): Leakage-Resistant Blood Vessels in Mice Transgenically Overexpressing Angiopoietin-1. *Science* 286 (5449): 2511–14. doi: 10.1126/science.286.5449.2511.
- Thurston G, Rudge JS S, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll S D, Glazer N, Holash J, McDonald D M, Yancopoulos G D (2000): Angiopoietin-1 Protects the Adult Vasculature against Plasma Leakage. *Nature Medicine* 6 (4): 4–7. doi: 10.1038/74725.
- Thurston G, Daly C (2012): The Complex Role of Angiopoietin-2 in the Angiopoietin-Tie

- Signaling Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (9). doi: 10.1101/cshperspect.a006650.
- Tiku K, Tiku M L, Skosey J L (1986): Interleukin 1 Production by Human Polymorphonuclear Neutrophils. *The Journal of Immunology* 136 (10): 3677 LP – 3685.
- Tilley S J, Orlova E V, Gilbert R J C, Andrew P W, Saibil H R (2005): Structural Basis of Pore Formation by the Bacterial Toxin Pneumolysin. *Cell* 121 (2): 247–56. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.033.
- Tomlinson S, Taylor P W, Morgan B P, Luzio J P (1989): Killing of Gram-Negative Bacteria by Complement. Fractionation of Cell Membranes after Complement C5b-9 Deposition on to the Surface of Salmonella Minnesota Re595. *Biochemical Journal* 263 (2): 505–11. doi: 10.1042/bj2630505.
- Torres A (2014): Community-Acquired Pneumonia: Changing Paradigms about Mortality. *Community Acquired Infection* 1 (1): 1. doi: 10.4103/2225-6482.141744.
- Tracey K J, Fong Y, Hesse D G, Manogue K R, Lee A T, Kuo G C, Lowry S F, Cerami A (1987): Anti-Cachectin/TNF Monoclonal Antibodies Prevent Septic Shock during Lethal Bacteraemia. *Nature* 330 (6149): 662–64. doi: 10.1038/330662a0.
- Trapani J A (1995): Target Cell Apoptosis Induced by Cytotoxic T Cells and Natural Killer Cells Involves Synergy between the Pore-Forming Protein, Perforin, and the Serine Protease, Granzyme B. *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 25 (6): 793–99. doi: 10.1111/j.1445-5994.1995.tb02883.x.
- Turner M D, Nedjai B, Hurst T, Pennington D J (2014): Cytokines and Chemokines: At the Crossroads of Cell Signalling and Inflammatory Disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.
- Umeda N, Kachi S, Akiyama H, Zahn G, Vossmeier D, Stragies R, Campochiaro P A (2006): Suppression and Regression of Choroidal Neovascularization by Systemic Administration of an A5 β 1 Integrin Antagonist. *Molecular Pharmacology* 69 (6): 1820–28. doi: 10.1124/mol.105.020941.
- Underhill D M, Ozinsky A, Hajjar A M, Stevens A, Wilson C B, Bassetti M, Aderem A (1999): The Toll-like Receptor 2 Is Recruited to Macrophage Phagosomes and Discriminates between Pathogens. *Nature* 401 (6755): 811–15. doi: 10.1038/44605.
- Urashima M, Chauhan D, Hatziyanni M, Ogata A, Hollenbaugh D, Aruffo A, Anderson K C (1996): CD40 Ligand Triggers Interleukin-6 Mediated B Cell Differentiation. *Leukemia Research* 20 (6): 507–15. doi: 10.1016/0145-2126(95)00098-4.
- Valdivia L, Nix D, Wright M, Lindberg E, Fagan T, Lieberman D, Stoffer T, Ampel N M, Galgiani J N (2006): Coccidioidomycosis as a Common Cause of Community-Acquired Pneumonia. *Emerging Infectious Diseases* 12 (6): 958–62. doi: 10.3201/eid1206.060028.
- Valenzuela D M, Griffiths J A, Rojas J, Aldrich T H, Jones P F, Zhou H, McClain J, et al. (1999): Angiopoietins 3 and 4: Diverging Gene Counterparts in Mice and Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5): 1904–9. doi: 10.1073/pnas.96.5.1904.
- Valerius K P (1996): Size-Dependent Morphology of the Conductive Bronchial Tree in Four Species of Myomorph Rodents. *Journal of Morphology* 230 (3): 291–97. doi: 10.1002/(SICI)1097-4687(199612)230:3<291::AID-JMOR4>3.0.CO;2-H.
- Valiante N M, Rengaraju M, Trinchieri G (1992): Role of the Production of Natural Killer Cell Stimulatory Factor (NKSF/IL-12) in the Ability of B Cell Lines to Stimulate T and NK Cell

- Proliferation. *Cellular Immunology* 145 (1): 187–98.
doi: 10.1016/0008-8749(92)90322-G.
- Venkiteswaran K, Xiao K, Summers S, Calkins C C, Vincent P A, Pumiglia K, Kowalczyk A P (2002): Regulation of Endothelial Barrier Function and Growth by VE-Cadherin, Plakoglobin, and β -Catenin. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 283 (3): C811–21. doi: 10.1152/ajpcell.00417.2001.
- Vermaelen K Y, Carro-Muino I, Lambrecht B N, Pauwels R A (2001): Specific Migratory Dendritic Cells Rapidly Transport Antigen from the Airways to the Thoracic Lymph Nodes. *Journal of Experimental Medicine* 193 (1): 51–60. doi: 10.1084/jem.193.1.51.
- Vial, W. C., G. B. Toews, and A. K. Pierce. 1984. "Early Pulmonary Granulocyte Recruitment in Response to Streptococcus Pneumoniae." *American Review of Respiratory Disease* 129 (1): 87–91. <https://doi.org/10.1164/arrd.1984.129.1.87>.
- Victoria G D, Schwickert T A, Fooksman D R, Kamphorst A O, Meyer-Hermann M, Dustin M L, Nussenzweig M C (2010): Germinal Center Dynamics Revealed by Multiphoton Microscopy with a Photoactivatable Fluorescent Reporter. *Cell* 143 (4): 592–605.
doi: 10.1016/j.cell.2010.10.032.
- Villar J, Blazquez M A, Lubillo S, Quintana J, Manzano J L (1989): Pulmonary Hypertension in Acute Respiratory Failure. *Critical Care Medicine* 17 (6): 523.
- Vincent J L, Sakr Y, Sprung C L, Ranieri V M, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall J R, Payen D (2006): Sepsis in European Intensive Care Units: Results of the SOAP Study*. *Critical Care Medicine* 34 (2): 344–53.
doi: 10.1097/01.CCM.0000194725.48928.3A.
- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer J H, Wyllie D H, Dower S K, Segal D M (2001): Regulation of Toll-Like Receptors in Human Monocytes and Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 166 (1): 249–55. doi: 10.4049/jimmunol.166.1.249.
- Vujanovic N L, Nagashima S, Herberman R B, Whiteside T L (1996): Nonsecretory Apoptotic Killing by Human NK Cells. *The Journal of Immunology* 157 (3): 1117–1126.
- Wagtmann N, Rajagopalan S, Winter C C, Peruui M, Long E O (1995): Killer Cell Inhibitory Receptors Specific for HLA-C and HLA-B Identified by Direct Binding and by Functional Transfer. *Immunity* 3 (6): 801–9. doi: 10.1016/1074-7613(95)90069-1.
- Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M (1987): Purification and Amino Acid Sequencing of NAF, a Novel Neutrophil-Activating Factor Produced by Monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 149 (2): 755–61.
doi: 10.1016/0006-291x(87)90432-3.
- Wang P, Wu P, Anthes J C, Siegel M I, Egan R W, Billah M M (1994): Interleukin-10 Inhibits Interleukin-8 Production in Human Neutrophils. *Blood* 83 (9): 2678–83.
doi: 10.1182/blood.v83.9.2678.bloodjournal8392678.
- Wang Q, Doerschuk C M (2000): Neutrophil-Induced Changes in the Biomechanical Properties of Endothelial Cells: Roles of ICAM-1 and Reactive Oxygen Species. *The Journal of Immunology* 164 (12): 6487–94. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6487.
- Ware L B, Matthay M A (2000): The Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/NEJM200005043421806.
- Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, Henriques-Normark B (2007): Capsule and D-Alanylated Lipoteichoic Acids Protect Streptococcus Pneumoniae against Neutrophil Extracellular Traps. *Cellular Microbiology* 9 (5): 1162–71. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00857.x.

- Weiser J N, Austrian R, Sreenivasan P K, Masure H R (1994): Phase Variation in Pneumococcal Opacity: Relationship between Colonial Morphology and Nasopharyngeal Colonization. *Infection and Immunity* 62 (6): 2582–89.
- Welsh R M, Dundon P L, Eynon E E, Brubaker J O, Koo G C, O'Donnell C L (1990): Demonstration of the Antiviral Role of Natural Killer Cells in Vivo with a Natural Killer Cell-Specific Monoclonal Antibody (NK 1.1). *Natural Immunity and Cell Growth Regulation* 9 (2): 112–20.
- Whitfield J, Littlewood T, Evan G I, Soucek L (2015): The Estrogen Receptor Fusion System in Mouse Models: A Reversible Switch. *Cold Spring Harbor Protocols* 2015 (3): 227–34. doi: 10.1101/pdb.top069815.
- Whitsett J A, Alenghat T (2015): Respiratory Epithelial Cells Orchestrate Pulmonary Innate Immunity. *Nature Immunology*. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/ni.3045.
- Wiemken T, Peyrani P, Bryant K, Kelley R R, Summersgill J, Arnold F, Carrico R, et al. (2013): Incidence of Respiratory Viruses in Patients with Community-Acquired Pneumonia Admitted to the Intensive Care Unit: Results from the Severe Influenza Pneumonia Surveillance (SIPS) Project. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 32 (5): 705–10. doi: 10.1007/s10096-012-1802-8.
- Wildenberg G A, Dohn M R, Carnahan R H, Davis M A, Lobdell N A, Settleman J, Reynolds A B (2006): P120-Catenin and P190RhoGAP Regulate Cell-Cell Adhesion by Coordinating Antagonism between Rac and Rho. *Cell* 127 (5): 1027–39. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.046.
- Willems F, Marchant A, Delville J P, Gérard C, Delvaux A, Velu T, De Boer M, Goldman M (1994): Interleukin-10 Inhibits B7 and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression on Human Monocytes. *European Journal of Immunology* 24 (4): 1007–9. doi: 10.1002/eji.1830240435.
- Wilkinson M, Woodhead M (2004): Pneumonia. *Medicine* 32 (2): 129–134. doi: 10.1383/medc.32.2.129.28463
- Wittamer V, Bondue B, Guillabert A, Vassart G, Parmentier M, Communi D (2005): Neutrophil-Mediated Maturation of Chemerin: A Link between Innate and Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology* 175 (1): 487–93. doi: 10.4049/jimmunol.175.1.487.
- Witzenbichler B, Westermann D, Knueppel S, Schultheiss H P, Tschöpe C (2005): Protective Role of Angiotensin II in Endotoxic Shock. *Circulation* 111 (1): 97–105. doi: 10.1161/01.CIR.0000151287.08202.8E.
- Witzenrath M, Gutbier B, Hocke A C, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, Mitchell T J, et al. (2006): Role of Pneumolysin for the Development of Acute Lung Injury in Pneumococcal Pneumonia. *Critical Care Medicine* 34 (7): 1947–54. doi: 10.1097/01.CCM.0000220496.48295.A9.
- Witzenrath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, Reppe K, et al. (2011): The NLRP3 Inflammasome Is Differentially Activated by Pneumolysin Variants and Contributes to Host Defense in Pneumococcal Pneumonia. *The Journal of Immunology* 187 (1): 434–40. doi: 10.4049/jimmunol.1003143.
- Wolpe S D, Davatelis G, Sherry B, Beutler B, Hesse D G, Nguyen H T, Moldawer L L, Nathan C F, Lowry S F, Cerami A (1988): Macrophages Secrete a Novel Heparin-Binding Protein with Inflammatory and Neutrophil Chemokinetic Properties. *Journal of Experimental Medicine* 167 (2): 570–81. doi: 10.1084/jem.167.2.570.
- Wolpe S D, Cerami A (1989): Macrophage Inflammatory Proteins 1 and 2: Members of a

- Novel Superfamily of Cytokines. *FASEB Journal*. doi: 10.1096/fasebj.3.14.2687068.
- Wolpe S D, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt R W, Cerami A (1989): Identification and Characterization of Macrophage Inflammatory Protein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (2): 612–16. doi: 10.1073/pnas.86.2.612.
- Wong A L, Haroon Z A, Werner S, Dewhirst M W, Greenberg C S, Peters K G (1997): Tie2 Expression and Phosphorylation in Angiogenic and Quiescent Adult Tissues. *Circulation Research* 81 (4): 567–74. doi: 10.1161/01.RES.81.4.567.
- Xu J, Qu J, Cao L, Sai Y, Chen C, He L, Yu L (2008): Mesenchymal Stem Cell-Based Angiopoietin-1 Gene Therapy for Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide in Mice. *Journal of Pathology* 214 (4): 472–81. doi: 10.1002/path.2302.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988): A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells. *Nature* 332 (6163): 411–15. doi: 10.1038/332411a0.
- Yang H, Hreggvidsdottir H S, Palmblad K, Wang H, Ochani M, Li J, Lu B, et al. (2010): A Critical Cysteine Is Required for HMGB1 Binding to Toll-like Receptor 4 and Activation of Macrophage Cytokine Release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (26): 11942–47. doi: 10.1073/pnas.1003893107.
- Yang H, Wang H, Shivalila C S, Cheng A W, Shi L, Jaenisch R (2013): XOne-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* 154 (6): 1370. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.022.
- Ye Z, Huang H, Hao S, Xu S, Yu H, Van Den Hurk S, Xiang J (2007): IL-10 Has a Distinct Immunoregulatory Effect on Naive and Active T Cell Subsets. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 27 (12): 1031–38. doi: 10.1089/jir.2006.0144.
- Yende S, D'Angelo G, Kellum J A, Weissfeld L, Fine J, Welch R D, Kong L, Carter M, and Angus D C (2008): Inflammatory Markers at Hospital Discharge Predict Subsequent Mortality after Pneumonia and Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177 (11): 1242–47. doi: 10.1164/rccm.200712-1777OC.
- Ying S, Meng Q, Taborda-Barata L, Corrigan C J, Barkans J, Assoufi B, Moqbel R, Durham S R, Kay A B (1996): Human Eosinophils Express Messenger RNA Encoding RANTES and Store and Release Biologically Active RANTES Protein. *European Journal of Immunology* 26 (1): 70–76. doi: 10.1002/eji.1830260111.
- Yokoyama T, Vaca L, Rossen R D, Durante W, Hazarika P, Mann D L (1993): Cellular Basis for the Negative Inotropic Effects of Tumor Necrosis Factor- α in the Adult Mammalian Heart. *Journal of Clinical Investigation* 92 (5): 2303–12. doi: 10.1172/JCI116834.
- Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S I, Okamura H, Akira S, Nakanishi K (1998): IL-12 Up-Regulates IL-18 Receptor Expression on T Cells, Th1 Cells, and B Cells: Synergism with IL-18 for IFN- γ Production. *The Journal of Immunology* 161 (7): 3400 LP – 3407.
- Youssef L A, Schuyler M, Gilmartin L, Pickett G, Bard J D J, Tarleton C A, Archibeque T, Qualls C, Wilson B S, Oliver J M (2007): Histamine Release from the Basophils of Control and Asthmatic Subjects and a Comparison of Gene Expression between 'Releaser' and 'Nonreleaser' Basophils. *The Journal of Immunology* 178 (7): 4584–94. doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4584.
- Yssel H, De Waal Malefyt R, Roncarolo M G, Abrams J S, Lahesmaa R, Spits H, de Vries J E (1992): IL-10 Is Produced by Subsets of Human CD4⁺ T Cell Clones and Peripheral Blood T Cells *Journal of Immunology*. 149 (7): 2378–84.

- Zarembek K A, Godowski P J (2002): Tissue Expression of Human Toll-like Receptors and Differential Regulation of Toll-like Receptor MRNAs in Leukocytes in Response to Microbes, Their Products, and Cytokines. *Journal of Immunology* 168 (2): 554–61. doi: 10.4049/jimmunol.168.2.554.
- Zhang L, Yang N, Park J W, Katsaros D, Fracchioli S, Cao G, O'Brien-Jenkins A, Randall T C, Rubin S C, Coukos G (2003): Tumor-Derived Vascular Endothelial Growth Factor up-Regulates Angiopoietin-2 in Host Endothelium and Destabilizes Host Vasculature, Supporting Angiogenesis in Ovarian Cancer. *Cancer Research* 63 (12): 3403–12.
- Zhao G J, Li D, Zhao Q, Song J X, Chen X R, Hong G L, Li M F, Wu B, Lu Z Q (2016) Incidence, Risk Factors and Impact on Outcomes of Secondary Infection in Patients with Septic Shock: An 8-Year Retrospective Study. *Scientific Reports* 6 (1): 1–9. doi: 10.1038/srep38361.
- Zhou W Q, Wang P, Shao Q P, Wang J (2016): Lipopolysaccharide Promotes Pulmonary Fibrosis in Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) via LincRNA-P21 Induced Inhibition of Thy-1 Expression. *Molecular and Cellular Biochemistry* 419 (1–2): 19–28. doi: 10.1007/s11010-016-2745-7.
- Ziegler S F, Bird T A, Schneringer J A, Schooley K A, Baum P R (1993): Molecular Cloning and Characterization of a Novel Receptor Protein Tyrosine Kinase from Human Placenta. *Oncogene* 8 (3): 663–70.
- Zoltán Veres T, Voedisch S, Spies E, Tschernig T, Braun A (2011): Spatiotemporal and Functional Behavior of Airway Dendritic Cells Visualized by Two-Photon Microscopy. *American Journal of Pathology* 179 (2): 603–9. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.04.039.
- Zubiaga A M, Munoz E, Merrow M, Huber B T (1990): Regulation of Interleukin 6 Production in T Helper Cells. *International Immunology* 2 (11): 1047–54. doi: 10.1093/intimm/2.11.1047.

10 Anhang

10.1 Versuchsgruppen

Versuchsteil 1: Bestimmung der Ang-2 Genexpression

In vitro

Ang-2 KO	WT
n=5	n=6

In vivo

<i>S. pneumoniae</i>		Kontrolle	
Ang-2 KO	WT	Ang-2 KO	WT
n=7	n=6	n=5	n=6

Versuchsteil 2: Histologische Analyse der Ang-2 Expression im naiven Lungengewebe

Ang-2 KO	WT
n=1	n=1

Versuchsteil 3: Bestimmung der Integrität eines Endothelzellmonolayers nach Stimulation mit PLY

Ang-2 KO	WT
n=6	n=4

Versuchsteil 4: Bestimmung der Ang-2-Plasmakonzentration, der pulmonalen Permeabilität, des Differenzialzellbildes in BALF und Plasma, der Bakterienlast sowie ausgewählter Zytokine und Chemokine im *in vivo* Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie

<i>S. pneumoniae</i>		Kontrolle	
Ang-2 KO	WT	Ang-2 KO	WT
n=11	n=11	n=6	n=6

Versuchsteil 5: Histologische Analyse der Lungen von *S. pneumoniae* infizierten Mäusen sowie Bestimmung der Ang-2-Plasmakonzentration der in diesem Versuchsteil verwendeten Mäuse

<i>S. pneumoniae</i>		Kontrolle	
Ang-2 KO	WT	Ang-2 KO	WT
n=4	n=4 (n=3 *)	n=3	n=3

* Geringere Tierzahl in der Bestimmung der Ang-2-Plasmakonzentration

10.2 Ergebnisse der immunhistochemischen und histopathologischen Auswertung von Angiopoietin-2-Knockout- und Kontrollmäusen 48 Stunden nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* oder einer Scheininfektion

Die folgenden Befunde wurden am Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin durch Frau Dr. Kristina Dietert erhoben.

Tabelle 12: Immunhistochemische Auswertung der Angiopoietin-2 Expression im Lungengewebe von *Streptococcus pneumoniae* infizierten und scheininfizierten Angiopoietin-2-Knockout- und Kontrollmäusen

Proben-Nr. Pathologie (Vxxx/15_16)	Proben-Nr. Versuch	Genotyp	Infektion	Zeitpunkt	Anti-Angiopoietin-2	
					Kleine Gefäße	Mittelgroße Gefäße
1479	3125	WT	PBS	48 h	+++	+(+)
1480	3126	WT	PBS	48 h	+(+)	-
100	3654	WT	PBS	48 h	+(+)	++(+)
102	3656	Ang-2 KO	PBS	48 h	+ (1)	+ (1)
103	3657	Ang-2 KO	PBS	48 h	-	-
104	3658	Ang-2 KO	PBS	48 h	+(+)	+(+)
1408	3062	WT	PN36	48 h	+	+
1409	3064	WT	PN36	48 h	-	+
1450	3071	WT	PN36	48 h	+	+(+)
1451	3072	WT	PN36	48 h	+(+)	++
105	3659	Ang-2 KO	PN36	48 h	-	-
106	3660	Ang-2 KO	PN36	48 h	-	-
107	3661	Ang-2 KO	PN36	48 h	-	-
108	3662	Ang-2 KO	PN36	48 h	-	+

Auftreten positiver Signale: +: vereinzelt; ++: geringgradig; +++: mittelgradig; ++++: hochgradig. Abkürzungen: Ang-2 KO Angiopoietin-2-Knockout-Maus, PBS Scheininfektion mit phosphatpufferter Salzlösung, PN36 Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*, WT nicht induzierbare Kontrollmaus

Tabelle 13: Histopathologische Auswertung des Lungengewebes von *Streptococcus pneumoniae* infizierten und scheininfizierten Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen

Proben-Nr. Pathologie (Vxxx/15_16)	Proben-Nr. Versuch	Genotyp	Infektion	Zeitpunkt	Pneumonie*								Lymphadenitis	Perivaskuläres Ödem	Pleuritis	Steatitis
					A	B	%	eitrig	histiozytär	nekrotisierend	interstitiell	katarrhalisch-eitrig				
1479	3125	WT	PBS	48h	mf	2-3	25	++	++(+)	-	++(+)	-	n.v.	-	-	-
1480	3126	WT	PBS	48h	mf	3	20	++(+)	+++	-	+++	-	++	-	-	-
100	3654	WT	PBS	48h	mf	3	35	++	+++	-	+++	-	++	-	-	-
102	3656	Ang-2 KO	PBS	48h	mf	2-3	20	+	++(+)	-	++(+)	-	m.v.	-	-	-
103	3657	Ang-2 KO	PBS	48h	mf	3	40	++	+++	-	+++	-	++(+)	-	-	-
104	3658	Ang-2 KO	PBS	48h	mf	2-3	20	++(+)	+++	-	++(+)	-	++	-	-	-
1408	3062	WT	PN36	48h	mf	3-4	40	++++	++(+)	+++	+++	+++(+)	++(+)	++++	++	+++
1409	3064	WT	PN36	48h	mf	4	50	++++	+++	++++	+++	++++	+++	++++	++	++++
1450	3071	WT	PN36	48h	mf	3	30	+++(+)	++	++	++	+++	+++	++++	++(+)	++++
1451	3072	WT	PN36	48h	mf	3-4	40	+++(+)	+++	+++	+++	+++(+)	+++	+++	+	++++
105	3659	Ang-2 KO	PN36	48h	mf	3-4	30	++++	+++	+++	+++	+++(+)	-	++++	+	++
106	3660	Ang-2 KO	PN36	48h	mf	4	70	++++	++	++++	+++	++++	n.v.	++++	-	++(+)
107	3661	Ang-2 KO	PN36	48h	mf	2-3	15	+++	++	+++	+++	++(+)	n.v.	++	-	-
108	3662	Ang-2 KO	PN36	48h	mf	3-4	40	+++(+)	+++	++++	+++	+++	n.v.	++++	++++	++++

*Pneumonie: A: Verteilung; B: Grad (1-4); %: % der Lunge betroffen;

Grad der Entzündung: 1: minimal; 2: geringgradig; 3: mittelgradig; 4: hochgradig;

Auftreten der untersuchten Parameter: +: vereinzelt; ++: geringgradig; +++: mittelgradig; ++++: hochgradig

Abkürzungen: Ang-2 KO Angiotensin-2-Knockout-Maus, PBS Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung, mf multifokal, n.v.: nicht vorhanden, PN36 Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*, WT nicht induzierbare Kontrollmaus

Tabelle 14: Histopathologische Auswertung des Milz- und Lebergewebes von *Streptococcus pneumoniae* infizierten und scheininfizierten Angiopoietin-2-Knockout- und Kontrollmäusen

Proben-Nr. Pathologie (Vxxx/15_16)	Proben-Nr. Versuch	Genotyp	Infektion	Zeitpunkt	Hepatitis	Zentrolobuläre Lipidose = Hypoxie	Splenitis	Lymphotytennekrose	Steatitis/ Omentitis
1479	3125	WT	PBS	48h	+	-	-	-	++++
1480	3126	WT	PBS	48h	+	-	-	-	++(+)
100	3654	WT	PBS	48h	+	-	-	-	++
102	3656	Ang-2 KO	PBS	48h	++	-	-	-	+++
103	3657	Ang-2 KO	PBS	48h	++	-	-	-	++++
104	3658	Ang-2 KO	PBS	48h	++	-	-	+	+++(+)
1408	3062	WT	PN36	48h	-	+++	-	-	+++
1409	3064	WT	PN36	48h	-	-	-	-	+++
1450	3071	WT	PN36	48h	+	+++	-	+++(+)	++++
1451	3072	WT	PN36	48h	+	++++	-	++(+)	+++
105	3659	Ang-2 KO	PN36	48h	++	-	-	+	++
106	3660	Ang-2 KO	PN36	48h	+++	++	-	+	++
107	3661	Ang-2 KO	PN36	48h	++	+	-	-	+
108	3662	Ang-2 KO	PN36	48h	++	+	-	+++	+++

Auftreten der untersuchten Parameter: +: vereinzelt; ++: geringgradig; +++: mittelgradig; ++++: hochgradig
 Abkürzungen: Ang-2 KO Angiopoietin-2-Knockout-Maus, PBS Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung, PN36 Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*, WT nicht induzierbare Kontrollmaus

Tabelle 15: Immunhistochemische Auswertung der Lungen von Angiotensin-2-Knockout- und Kontrollmäusen zum Nachweis von *Streptococcus pneumoniae* 48 Stunden nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* oder einer Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung

Proben-Nr. Pathologie (Vxxx/15_16)	Proben-Nr. Versuch	Genotyp	Infek- tion	Zeitpunkt	Anti- <i>Streptococcus pneumoniae</i>
1479	3125	WT	PBS	48 h	-
1480	3126	WT	PBS	48 h	-
100	3654	WT	PBS	48 h	-
102	3656	Ang-2 KO	PBS	48 h	-
103	3657	Ang-2 KO	PBS	48 h	-
104	3658	Ang-2 KO	PBS	48 h	-
1408	3062	WT	PN36	48 h	++++
1409	3064	WT	PN36	48 h	+++
1450	3071	WT	PN36	48 h	++++
1451	3072	WT	PN36	48 h	++++
105	3659	Ang-2 KO	PN36	48 h	++++
106	3660	Ang-2 KO	PN36	48 h	+++
107	3661	Ang-2 KO	PN36	48 h	+++
108	3662	Ang-2 KO	PN36	48 h	++++

Auftreten positiver Signale: +: vereinzelt; ++: geringgradig; +++: mittelgradig; ++++: hochgradig. Abkürzungen: Ang-2 KO Angiotensin-2-Knockout-Maus, PBS Scheininfektion mit phosphatgepufferter Salzlösung, PN36 Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*, WT nicht induzierbare Kontrollmaus

10.3 Materialien

Chemikalien, Reagenzien, Puffer und andere Substanzen

Name	Hersteller
4-Hydroxytamoxifen H6278	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
4',6-Diamidin-2-phenylindol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
100 bp-DNA-LEITER, äquimolar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose, Ultra-Pure	Life Technologies, Darmstadt
Albumin, Bovine A-4503	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Alexa 546 Phalloidin	MoBiTec, Göttingen
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Aqua ad injectabilia (10 ml)	B.Braun Melsungen, Melsungen,
BD OptEIA™ Mouse IL-6 ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Braunol®	B.Braun Melsungen, Melsungen
cOplete™ Mini	Roche, Basel, Schweiz
Dispase 5000 U/100m l	Corning, Kaiserslautern
Direct-zol™ RNA MiniPrep	Zymo Research Europe, Freiburg im Breisgau
DPS – Dulbecco`s Phosphat Buffered Saline	Life Technologies, Darmstadt
DNase 1	AppliChem, Darmstadt
dNTP Mix, 10 mM, 200 µl	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig
Dynabeads Sheep Anti-Rat IgG	Life Technologies, Darmstadt
Ethanol, absolut reinst	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 1 %	Carl Roth, Karlsruhe

Name	Hersteller
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
FACS clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
FACSFlow Elektrolytlösung , 20 L, BEC342003	BD Biosciences, Heidelberg
FACS rinse	BD Biosciences, Heidelberg
Fibronectin from Human Plasma F2006- 2MG	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Formaldehyde solution (4 %) phosphate buffered for histology	AppliChem, Darmstadt
Giemsa	Merck, Darmstadt
HBSS ⁻ – Hanks Balanced Salt Solution (1x) w/o	Life Technologies, Darmstadt
HBSS – Hanks Balanced Salt Solution (1x)	Life Technologies, Darmstadt
Heparin 25000 I.E., 5 ml	Ratiopharm, Ulm
High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Human Albumin ELISA Quantitation Set	Bethyl laboratories, Montgomery, Texas, USA
Humanes Serum Albumin (20 %)	Biomol, Hamburg
Hyaluronidase from bovine testes, 100mg H3506	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Isofluran CP 1 ml/ml	CP-Pharma, Burgdorf
Isopropanol, molecular biology grade	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Ketavet Injektionslösung 100 mg/ml	Pfizer Deutschland, Berlin

May - Grünwald	Merck, Darmstadt
Methanol > 99,5 % reinst	Carl Roth, Karlsruhe
Methylviolett	Merck, Darmstadt
Natriumchloridlösung, 0,9 % 10 ml	B.Braun Melsungen, Melsungen
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
PenStrep	Life Technologies, Darmstadt
PerfectTaq Plus DNA Polymerase – 1000 U	5Prime, Hamburg
ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay	Affymetrix eBioscience, San Diego, USA
Proteinase K (aus Tritirachium album) Lösung in Tris-HCl pH 7,5; 0,01 mol/l; 600 mAnson-U/ml für die Molekularbiologie	Merck, Darmstadt
Purified Rat Anti-Mouse CD 144	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Quantikine® ELISA Mouse/Rat Angiopoietin-2 Kit	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine® ELISA Mouse CXCL1/KC Immunoassay	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Rabbit Serum (R4505 20 ML)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Rekombinantes Pneumolysin	Prof. Timothy Mitchell, Division of Infection and Immunity, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, United Kingdom
Rompun Injektionslösung 2 % (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital, Leverkusen
Roticlear	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37 %	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt

Name	Hersteller
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978)	Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Abteilung Molekulare Genetik und Infektionsbiologie, Universität Greifswald
Sunflower seed oil from <i>Helianthus annuus</i>	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tamoxifen Free Base, T5648	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Thilo Tears Augengel	Alcon Pharma, Freiburg im Breisgau
TMB soluble	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
TRIZOL Reagent	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin EDTA (1x), flüssig	Life Technologies, Darmstadt
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Nährmedien und Zusätze

Name	Hersteller
Bacto™ Technischer Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto™ Todd Hewitt Bouillon	BD Biosciences, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Medium MV2	PromoCell bioscience alive, Heidelberg
FCS (Foetal Bovine Serum Gold)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Supplement Mix – Endothelial Cell Growth Medium MV2	PromoCell bioscience alive, Heidelberg

Primer

PCR		
Name	Primersequenz	Hersteller
1242-1	5`- CCATCATCgAAgCTTCACTgAAg	TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin
1242-2	5`- ggAgTTTCAATACCCgA- gATCATgC	TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin
1260_1	5`- gAgACTCTggCTACTCATCC	TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin
1260_2	5`- CCTTCAGCAAgAgCTggggAC	TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin
5676_33	5`- ATCACCCACACTgCAgTgC	TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin
5677_40	5`- CACTTCTTCCCCTgTACTgAgg	TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin

qPCR		
Name	Primersequenz	Hersteller
Angpt2_EA1_rv	5` - CgAgTCTTgTCgTCTggTTTAg	TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin
Angpt2_EA1_probe	5` - 6FAM-ACTgACTgATgTggAAgCCCAAgT -- TMR	TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin
m_GAPDH_fw	5' - TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA -3'	metabion interna- tional AC, Planegg
m_GAPDH_rv	5' - CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA -3'	metabion interna- tional AC, Planegg

Name	Primersequenz	Hersteller
m_GAPDH_probe	5'-6-Fam-CCG CCT GGA GAA ACC TGC CAA GTA TG -Tamra -3'	metabion international AC, Planegg

Antikörper

<u>Durchflusszytometrie</u>			
Spezifität	Klon	Fluochrome/Enzyme	Hersteller
F4/80	BM8	PE	eBioscience, Heidelberg
Ly6G	1A8	V450	BioLegend, San Diego, USA
CD45	30F-11	PerCP	eBioscience, Heidelberg
CD16/CD32	2.4G2	-	BD Biosciences, Heidelberg

<u>Immunfluoreszenz</u>			
Name	Typ	Konzentration	Hersteller
VE-Cadherin Antibody (C19) (sc-6458), goat anti human/mouse, IgG, polyklonal	Primärantikörper	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Alexa Fluor 488, Rabbit anti goat, IgG, polyklonal	Sekundärantikörper	1:8000	MoBiTec, Göttingen

Immunhistochemie			
Name	Typ	Konzentration	Hersteller
Angiopoietin-2 (AF623), goat anti human, IgG, polyklonal	Primärantikörper	1:10	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Rabbit anti goat (B5000), IgG, biotinylated	Sekundärantikörper	1:200	Vector Laboratories, Burlingame, USA
S. pneumoniae (D39), rabbit, polyklonal	Primärantikörper	1:2000	Prof. Dr. Sven Hammer-schmidt, Abteilung Molekulare Genetik und Infektionsbiologie, Universität Greifswald
Alkaline Phosphatase (AP-1000), goat anti rabbit, IgG, polyklonal	Sekundärantikörper	1:500	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
BD Falcon™ 15 ml Polypropylene Round-Bottom Tube	BD Biosciences, Heidelberg
BD Falcon™ 50 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Biosciences, Heidelberg
BD Falcon™ Cell strainer (40 µm Nylon)	BD Biosciences, Heidelberg
BD Falcon™ Cell strainer (70 µm Nylon)	BD Biosciences, Heidelberg
Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafblut	BD Biosciences, Heidelberg
Corning® 96 Well EIA/RIA Assay Microplate	Corning, Kaiserslautern
Deckgläser D = 13 mm Stärke 1	Carl Roth, Karlsruhe

Material	Hersteller
Deckglas 20 x 20 mm Nr.1	VWR International, Darmstadt
Einbettkassetten	Carl Roth, Karlsruhe
Einmal-Impfshlingen (farblos, 1 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Erlenmeyerkolben	Carl Roth, Karlsruhe
gentleMACS M Tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Haemacytometer-Deckgläser Stärke 0,4 mm, 22 x 22 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Kanülen BD Microlance™ (26 G)	BD Biosciences, Heidelberg
Kanülen BD Microlance™ 3 (27 G)	BD Biosciences, Heidelberg
Mehrzweckbecher 100 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrovette ® 500, Kalium - EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
Multi-Channel-Pipette (Eppendorf Research)	Eppendorf, Hamburg
Multipette (Eppendorf Multipette plus)	Eppendorf, Hamburg
Parafilm	Brand, Wertheim
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf, Hamburg
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Reagiergefäß SafeSeal (0,5 ml; 1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rotilabo®-Spritzenfilter, steril (0,45 µm)	Carl Roth, Karlsruhe
SafeSeal-Tip Professional	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Serologische Pipetten (2 ml / 5 ml / 10 ml / 25 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Spritzen BD Discardit™ II 2 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Spritzen BD Plastipak™ 1 ml	BD Biosciences, Heidelberg

Material	Hersteller
Thermanox Coverslips, D = 13 mm	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig
Tissue Culture Dish 35 x 10 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Trachealkanüle für Mäuse	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten (12 und 24 Well)	BD Biosciences, Heidelberg

Geräte und Software

Name	Hersteller
ABI 7300-Real Time PCR Systems	Applied Biosystems, Darmstadt
Analysewaage (Sartorius, MC 5(-OCE))	Applied Biosystems, Darmstadt
Anthos ht2 Mikroplate Photometer	Anthos Mikrosysteme, Krefeld
Autoklav Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec, Wettenberg
Axioskop 2 MOT Konfokal Laserscanning Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen
BANDELIN Sonorex, Typ: RK100H	Bandelin electronic, Berlin
BD FACSCalibur™ (Durchflusszytometer)	BD Biosciences, Heidelberg
Bio-Plex® 200 System	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
Bio-Plex Manager Software version 4.0	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
Brutschrank Heraeus Typ BB 6220 O2	Kendro Laboratory Products, Osterode
Differenzial-Druckaufnehmer (Differential pressure Transducer Validyne DP45-14)	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March

Name	Hersteller
Druckaufnehmer (Pressure Transducer)	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March
DynaMag™-Spin	Life Technologies, Darmstadt
EPPENDORF Mastercycler Personal Thermal Cycler	Eppendorf, Hamburg
Falcon® 96-well Clear Flat Bottom TC-treated Culture Microplate	Corning GmbH, Kaiserslautern
FS 3000 Dampfgarer	Braun, Kronberg im Taunus
Gefrierschrank/ groß -20°C (Liebherr Comfort)	Engmann Kühlsysteme, Mannheim
Gefrierschrank -80°C	Engmann Kühlsysteme, Mannheim
Gel Jet Imager	INTAS Science Imaging Instruments, Göttingen
gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
GraphPad PRISM 4.0	Graph Pad Software, San Diego, USA
Harvard Apparatus Anesthetic Vaporizer	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Kühlschrank (4 °C)/Gefrierschrank (-80 °C)	Engmann Kühlsysteme, Mannheim
LSM 5 Pascal Version 2.8 SP1	Carl Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer (Variomag Electronicrührer Mno)	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Megafuge 1.0R (Heraeus) Variomag®	Kendro Laboratory Products, Osterode
Messmodule (CFBA, TAM-A, VCM, TCM)	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig
Perfusor (Perfusor F, Typ 871332/4)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen

Name	Hersteller
Peristaltikpumpe Ismatec® Reglo-Analog	Ismatec Laboratoriumstechnik IDEX Health & Science, Wertheim
Peristaltikpumpe (Reglo-Analog, Ismatec SA)	ISMATEC, Glattbrugg, Schweiz
pH-Meter (766 Calimatic, Typ 766)	Knick Elektronische Messgeräte, Berlin
Photometer Uvikon XS	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences, Biebertal
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, München
Pulmonalkanüle für Mäuse	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March
Rektalsonde (physitemp Model BAT-12)	Physitemp Instruments, Clifton, USA
Roto-Shake Genie	Scientific Industries, Bohemia, USA
Rüttelplatte (IKA-Schüttler, Typ MT S2)	KIKA-Werke, Staufen im Breisgau
Schüttelwasserbad - ShakeTemp SW23	Julabo, Seelbach
Scil Vet abc	Scil animal care company, Viernheim
Sicherheitswerkbank Hera Safe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products, Osterode
Software (Pulmodyn)	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March
Sub-Cell GT Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Sub-Cell GT UV-Transparent Gel Tray	Bio-Rad Laboratories, München
Thermomixer, Comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler T-Gradient ThermoBlock	Biometra, Göttingen
Unterdruckkammer (Isolated Lung, size 1, Typ 839)	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus, March
Vortex-Genie 2® Model G-560E	Scientific Industries, Bohemia, USA

Name	Hersteller
Waage Model CS 200	Ohaus Corporation, Parsippany, USA
WinRead Anthos	Anthos Mikrosysteme, Krefeld
Zählkammer nach Neubauer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf

Puffer und andere Substanzrezepte

<u>Endothelzell-Waschpuffer</u>	
HBSS	x ml
Bovines Serum Albumin	5 mg/ml
Abkürzungen: x= nach Bedarf gewähltes Volumen	
<u>Endothelzellmedium:</u>	
Endothelial Cell Growth Medium MV2 (Promocell) ml	<u>x ml</u>
Supplement Mix (Promocell)	5 %
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Abkürzungen: x= nach Bedarf gewähltes Volumen	
<u>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 250 mM):</u>	
	<u>50 ml</u>
EDTA	4,625 mg
Aqua bidest	40 ml
Natriumhydroxid (NaOH)	2,3 Plätzchen
Unter ständigem Rühren das EDTA lösen und mit Aqua Bidest auf 50 ml auffüllen.	
<u>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 0,5 M):</u>	
	<u>250 ml</u>
EDTA	23,125 mg
Aqua bidest	226,875 ml
Natriumhydroxid (NaOH)	8 – 9 Plätzchen

Unter ständigem Rühren das EDTA lösen und mit Aqua Bidest auf 250 ml auffüllen.	
<u>Erythrozyten-Lyse-Puffer</u>	<u>500 ml</u>
KHCO ₃ (0,01 M)	0,5006 g
NH ₄ Cl	4,1454 g
EDTA	0,202 g
Unter ständigem Rühren das EDTA lösen und mit Aqua Bidest auf 500 ml auffüllen.	
<u>FACS-Puffer:</u>	<u>500 ml</u>
Bovines Serumalbumin (BSA)	2,5 g
EDTA (0,5 M)	2 ml
Unter ständigem Rühren das BSA lösen und mit PBS (0,01 M) auf 500 ml auffüllen.	
<u>Heparin – Gemisch</u>	<u>5 ml</u>
NaCl (0,9 %)	2,5 ml
Heparin 25000 I.E.	2,5 ml
<u>Mowiol-Eindeckmedium:</u>	<u>12 ml</u>
Mowiol 4-88	2,4 g
Glycerol	6 g
Tris-HCL (0,2 M)	12 ml
Medium 4 Stunden rühren. 2 Stunden stehen lassen und anschließend 10 min bei 50°C inkubieren. Daraufhin wird das Medium bei 5000 U/min für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert. Das Mowiol- Eindeckmedium wird bei -20 °C gelagert.	
<u>Narkose-Gemisch</u>	<u>12 ml</u>
Ketamin (100 mg/ml)	2 ml
Xylazin (2 %)	1 ml
NaCl (0,9 %)	9 ml
<u>Paraformaldehyd 3 %</u>	<u>200 ml</u>
Paraformaldehyd	6 g

Aqua Dest.	100 ml
NaOH	1 Tropfen
PBS (0.2 M) + NaCl (150 mmol)	100 ml
<p>Paraformaldehyd mit 100 ml Aqua Dest. versetzen und 5 – 10 Min unter Erhitzen rühren, bis sich das Paraformaldehyd gelöst hat. Anschließend ein Tropfen NaOH hinzugeben. Darauf werden 100ml PBS (0,2 M, pH 7,6) dazu gegeben oder mittels HCL auf 7,6 einstellen.</p>	
<u>Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, 0.01M)</u>	
<u>+ Natrium Chlorid (NaCl, 150 mmol):</u>	<u>5 l</u>
NaH ₂ PO ₄	0,9 g
Na ₂ HPO ₄	7,75 g
NaCl	43,6 g
Aqua Dest.	5 l
<u>SNET-Puffer:</u>	<u>250 ml</u>
NaCl (5 M)	20 ml
SDS (10 %)	25 ml
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (1 M; pH 8,0)	5 ml
EDTA (0,5 M)	2,5 ml
Aqua Dest.	197,5 ml
<u>Sodium Dodecyl Sulfat (SDS, 10%):</u>	<u>100 ml</u>
SDS	10 g
Aqua bidest.	90 ml
<p>Nachdem sich das SDS unter ständigem Rühren gelöst hat wird die Lösung mit Aqua Bidest. auf 100 ml aufgefüllt.</p>	
<u>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (1 M):</u>	<u>500 ml</u>
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	60,5 g
Aqua bidest	500 ml

Nachdem sich das Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan unter ständigem Rühren gelöst hat, wird der pH-Wert mittels Zugabe von HCL auf pH: 8 eingestellt.

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Eisessig

<u>Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TAE) 50 x:</u>	<u>1 l</u>
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	242 g
Eisessig	57,1 ml
Ethylendiamintetraessigsäure (0,5 M, pH:8)	100 ml
Mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen.	

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Eisessig-

<u>Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TAE) 1x:</u>	<u>1 l</u>
TAE-Puffer (Tris-Acetat) 50 x	20 ml
Mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen.	

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (10mM)-

<u>Ethylendiamintetraessigsäure (1mM)-Puffer (TE):</u>	<u>1 l</u>
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	1,21 g
Ethylendiamintetraessigsäure	0,37 g
In 1 l Aqua Bidest. lösen und bei Raumtemperatur lagern.	

<u>Triton (1%):</u>	<u>200 ml</u>
Triton™ X-100	2 ml
PBS (0,01 M)	198 ml

<u>Ulmer-Mix</u>	<u>8,4 ml</u>
Ketamin (100 mg/ml)	3 ml
Xylazin (2%)	2,4 ml
NaCl (0,9%)	3 ml

Verdaumedium:

HBSS ⁻	<u>x ml</u>
-------------------	-------------

Dnase	0,5 mg/ml
Dispase	5 IE/ml
Abkürzungen: x= nach Bedarf gewähltes Volumen	
<u>Verdünnungsmedium:</u>	<u>50 ml</u>
PBS (0,01 M)	50ml
Bovines Serumalbumin	0,5 g
Tween 20	0,025 g
<u>Wachstumsmedium:</u>	
Endothelial Cell Growth Medium MV2 (Promocell)	<u>x ml</u>
Supplement Mix (Promocell)	5 %
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Fetales Kälberserum (FCS)	150 µl/ml
Abkürzungen: x= nach Bedarf gewähltes Volumen	

11 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Originalartikel:

- 1) Veröffentlichter Kongressabstract des ERS International Congress 2017 Mailand/Italien (Abstract-Nr.: 7725, Poster-Nr.: PA3937)
Gutbier B, Ehrler C, Dietert K, Nouailles G, Kershaw O, Mitchell TJ, Gruber AD, Weissmann N, Suttorp N, Witzenrath M
Incomplete angiotensin-2 knockdown does not confer protection in murine pneumococcal pneumonia
European Respiratory Journal Sep 2017, 50 (suppl 61) PA3937; DOI: 10.1183/1393003.congress-2017.PA3937
First published online December 6, 2017.
Eigener Anteil an der Publikation: Versuchsdurchführung, Analyse und Interpretation der in vivo Versuche

Vorträge:

- 1) Birgitt Gutbier, Carolin Ehrler, Kirstina Dietert, Geraldine Nouailles-Kursar, Olivia Kershaw, Tim J. Mitchell, Achim D. Gruber, Norbert Weissmann, Norbert Suttorp and Martin Witzenrath
Angiotensin-2 in pneumococcal pneumonia: insights from a novel inducible Ang-2 knockout mouse
Herbsttagung der Sektion Zellbiologie und der Sektion Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, 11. – 12. November 2016, Hannover.
- 2) Birgitt Gutbier, Carolin Ehrler, Kirstina Dietert, Geraldine Nouailles-Kursar, Olivia Kershaw, Tim J. Mitchell, Achim D. Gruber, Norbert Weissmann, Norbert Suttorp and Martin Witzenrath
Angiotensin-2 in pneumococcal pneumonia: insights from a novel inducible Ang-2 knockout mouse
20. Workshop des Arbeitskreises „Respiratorisches System“ der DVG im Rahmen des 58. Jahreskongresses der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. (DGP), 22 März 2017, Stuttgart.

Poster:

- 1) Carolin Ehrler, Birgitt Gutbier, Kristina Dietert, Geraldine Nouailles-Kursar, Olivia Kershaw, Tim J. Mitchell, Achim D. Gruber, Norbert Weissmann, Norbert Suttorp and Martin Witzenrath

Impact of Ang-2 knockdown on lung barrier function in pneumococcal pneumonia

International Conference „Innate immunity of the lung – Improving pneumonia outcome“, 15. – 17. September 2016, Berlin

- 2) Birgitt Gutbier, Carolin Ehrler, Kirstina Dietert, Geraldine Nouailles-Kursar, Olivia Kershaw, Tim J. Mitchell, Achim D. Gruber, Norbert Weissmann, Norbert Suttorp and Martin Witzzenrath

Angiopoietin-2 in pneumococcal pneumonia: insights from a novel inducible Ang-2 knockout mouse

American Thoracic Society International Conference, 19. – 24. Mai 2017, Washington DC. [Publication Page: A2799]

12 Förderung/ Interessenskonflikt

Die vorliegende Studie wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) als Teil des Sonderforschungsbereichs Transregio 84 (SFB TR 84; Innate Immunity of the Lung) im Teilprojekt C6 (Projektleiter: Univ.-Prof. Dr. Martin Witzernath, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin und Prof. Dr. Norbert Weissmann, Excellence Cluster cardiopulmonary System, JLU Gießen) und im Teilprojekt Z01b (Projektleiter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber, Ph.D.; Institut für Tierpathologie, Freie Universität Berlin) unterstützt.

Zudem wurde das Dissertationsvorhaben durch ein Promotionsstipendium der Jürgen Manchot Stiftung unterstützt

13 Danksagung

Bedanken möchte ich mich zuallererst bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Martin Witzernath, Arbeitsgruppenleiter der AG Witzernath, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und Bereitstellung der Ressourcen, die ich zur Bearbeitung des Themas nutzen durfte. Auch für die fachliche Betreuung und die produktiven Gespräche möchte ich mich bei ihm bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D., Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, für die Betreuung der Dissertation und die Möglichkeit zur Einreichung dieser Arbeit über das Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. Birgitt Gutbier, welche meine Dissertation betreute. In besonderem Maße möchte ich mich für die hervorragende Einarbeitung, die ausgezeichnete fachliche Betreuung, die unermüdliche Beantwortung vieler Fragen, ihre Geduld und stets begeisterte und motivierende Art bedanken.

Frau Dr. Kristina Dietert, Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, danke ich für Ihren Einsatz bei der Herstellung und Beurteilung der histologischen Präparate im Rahmen dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich beim gesamten Laborteam, insbesondere bei Dr. Sandra Wienhold, Dr. Geraldine Nouailles und Dipl.biol. Denise Barthel für den großartigen Zusammenhalt und das tolle Arbeitsklima bedanken.

Ein großer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich unermüdlich unterstützen und mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Abschließend möchte ich der Jürgen Manchot Stiftung für die finanzielle Unterstützung zur Erstellung dieser Dissertation danken

14 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 01.08.2022

Carolin Ehrler



mbvberlin mensch und buch verlag

59,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-181-0