

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie

der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über das

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Die Bedeutung der Angiopoietine-1 und -2 und ihres Rezeptors Tie2 in der Pneumokokkenpneumonie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Anne-Kathrin Neuhauß

Tierärztin

aus Berlin

Berlin 2014

Journal-Nr.: 3731

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar Heinz Wieler
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Martin Witzernath
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Benedikt Kaufer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, laboratory animals, animal models, lungs, respiratory diseases, lung function, pneumonia, community acquired pneumonia, streptococcus pneumoniae, endothelium, barriers

Tag der Promotion: 23.09.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-653-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

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 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Großeltern Dr. Ernst Heinz Neuhauß und Ursula Erika Neuhauß,
sowie meiner lieben Großtante Maria Erika Irmischer.

“Der Fortgang der wissenschaftlichen Entwicklung ist im Endeffekt eine ständige Flucht vor
dem Staunen.”

- *Albert Einstein*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Die Lunge	3
2.2 Immunsystem der Lunge	6
2.3 Die Pneumonie	7
2.4 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
2.5 <i>Acute respiratory distress syndrome / acute lung injury*</i>	12
2.6 Das Angiotensin/Tie2-System	14
2.6.1 Einleitung	14
2.6.2 Angiotensin-1	15
2.6.3 Angiotensin-2	16
2.6.4 Tie2-Rezeptor	17
2.6.5 Signaltransduktion des Angiotensin/Tie2-Systems und Wirkung auf das Endothel	17
2.6.6 Bedeutung des Angiotensin/Tie2-Systems bei Sepsis-induziertem Lungenversagen	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Untersuchung von Serumproben von Pneumoniepatienten	21
3.1.1 Herkunft	21
3.1.2 Angiotensin-1- und Angiotensin-2-Quantifizierung.....	24
3.2 Marathonstudie	24
3.3 Immunhistologie.....	25
3.4 <i>Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS)</i>	26
3.4.1 Stimulation von humanen umbilicalvenösen Endothelzellen mittels Pneumolysin und Thrombin im ECIS.....	27
3.4.2 Quantifizierung von Angiotensin-2 und Interleukin-6 in den Zellüberständen.....	27
3.4.3 Stimulation von humanen umbilicalvenösen Endothelzellen mit Angiotensin-2 im ECIS.....	27
3.5 Tierversuche	28

3.5.1 Tiere	28
3.5.2 Tierhaltung	28
3.6 Untersuchung des Einflusses einer Angiotensin-2 siRNA-Vorbehandlung bei Mäusen auf die Pneumolysin-induzierte pulmonale Permeabilität	28
3.6.1 siRNA-Behandlung	28
3.6.2 Die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslung (IPML)	29
3.6.3 Quantifizierung von humanem Serumalbumin	32
3.7 Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie	33
3.7.1 Infektion	33
3.7.2 Untersuchung der pulmonalen Angiotensin-1-, Angiotensin-2- und Tie2-mRNA-Expression im Verlauf der murinen Pneumokokkenpneumonie	34
3.7.3 Infektionsversuche mit Angiotensin-1-Behandlung	35
3.7.4 Differenzierung der Leukozytensubpopulationen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	37
3.7.5 Bestimmung der pulmonalen Permeabilität	37
3.7.6 Zytokinquantifizierung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	38
3.8 Statistische Datenanalyse	38
4 Ergebnisse	40
4.1 Pneumoniepatienten haben höhere Angiotensin-2- und niedrigere Angiotensin-1-Serumkonzentrationen gegenüber Gesunden	40
4.2 Pneumoniepatienten mit letalem Pneumonieverlauf haben höhere Angiotensin-2-Spiegel	42
4.3 Procalcitonin als klinischer Parameter korrelierte mit der Angiotensin-2-Serumkonzentration dieser Pneumoniepatienten (CAPNETZ Studie 2)	45
4.4 Verstorbene und überlebende Pneumoniepatienten haben annähernd gleiche Angiotensin-2-Spiegel	46
4.5 Procalcitonin als klinischer Parameter korrelierte mit der Angiotensin-2-Serumkonzentration der Pneumoniepatienten (CAPNETZ Studie 3)	47
4.6 Die Angiotensin-2-Serumkonzentration ist beim Pneumonie-induzierten <i>acute respiratory distress syndrome</i> initial erhöht und sinkt nach 7 Tagen ab (VALID Studie)	48
4.7 Die Angiotensin-2-Serumkonzentration bei Pneumonie-induziertem <i>acute respiratory distress syndrome</i> korreliert mit dem Serum-pH	50

4.8 Hohe Angiotensin-2-Serumwerte und Entzündungsparameter bei Läufern nach dem Marathon.....	51
4.9 Angiotensin-2 ist in humanen <i>post mortem</i> Lungen von Pneumoniepatienten in Endothelzellen exprimiert	54
4.10 Eine Pneumolysin-Stimulation von humanen umbilicalvenösen Endothelzellen führte zu einer erhöhten Angiotensin-2-Freisetzung in Zellkulturüberständen aber nicht zu einem Interleukin-6-Anstieg.....	55
4.11 Eine Angiotensin-2-Stimulation von humanen umbilicalvenösen Endothelzellen führt bei hohen Dosierungen zu einem kurzen, reversiblen Abfall des transzellulären elektrischen Widerstandes.....	57
4.12 Die Pneumolysin-induzierte Permeabilität ist bei Vorbehandlung von Mäusen mit spezifischer, gegen Angiotensin-2 gerichteter siRNA verringert	58
4.13 Im Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie steigt die Angiotensin-2-mRNA-Expression in Lungen von infizierten Mäusen an und die Angiotensin-1- und Tie2-mRNA-Expression sinkt.....	59
4.14 Eine Angiotensin-1-Behandlung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten Mäusen senkt die pulmonale Inflammationsreaktion und Permeabilität 48 h nach der Infektion	61
5 Diskussion	65
5.1 Die Angiotensin-1- und Angiotensin-2-Serumkonzentrationen von Pneumoniepatienten unterscheiden sich im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen	65
5.2 Die Angiotensin-2-Serumkonzentration bei Patienten mit einem Pneumonie-induzierten <i>acute respiratory distress syndrome</i> ist initial erhöht und sinkt während der Genesung	67
5.3 Marathonläufer weisen unmittelbar nach dem Marathon hohe Angiotensin-2-Werte und erhöhte Entzündungsparameter im Blut auf	68
5.4 Angiotensin-2 wird in humanen Lungen (<i>post mortem</i>) von Endothelzellen exprimiert	69
5.5 Angiotensin-2 wird <i>in vitro</i> von Endothelzellen nach Pneumolysin-Stimulation freigesetzt	69
5.6 Angiotensin-2 reduziert <i>in vitro</i> die endotheliale Integrität kurzfristig und reversibel ...	70
5.7 Eine Vorbehandlung mit spezifischer siRNA gegen Angiotensin-2 vermindert die Pneumolysin-induzierte Permeabilität in der isoliert perfundierten Mauslunge	71

5.8 Im murinen Pneumokokkenpneumonie-Modell zeigt sich eine erhöhte pulmonale Angiotensin-2-mRNA-Expression nach Infektion.....	72
5.9 Therapie mit Angiotensin-1 reduzierte die pulmonale Inflammation und Permeabilität bei muriner Pneumokokkenpneumonie	72
6 Zusammenfassung.....	75
7 Summary	77
8 Literaturverzeichnis	79
9 Anhang	91
9.1 Versuchsdesign	91
9.2 Material	93
9.3 Abkürzungsverzeichnis.....	99
9.4 Tabellenverzeichnis	102
9.5 Abbildungsverzeichnis	103
Danksagung.....	105
Publikationen.....	106
Selbstständigkeitserklärung	107

1 Einleitung

Vor Beginn der antimikrobiellen Therapie lag die Mortalität bei Pneumoniepatienten bei 30 bis 40 %. Bis heute konnte die Sterblichkeit bei Patienten mit Pneumonie trotz frühzeitigem und gezieltem Antibiotikaeinsatz nur auf 10 – 14 % reduziert werden. In Deutschland wird nahezu jeder dritte diagnostizierte Pneumoniepatient hospitalisiert (Ewig et al. 2009; Welte & Köhnlein 2009). Ein wesentlicher Grund dafür ist eine inadäquate Pathogen-Wirts-Interaktion, die zu einem komplizierten Pneumonieverlauf führen kann. Die Hauptursache für eine ambulant erworbene Pneumonie (CAP = *community acquired pneumonia*) ist zu 90 % eine bakterielle Infektion (Hippenstiel et al. 2007; Wenisch 2006; Mizgerd 2008). Der häufigste Pneumonieerreger weltweit mit einer Prävalenz von 5 – 60 %, abhängig von Region und Ausbau des Gesundheitssystems, ist das gram-positive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (File 2004; Rozenbaum et al. 2013). Seine Pathogenitätsfaktoren, zum Beispiel das Exotoxin Pneumolysin (PLY), können unter anderem zur Schädigung der alveolokapillären Barriere beitragen (Rubins et al. 1992).

Der Körper reagiert auf das Eindringen von Pathogenen oft mit einer starken Entzündungsreaktion (Progress 2010), die statt der eigentlichen Abwehr ein Überschießen und eine Ausbreitung der Entzündung auf andere Lungenregionen zur Folge hat. In diesen Bereichen kommt es meist auch zur Permeabilität der alveolokapillären Barriere, wodurch bakterielle Bestandteile ins Blut gelangen können, was in der Regel zu einer sekundären Bakteriämie führt. Die Ventilation ist in diesen Lungenregionen durch die massive Infiltration von Entzündungszellen und Flüssigkeit nicht mehr ausreichend und ein adäquater Gasaustausch ist somit nicht mehr gewährleistet. Patienten mit dieser schweren Form einer CAP haben eine schlechte Prognose. Besonders bei älteren Menschen, die zudem meist an weiteren Erkrankungen leiden, ist dieser Prozess oft letal (Ruiz et al. 1999; Höffken et al. 2009; Mizgerd 2008). Dem öffentlichen Gesundheitswesen entstehen durch die intensivmedizinische Betreuung von Pneumoniepatienten jährlich immense Kosten. Zudem steigt die Inzidenzrate mit zunehmendem Alter, sodass aufgrund des demografischen Wandels in unserer Gesellschaft mit zunehmender Morbidität gerechnet werden muss (Bauer 2006). Wäre es möglich, die Prozesse zu verstehen, die zu der inadäquaten, überschießenden Wirtsreaktion mit nachfolgender Hyperpermeabilität und –inflammation führen, könnte es in Zukunft eventuell möglich sein, neben einer adäquaten antimikrobiellen Therapie die Entstehung eines akuten Lungenversagens auf Grund einer schweren Pneumonie mit gezielten adjuvanten Therapien zu verhindern. In vielen Veröffentlichungen wurde die Beteiligung der Angiopoietine an der Regulation der Angiogenese und der Vaskularisation beschrieben und dabei eine direkte Endothelwirkung nachgewiesen (Eklund

& Olsen 2006). In späteren Studien konnte in verschiedenen Krankheitsmodellen, zum Beispiel bei Sepsis, Sepsis mit folgendem ALI* (*acute lung injury*) und Sepsis-induziertem ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) die direkte Beteiligung des Angiotensin/Tie2-Systems an der Regulation der endothelialen Permeabilität und an einer verstärkten Inflammation nachgewiesen werden (Orfanos et al. 2007; Gallagher et al. 2008; Parikh et al. 2006; van der Heijden et al. 2009). Die Angiotensine (Ang) 1 und 2 sind Liganden des Tyrosinkinaserzeptors Tie2 (*tunica interna endothelial cell kinase 2*). Eine Ang-1-Bindung führt zur Phosphorylierung des Rezeptors bzw. zu seiner Aktivierung, wodurch es zum Ablauf verschiedener Signalkaskaden kommt, die zu einer Stabilisierung des Endothels führen. Ang-2 als partieller Antagonist (Yuan et al. 2009) kann den Rezeptor kompetitiv blockieren, was zu einer Destabilisierung des Endothels, aber auch zu einer Sensibilisierung gegenüber Entzündungsmediatoren und einer Initiierung von Entzündungskaskaden führen kann (Fiedler et al. 2006). Somit sind Ang-1 und Ang-2 durch ihre Wirkung auf das Endothel offenbar maßgeblich an der Regulation der vaskulären Permeabilität und Inflammation beteiligt. Die Bedeutung und Funktion des Ang/Tie2-Systems im Rahmen der Pneumokokkenpneumonie ist noch unklar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zum einen, zu eruieren, ob das Ang/Tie2-System generell, analog der Arbeiten u.a. über den Schweregrad der Sepsis (Orfanos et al. 2007), geeignet ist, Verlauf, Prognose und Risikoabschätzung des Schweregrades der Pneumonie abzubilden und ob sich speziell Ang-2 als Biomarker für die Risikostratifizierung eignet. Zum anderen sollte untersucht werden, ob die Beeinflussung des Ang/Tie2-Systems einen möglichen therapeutischen Nutzen für die schwere Pneumonie bietet. Für die erste Fragestellung wurden Proben von Pneumoniepatienten und gesunden Blutspendern auf ihren Ang-2- und Ang-1-Gehalt analysiert und in einem zweiten Ansatz die Ang-2/Ang-1-Serumkonzentrationen von Überlebenden im Vergleich zu verstorbenen Patienten ausgewertet. Für Rückschlüsse auf die Dynamik des Ang/Tie2-Systems wurden Serumproben von Patienten mit einem Pneumonie-induzierten ARDS, die zu verschiedenen Zeitpunkten der intensivmedizinischen Behandlung entnommen wurden, analysiert. Marathonläufer weisen unmittelbar nach dem Lauf eine starke Induktion proinflammatorischer Zytokine auf, da der Marathonlauf eine akute Inflammationsreaktion hervorruft (Bernecker et al. 2011). Um die Kinetik der Freisetzung von Ang-2 untersuchen zu können, wurden Blutproben von Marathonläufern zu verschiedenen Messzeitpunkten auf ihren Ang-2-Gehalt untersucht. Für die zweite Fragestellung wurde in verschiedenen *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* Experimenten die Rolle des Ang/Tie2-Systems für die Pneumonie-induzierte pulmonale Hyperpermeabilität und -inflammation untersucht und geprüft, ob die Beeinflussung dieses Systems eine neue therapeutische Perspektive für die Behandlung des akuten Lungenversagens darstellen könnte.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Lunge

Die Lunge (= Lungen, lat. *pulmones*) ist ein dynamisches Organ mit vielen Funktionen, zu denen unter anderem die Beteiligung an der Regulation des Säure-Base-Haushaltes und ein bedeutender Anteil an der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr zählen. Die Hauptfunktion der Lunge ist jedoch der Gasaustausch mit der Umwelt. In den Atmungsorganen findet die äußere Atmung statt, d.h. der Gasaustausch zwischen Blut und Luft (Leonhardt 1990). Sie lassen sich in obere (Nase, *Pharynx*) und untere (*Larynx*, *Trachea*, Bronchialbaum der Lunge) Atemwege einteilen. Dabei findet der eigentliche Gasaustausch im unteren, respiratorischen Atemtrakt statt (Fox et al. 2007). Der respiratorische Teil besteht aus den *Bronchioli respiratorii* (nicht vorhanden bei der Maus, siehe Tabelle 1), *Alveolarducti*, Alveolarsäckchen und Lungenbläschen (*Alveoli*) (Fox et al. 2007; Irvin & Bates 2003).

Durch Konvektion gelangt sauerstoffreiche Luft über das luftleitende System in das respiratorische System. Anschließend diffundiert der Sauerstoff über die Blut-Gas-Schranke in das Lungenkapillarblut. Hier wird das sauerstoffreiche Blut durch Konvektion im Körper verteilt. Letztlich gelangt der Sauerstoff über Diffusion in die Zellen der verschiedenen Gewebe (Junqueira et al. 2005; Schmidt et al. 2000). Über die gleichen Wege wird Kohlenstoffdioxid (CO₂) zurückgeleitet.

Der Aufbau der Lunge der Maus unterscheidet sich in einigen Merkmalen von dem des Menschen. Einige dieser Unterschiede sind in der folgenden Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Vergleich der anatomischen Besonderheiten der Lunge von Maus und Mensch, nach (Fox et al. 2007; Irvin & Bates 2003)

	Maus	Mensch
Anzahl Lungenlappen	5 Lappen – 4 rechts, 1 links	5 Lappen – 3 rechts, 2 links
Lungenparenchym/vollständiges Lungenvolumen	18 %	12 %
Totale Lungenkapazität	1 ml	6000 ml
Alveolen (Durchmesser)	39 - 80 µm	200 - 400 µm
Dicke der Blut-Gas-Schranke	0,32 µm	0,62 µm
Trachea	Knorpel weniger organisiert, nur der obere Trachealabschnitt hat vollständige Ringe	Vollständige Trachealringe
Anzahl Atemwegsgenerationen	13 - 17	17 – 21
Durchmesser Hauptbronchus	1 mm	10 - 15 mm
Aufzweigungsart	monopodial	Dichotom
Durchmesser Bronchioli	0,01 - 0,05 mm	<1 mm
Durchmesser Terminalbronchus	0,01 mm	0,6 mm
Luftleitendes System	Nase → Rachen (<i>Pharynx</i>) → Kehlkopf (<i>Larynx</i>) → Luftröhre (<i>Trachea</i>) → Hauptbronchien (<i>Bronchus principalis dexter et sinister</i>) → Lappenbronchien (<i>Bronchi lobares</i>) → Segmentbronchien (<i>Bronchus segmentalis</i>) → Subsegmentbronchien (<i>Bronchus subsegmentalis</i>) → Bronchioli → Terminalbronchiolen (<i>Bronchioli terminales</i>)	
Respiratorisches System	Alveolarduktus (<i>Ductus alveolaris</i>) → Alveolarsack (<i>Saccus alveolaris</i>) → Alveolen	<i>Bronchioli respiratorii</i> → Alveolarduktus (<i>Ductus alveolaris</i>) → Alveolen
Histologische Besonderheiten	Wenige bis keine Becherzellen, hohe Anzahl an Clara-Zellen	Becherzellen, Clara-Zellen

Insgesamt besitzt die humane Lunge ca. 300 Millionen Alveolen. Die Gesamtoberfläche der Lunge in der Inspiration beim erwachsenen Menschen beträgt 55 – 80 m² und bei starker Expiration weniger als 40 m² (Leonhardt 1990).

Histologie und Aufbau der alveolokapillären Barriere

Die Alveolen sind im Querschnitt hexagonal und jede Alveole wird von 4 - 12 Kapillaren umspinnen. Der die Alveole bildende Raum wird von der Alveolarwand umgeben. Diese Wand besteht vorwiegend aus 2 Arten von Epithelzellen, den Deckzellen (Pneumozyten Typ I) und Nischenzellen (Pneumozyten Typ II). Pneumozyten Typ I-Zellen sind extrem dünne, abgeplattete Zellen, deren Kernbereiche geringfügig ins Lumen vorspringen. Typ I-Zellen bilden einen geschlossenen Verband und kleiden etwa 95 % der inneren Alveolaroberfläche aus. Sie sind arm an Zellorganellen und liegen eng an einer dünnen Basalmembran (König & Liebich 1999). Pneumozyten Typ II sind 10 – 12 µm große, keil- bis kugelförmige, organellreiche Zellen, die als kleine Gruppen in den Alveolarnischen liegen. Auffällig ist der große Gehalt an Zytosomen in diesen Zellen. Zytosome sind Sekretgranula mit einem hohen Gehalt an Phospholipiden, Glukosaminoglykanen und sauren Phosphatasen. Nach Exozytose bilden sie das oberflächenaktive Surfactant, das in seiner Detergenzwirkung die Oberflächenspannung der Alveolarwand um den Faktor 5 bis 10 reduziert (König & Liebich 1999). Zwei benachbarte Alveolen werden durch das Alveolarseptum (*Septum interalveolare*) voneinander getrennt (Leonhardt 1990).

Die Blut-Luft-Schranke setzt sich aus dem Kapillarendothel und den Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) zusammen. Die Basallaminas beider Zellarten sind miteinander verschmolzen. Das Kapillarendothel ist nicht fenestriert und die Endothelzellen sind durch *Zonulae occludentes* miteinander verbunden. Teilweise ist zwischen dem Alveolarseptum und der Kapillare Bindegewebe eingelagert, so dass nur ein Teil der Kapillare für einen effektiven Gasaustausch an die Alveolarzellen angelagert ist (Leonhardt 1990).

Der Gasaustausch von der Alveole zu den Erythrozyten des Blutes erfolgt über folgende histologische Strukturen:

Surfactant auf der Oberfläche des Alveolarepithels → Zytoplasma der Pneumozyten Typ I → Basalmembran des Alveolarepithels → Basalmembran der Kapillarwand → Zytoplasma des Endothels der Kapillarwand → Blutplasma → Plasmalemm des Erythrozyten (König & Liebich 1999).

Dieser spezielle anatomische Aufbau lässt vermuten, dass jegliche Änderungen in der Weite und Dicke der einzelnen Abschnitte Veränderungen und Beeinträchtigungen der respiratorischen Funktionen bewirken (König & Liebich 1999).

Das vaskuläre Endothel bildet die semipermeable Innenfläche aller Blutgefäße des Körpers. Das ruhende Endothel bildet eine antithrombotische und antiinflammatorische Oberfläche,

die einen ungehinderten Blutfluss gewährleistet und den Gefäßtonus reguliert. Das Endothel reagiert schnell auf Verletzungen und Entzündungen durch Regulation der Blutgerinnung und Kontrolle des Ein- und Austrittes von Plasma und Leukozyten in und aus dem Blutkreislauf (Fiedler & Augustin 2006; Ochoa & Wu 2010).

In den Alveolen sowie im alveolären Bindegewebe befinden sich verschiedene Abwehrzellen. Am häufigsten vertreten sind die Alveolarmakrophagen, welche aus dem Kapillarblut eingewanderte Monozyten sind. Im Bindegewebe finden sich weiterhin Lymphozyten und Makrophagen (Leonhardt 1990).

2.2 Immunsystem der Lunge

Der Verlauf und die Folgen einer Lungeninfektion sind größtenteils abhängig von der Virulenz des eindringenden Organismus und der inflammatorischen Antwort der Lunge. Durch angeborene Abwehrmechanismen wie den Hustenreflex, die mukozilliäre *Clearance*, antimikrobielle Proteine und körpereigene Abwehrzellen, wie die Alveolarmakrophagen, ist die Lunge größtenteils in der Lage, niedrig-virulente Erreger abzuwehren. Bei einer Infektion mit hochpathogenen Erregern kommt es jedoch häufig zu einer überschießenden Reaktion der körpereigenen Immunabwehr. Die übermäßige Produktion von Entzündungsmediatoren und –effektoren kann zur direkten Schädigung der Lunge führen und die Entstehung eines akuten Lungenschadens begünstigen, der zur Verminderung oder sogar zum Versagen der Lungenfunktion führen kann (Mizgerd 2008).

Wie im gesamten Körper besteht auch die Abwehr der Lunge aus einer angeborenen, unspezifischen und einer erworbenen, spezifischen Abwehr. Zur angeborenen Abwehr gehören u.a. die Alveolarmakrophagen und die Dendritischen Zellen. Alveolarmakrophagen sind in der Lunge ansässige, mobile Zellen, die auf der Alveolaroberfläche aktiv sind. Wie die Dendritischen Zellen entstammen sie der myeloischen Stammzelllinie und zählen zu den Sentinelzellen. Als Teil der angeborenen Abwehr besteht ihre Aufgabe darin, inhalierte Partikel zu entfernen und zu verdauen (Mizgerd 2008). Sobald die Lunge mit Pathogenen infiziert ist, sind sie in der Lage, durch die Freisetzung von Zytokinen, z.B. Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Interleukin 6 (IL-6) Alarmsignale auszusenden und weitere Abwehrmechanismen zu aktivieren. So wandern während einer pulmonalen Infektion beispielsweise neutrophile Granulozyten mit 3 – 4 h Verzögerung aus den kapillären Lungengefäßen in die Alveolen ein (Prince et al. 2006). Als Teil der unspezifischen Abwehr sorgen sie dort für die lokale Abwehr durch Mechanismen wie Phagozytose, die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen, NET-Bildung (NET, *neutrophil extracellular trap*) sowie Freisetzung antimikrobieller Proteine und degradierender Enzyme (Mizgerd 2008). Es konnte

zudem gezeigt werden, dass TNF- α über eine Kalzium-Erhöhung im Alveolarepithel und über das kapilläre Endothel zu einer Ausbreitung des chemotaktischen Signals in andere Lungenkompartimente führt (Prince et al. 2006). Diese akute Entzündung ist ein essentieller Teil der angeborenen Abwehr in der Lunge. Die Surfactantproteine A und D sind in der Lage, die Alveolarmakrophagen zu inhibieren. Sie supprimieren eine inflammatorische Antwort in der gesunden Lunge (Janssen et al. 2008).

Dendritische Zellen sind im gesamten Atemtrakt zu finden. Sie sind in der Lage durch die Gewebe zu migrieren und sorgen daher nach Antigenerkennung über Muster erkennende Rezeptoren (*pathogen recognition receptors*) im Lumen für die Antigenpräsentation in den Lymphknoten. Sie haben ebenfalls eine bedeutende Funktion in der erworbenen Abwehr, insbesondere bei der Erkennung und Abwehr viraler Infektionen. Dendritische Zellen vermitteln die Produktion von großen Mengen an Typ 1 Interferonen (Mizgerd 2008). Die Dendritischen Zellen und Makrophagen bilden mit ihrem humanen Leukozytenantigen II (HLA II, *human leukocyte antigen II*), beziehungsweise bei anderen Wirbeltieren entsprechend dem Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II, *major histocompatibility complex II*), und den Antigenen Komplexe, die den T-Zellen in den intrapulmonalen Lymphknoten, dem bronchus-assoziierten Lymphgewebe (BALT, *bronchial associated lymphoid tissue*) und Lungeninterstitium präsentiert werden (Wenisch 2006). Auch hier werden zahlreiche Zytokine gebildet, u.a. IL-1, welches die Gedächtniszellen zur Bildung von IL-2 (IL = Interleukin) anregt. IL-2 sorgt für weitere Proliferation und T-Zellaktivierung. Es kommt zu einer weiteren Aktivierung der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr und dadurch zur antimikrobiellen Wirkung (Wenisch 2006).

2.3 Die Pneumonie

Respiratorische Infektionen sind die mit Abstand häufigsten global erfassten Infektionskrankheiten (Wenisch 2006; Fauci & Morens 2012). Die WHO zählt die Infektion der tiefen Atemwege zur dritthäufigsten Todesursache weltweit (WHO 2011). Akute Entzündungen des unteren Atemtraktes (Pneumonien) stellen weltweit ein größeres Problem dar als HIV/AIDS (*human immunodeficiency virus; acquired immunodeficiency syndrome*), Malaria, Krebs oder Herzinfarkte (Mizgerd 2008; WHO 2011). In den USA führen sie jährlich zu mehr Neuerkrankungen und Todesfällen als jede andere Infektionskrankheit (Mizgerd 2008).

Wie bereits unter Punkt 2.2 erwähnt, ist die Schwere des Infektionsverlaufs von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören die Virulenz des Erregers, die immunologische Antwort der Lunge, aber auch Alter und Komorbidität des Patienten.

Pathologisch kennzeichnend für eine Lungenentzündung ist eine akute oder chronische Entzündung in den Alveolen und des umgebenden Parenchyms. Meist ist eine infektiöse, seltener eine allergische, chemische oder physikalische Genese ursächlich (Woodhead, 2002, Wenisch & Abteilung, 2006). Die Entzündung lässt sich an einer Gewebsverdichtung durch Exsudate und/oder Zellinfiltrate erkennen. Dies führt zu einer Verminderung des Luftgehaltes des Organes und somit zu einer Störung des pulmonalen Gasaustausches (Dahme et al. 1999).

Die Pneumonie lässt sich anhand ihrer Ätiologie in 4 Klassen unterteilen. Als CAP bezeichnet man Pneumonien, die bis zu 48 Stunden nach Einweisung in ein Krankenhaus auftreten und nicht die Kriterien einer HCAP (HCAP = *healthcare-associated pneumonia*) erfüllen. Die HCAP tritt bei Patienten innerhalb von 48 Stunden nach Einweisung in ein Krankenhaus auf und erfüllt mindestens einen Risikofaktor für eine Infektion mit einem MDR-Keim (MDR = *multidrug-resistant*). Dazu gehören: eine Hospitalisation für mehr als 2 Tage in einer Intensivpflegeeinrichtung innerhalb von 90 Tagen während einer Infektion; die Betreuung in einem Pflege- oder Altenheim; eine antimikrobielle Therapie, Chemotherapie oder Wundbehandlungen innerhalb von 30 Tagen nach dem Auftreten der Infektion; eine stationäre oder ambulante Hämodialyse, Infusionstherapie oder Wundversorgung im eigenen Heim oder die Infektion eines Familienmitgliedes mit einem MDR-Keim. Weiterhin werden die HAP (HAP = *hospital-acquired pneumonia*) und die VAP (VAP = *ventilator-associated pneumonia*) beschrieben. Die HAP tritt frühestens 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme auf. Zu den Risikofaktoren für eine Infektion mit MDR-Keimen, die eine HAP verursachen können, zählen: eine antimikrobielle Therapie innerhalb von 90 Tagen nach einer Infektion; eine aktuelle Hospitalisation von mehr als 5 Tagen; eine hohe Frequenz an Antibiotikaresistenz im Krankenhaus, sowohl in der gesamten Einheit als auch in der spezifischen Abteilung; eine immunsuppressive Erkrankung oder Therapie, oder das Vorhandensein von HCAP Risikofaktoren für MDR. Die VAP tritt frühestens 48 Stunden nach einer endotrachealen Intubation auf. Als Risikofaktoren für eine Infektion mit MDR-Keimen, die zu einer VAP führen können, sind die Präsenz von HCAP oder HAP zu nennen (Anand & Kollef 2009). Dieses System wird von der *American Thoracic Society* verwendet.

Nach einem anderen, leicht abgewandelten deutschen Ordnungsprinzip unterteilt man die Pneumonie in die CAP und die GAP (Wenisch 2006). Der GAP werden alle dem Gesundheitssystem assoziierten Pneumonien zugeordnet, d.h. Pneumonien, deren direkte Ursache im Zusammenhang mit einer medizinischen Tätigkeit steht. Zur GAP zählen die nosokomiale Pneumonie (NAP), die Ventilator-assoziierte Pneumonie (VAP) und die Pflegeheim-assoziierte Pneumonie (PAP). Von einer NAP wird gesprochen, wenn die Pneumonie frühestens 48 Stunden nach der Einweisung ins Krankenhaus aufgetreten ist.

Die Beatmungspneumonie (BAP), auch Ventilator-assoziierte Pneumonie (VAP) genannt, tritt frühestens 48 Stunden nach der Einweisung in ein Krankenhaus durch endotracheale Intubation auf. Die Pflegeheim-assoziierte Pneumonie (PAP) tritt spezifisch bei Patienten auf, die in Pflegeheimen versorgt werden (Wenisch 2006; Rubenfeld et al. 2005).

Die ambulant erworbene Pneumonie

In den westlichen Industrienationen ist die CAP die am häufigsten letal verlaufende Infektionskrankheit (Kohlhammer et al. 2005). In Europa gilt die CAP als substantielle wirtschaftliche und klinische Bürde (Welte et al. 2012), und auch in Deutschland stellt die CAP die wichtigste Infektionskrankheit dar (Welte et al. 2006). Jedes Jahr kommt es zu einem weiteren Anstieg der Pneumonieinzidenz um 3 – 5 %, da durch die Zunahme älterer, multimorbider Patienten ein demographischer Wandel erfolgt (Bauer et al. 2006; Welte et al. 2006). Ein weiteres großes Problem in der Behandlung von Patienten mit einer Pneumonie stellt die zunehmende Entwicklung von Antibiotikaresistenzen dar, besonders nach einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* (Bradley & Scheld 1997; Applebaum 1987). Unabhängig von Alter, Anzahl der Komorbiditäten und Nationalität der Patienten stellt *Streptococcus pneumoniae* mit Abstand den häufigsten Erreger einer CAP dar (Woodhead 2002; Ruiz et al. 1999), gefolgt von: *Haemophilus influenzae* (10 – 20 %), *Mycoplasma pneumoniae* (10 – 12 %), *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catharralis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*.

Alleine oder oft in Verbindung mit einer bakteriellen Infektion (10 – 25 %) werden bei der CAP auch Viren nachgewiesen, wie z.B. Influenzaviren, Respiratorisches Synzytialvirus, Adeno- und Coronaviren (Wenisch 2006; Woodhead 2002; Huntemann & Lorenz 2004). Zu den Risikofaktoren für die ambulant erworbene Pneumonie gehören ein niedriges oder hohes Lebensalter (≤ 5 Jahre, ≥ 65 Jahre), Rauchen und bestehende Komorbiditäten wie eine vorausgegangene Virusinfektion (z.B. Influenzavirus), chronisch-obstruktive Erkrankungen der Lunge, Herzinsuffizienz, chronische Leber- und Nierenerkrankungen, *Diabetes mellitus*, Bewusstseinsstörungen und Beeinträchtigungen des Schluckaktes mit nachfolgenden Aspirationen (Wenisch 2006; Huntemann & Lorenz 2004; File 2004; Ruiz et al. 1999).

Im Jahr 2005 wurden erstmalig von der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie und dem Kompetenznetzwerk CAPNETZ „Leitlinien zu Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobieller Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen tiefen Atemwegsinfektionen“ herausgegeben. In einer

Überarbeitung dieser Leitlinie wird die ambulant erworbene Pneumonie als „eine akute mikrobielle Infektion des Lungenparenchyms des erwachsenen Patienten ohne Abwehrschwäche und unter Ausschluss einer im Krankenhaus bzw. innerhalb der ersten vier Wochen nach Entlassung erworbenen Pneumonie“ definiert (Höffken et al. 2009). Ziel dieser Leitlinie ist es, Standards in der Therapie und in der Diagnostik von Patienten mit CAP zu etablieren und gleichzeitig die Resistenzlage bei Antibiotikaeinsatz durch reduzierten Gebrauch und präziseren Einsatz zu verbessern. Ärzten soll zudem die Diagnose und die Einteilung der CAP nach Stadien und deren jeweilige Prognose vereinfacht werden. Längerfristig soll dies zu größeren Behandlungserfolgen und somit zu einem besseren Überleben der Patienten und gleichzeitig zu einer Senkung des wirtschaftlichen Aufwandes bei der intensivmedizinischen Betreuung führen.

CAPNETZ

Im Kompetenznetzwerk CAPNETZ werden alle klinischen und mikrobiologischen Daten aus einer Vernetzung verschiedenster medizinischer Bereiche zusammengeführt und in einer zentralen Material- und Informationsdatenbank in Ulm verwaltet. Ziel ist es, dadurch die Versorgungsqualität und langfristig durch Forschung das Überleben von Patienten mit CAP zu verbessern. Diese Netzwerke und Datenbanken, Forschungsmöglichkeiten und Informationstechnologien sind von allen Beteiligten jederzeit abrufbar und nutzbar (Bauer 2006). Im Jahr 2007 wurde CAPNETZ zu einer Stiftung mit dem Zweck der Förderung wissenschaftlicher Arbeiten zum Thema CAP erklärt. Stifter sind die Charité – Universitätsmedizin Berlin, die Medizinische Hochschule Hannover und die Universität Ulm (CAPNETZ n.d.).

2.4 *Streptococcus pneumoniae*

Die „Pneumokokken“ wurden 1881 von Georg Miller und Louis Pasteur unabhängig voneinander erstmalig isoliert. Die Art *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*, Pneumokokken) gehört zur Ordnung der *Lactobacillales*, der Familie der *Streptococcaceae* und zur Gattung *Streptococcus*. Pneumokokken sind gram-positive Bakterien (Hahn et al. 2009; Mayr 2007). Charakteristisch ist ihre oval- bis lanzettförmige Form und die paarige Lagerung, weshalb sie auch als Diplokokken bezeichnet werden. Sie sind fakultativ anaerob (bevorzugt 5 % CO₂), Oxidase und Katalase negativ. Auf Blutagarplatten lassen sich durch Hämoglobinreduktion die grünlichen Abbauprodukte der α -Hämolysen nachweisen. Zudem sind 98 % der Pneumokokkenisolate gallelöslich und optochinempfindlich. Die serologische Einordnung in eine Gruppe nach Lancefield ist nicht möglich (Hahn et al. 2009; Mayr 2007). Beim Menschen sind mittlerweile 40 Serogruppen mit mehr als 90 Serotypen von

S. pneumoniae beschrieben worden (Kadioglu et al. 2008; Henrichsen 1999), wobei jeder Serotyp über eine eigene, spezifische Polysaccharidkapsel verfügt.

Die Zellwand der Bakterien besteht überwiegend aus Peptidoglykanen, Teichon- und Lipoteichonsäuren. Die Zellwandstabilität wird durch zahlreiche Peptidseitenketten gewährleistet. Die Bakterienkolonien zeigen in Kultur einen schleimigen Glanz (S-Form, *smooth*). Es gibt jedoch einige unbekapselte, glanzlose Pneumokokkenstämme (R-Form, *rough*). Die Polysaccharidkapsel gilt als Hauptvirulenzfaktor der Pneumokokken, da sie die Opsonierung und somit Erkennung durch den Wirt verhindert. Unbekapselte Stämme gelten *in vivo* als avirulent (Mitchell 2000; Hahn et al. 2009). Pneumokokken zählen zu den virulentesten humanen Pathogenen auf der Erde (Donkor 2013). Sie verursachen vorwiegend Krankheiten wie Pneumonien, Meningitiden, Bakteriämien (oft auch als Folge der Pneumonie) und *Otitis media* (Donkor 2013; Kadioglu et al. 2008). Circa 90 % der häufigsten Isolate von *S. pneumoniae* gehören zu den 23 Serotypen, für die mittlerweile eine 23-valente Pneumokokkenvakzine zur Verfügung steht (Tomita et al. 2011). Zu den weltweit am häufigsten nachgewiesenen Serogruppen zählen 6, 14, 19 und 23 (Henrichsen 1999; Hausdorff et al. 2000).

S. pneumoniae verfügt über viele verschiedene Pathogenitätsfaktoren. Dazu zählen u.a.: die Polysaccharidkapsel, die Zellwand, das Pneumolysin (PLY), Autolysine (LytA-C, *phosphorylcholine esterase*, *choline-binding protein D*), Hyaluronidase, C-Polysaccharid, IgA1-Protease, F-Antigen, Neuraminidasen, PspA (*pneumococcal surface protein A*), CbpA (*choline-binding protein A*), Superoxid-Dismutase (SOD), TCSs (*two-component systems*) und PsaA (*pneumococcal surface adhesin A*) (López et al. 2004; Mitchell 2000; Paterson et al. 2006; Hahn et al. 2009).

Einer der bedeutendsten Pathogenitätsfaktoren von *S. pneumoniae* ist das Pneumolysin (PLY), ein 53 kDa großes intrazelluläres Protein und multifunktionales Exotoxin, das zu den Thiol-aktivierenden Toxinen gehört. Es kommt in allen klinischen Isolaten vor (Jedrzejewski 2001; Feldman et al. 1990; Boulnois et al. 1991). PLY besteht aus vier Domänen, wobei die vierte für die Membranbindung wichtig ist. Die Freisetzung von PLY erfolgt hauptsächlich über das Autolysin LytA während der Pneumokokkenautolyse. Nach der Freisetzung bindet PLY an das Cholesterin auf der Doppellipidmembran der Wirtszelle, wird in die Membran eingebaut und induziert in hohen lytischen Konzentrationen die Bildung von Transmembranporen, wodurch es zur Lyse der Wirtszelle kommt (Jedrzejewski 2001). Weiterhin verstärkt PLY die proinflammatorische Antwort von Monozyten, führt zu einer T-Zell-vermittelten Antikörperantwort (IgA-Produktion und IgG-Zirkulation), hemmt die Lymphozytenproliferation, vermindert Neutrophilenmigration, interagiert mit Alveolarepithel-

und pulmonalen Endothelzellen und wirkt zytotoxisch auf das respiratorische Gewebe, u.a. durch Hemmung des Zilienschlages und Zerstörung von Zellverbindungen (Rubins et al. 1992; Steinfurt et al. 1989) bei gleichzeitiger Inhibierung von Phagozyten- und Immunzellfunktionen. In sublytischen Dosen hemmt PLY respiratorische Bursts von neutrophilen Granulozyten und Monozyten, Chemotaxis, bakterizide Aktivität und die Produktion von Lymphokinen und Chemokinen (Jedrzejewski 2001). PLY aktiviert den klassischen Weg des Komplementsystems durch Bindung an die Fc-Fragmente von Immunglobulin G (Boulnois et al. 1991).

S. pneumoniae besiedelt überwiegend die Schleimhäute des Nasopharynx. Die Besiedlung erfolgt entweder durch eine Bindung an Zellrezeptoren auf den Epithelzellen des Wirtes oder durch eine spezielle Verbindung mit zuvor selbst sekretierten Polysacchariden und Proteinen (Voss et al. 2012). Die Kolonisation des Nasopharynx ist in der Regel asymptomatisch und kann Wochen bis Monate persistieren. Breitet sich die Kolonisation jedoch in die sterilen Teile des Atemtraktes aus, setzt unmittelbar eine inflammatorische Antwort ein, die folglich zu einer Erkrankung führen kann. Die Übertragung erfolgt von Mensch zu Mensch über respiratorische Sekrete durch kolonisierte, vorwiegend asymptomatische Träger (Kadioglu et al. 2008; Donkor 2013).

Bemerkenswert für *S. pneumoniae* ist seine Bedeutung als Anthroozoonose. Der Mensch ist in der Lage, Primaten, Kälber, Fohlen, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Mäuse mit Pneumokokken zu infizieren (Songer & Post 2005; Quinn et al. 2001). Der Übertragungsweg in die andere Richtung wurde bislang nicht beschrieben (Kurt 1993).

2.5 Acute respiratory distress syndrome / acute lung injury*

Bis zum Jahr 2012 wurde das Lungenversagen in das akute Lungenversagen (ALI = *acute lung injury*) und in seiner schwersten Form das Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS = *acute respiratory distress syndrome*) eingeteilt. Sowohl das ALI als auch das ARDS sind durch eine akute pulmonale Entzündung und Gewebeschädigung charakterisiert, die die Gasaustauschfunktion der Lunge beeinflussen (Proudfoot et al. 2011). Der Begriff ARDS wurde erstmalig 1967 von Ashbaugh eingeführt (Ashbaugh et al. 1967).

Im Jahr 1994 wurde auf der amerikanisch-europäischen Konsensuskonferenz (AECC = *American European Consensus Conference*) eine allgemein gültige Definition von ALI und ARDS festgelegt (Bernard et al. 1994). Nach dieser Definition gelten als Anzeichen für das Vorliegen eines ALI eine Dysfunktion der alveolokapillären Membran, ein Influx inflammatorischer Zellen in die Alveolen und ein lokaler prokoagulatorischer Status. Patienten mit einem ALI präsentieren sich mit einer akuten, schweren Hypoxämie und

radiologisch nachweisbarem bilateralen, pulmonalem Ödem. Die klinischen Symptome für ARDS sind ebenfalls Kurzatmigkeit, Hypoxämie und das Vorhandensein eines röntgenologisch nachweisbaren diffusen, pulmonalen (nicht kardial bedingten) Ödems. Die Differenzierung des ALI vom ARDS erfolgt anhand des Schweregrades der Hypoxämie. Weniger schwere Gasaustauschstörungen mit einem Horowitz-Quotienten von P_aO_2/FiO_2 (arterieller Sauerstoffpartialdruck / inspiratorische Sauerstoffkonzentration) < 300 mmHg bzw. 40 kPa werden als ALI und eine schwere Hypoxämie $P_aO_2/FiO_2 < 200$ mmHg oder 26,7 kPa, werden als ARDS definiert (Bernard et al. 1994). Ein ALI entsteht oft nach Lungenschädigungen, z.B. in Folge einer Pneumonie, oder indirekt aus Erkrankungen, die über das Blut vermittelt werden, z.B. nach bakterieller Sepsis oder Multiorganversagen (Proudfoot et al. 2011; Ware 2006). Betroffen sind alle Altersgruppen, wobei die Inzidenz z.B. in den USA bei ca. 200 000 Fällen pro Jahr liegt. Die Mortalität beträgt ca. 35 % (Rubenfeld et al. 2005; Rubenfeld & Herridge 2007).

*Diese Definitionen zum ALI und zum ARDS sind mittlerweile obsolet. Sie dienen jedoch dem besseren Verständnis der vor dem Jahr 2012 veröffentlichten Fachliteratur.

Im Mai 2012 wurde von der *American Medical Association* eine neue Definition des ARDS in der sogenannten Berlin-Definition veröffentlicht, da die alte AECC-Definition nicht genügend Kriterien zur Abgrenzung zum ALI beinhaltet, die Sensitivität des PaO_2/FiO_2 zur Beurteilung bei verschiedenen Beatmungsarten ungenügend war, die Thoraxaufnahmen nicht verlässlich genug waren und es Schwierigkeiten bei der Unterscheidung zu hydrostatischen Ödemen gab. Die Kriterien eines ARDS nach der Berlin-Definition sind in Tabelle 2 zusammengefasst (TheARDSDefinitionTaskForce 2012).

Tabelle 2: Berlin-Definition des ARDS

Zeitliches Auftreten	Innerhalb von einer Woche nach Auftreten eines bekannten klinischen Ereignisses oder neuer oder Verschlimmerung respiratorischer Symptome
Bildgebung - Thorax	Bilaterale Infiltrate in Abwesenheit oder nicht verursacht durch Effusionen, Atelektasen oder Knoten
Ursprung des Ödems	Atemversagen nicht verursacht durch Herzversagen, Flüssigkeitsüberladungen; Objektive Bewertung (z.B. EKG) um hydrostatisches Ödem auszuschließen falls kein anderer Risikofaktor feststellbar ist
Oxygenierung	
<i>Mild</i>	$200 \text{ mm Hg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mm Hg}$ mit $\text{PEEP}^{**} \text{ oder } \text{CPAP}^{**} \geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$
<i>Moderat</i>	$100 \text{ mm Hg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mm Hg}$ mit $\text{PEEP}^{**} \geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$
<i>Schlecht</i>	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mm Hg}$ mit $\text{PEEP}^{**} \geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$

**PEEP (*positive endexpiratory pressure*) = positiv-endexpiratorischer Druck

**CPAP (*continuous positive airway pressure*) = Ein Beatmungsverfahren, welches die Spontanatmung des Patienten mit einem dauerhaften Überdruck (PEEP) kombiniert. (Downes 1976; Chowdhury et al. 2012; Striebel 2008)

2.6 Das Angiotensin/Tie2-System

2.6.1 Einleitung

Die Angiotensine sind sekretierte Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 75 kDa (McDonald 2001; Koh et al. 2002). Sie wurden erstmals in den 1990er Jahren identifiziert und einer Familie von Wachstumsfaktoren zugeordnet, die für das Blutgefäßwachstum essentiell sind (Thomas & Augustin 2009). Bislang sind vier Angiotensine bekannt: Angiotensin-1 (Ang-1) (Davis et al. 1996), Angiotensin-2 (Ang-2) (Maisonpierre et al. 1997), Angiotensin-3 (Ang-3) (Nishimura et al. 1999) und Angiotensin-4 (Ang-4) (Valenzuela et al. 1999). Alle Angiotensine sind Liganden der Rezeptor Tyrosin-Kinase Tie2. Die Angiotensine Ang-1 und Ang-2 sind derzeit am besten erforscht. Ang-3 wurde bislang nur in der Maus und Ang-4 nur im Menschen beschrieben (Valenzuela et al. 1999). Ang-1 und Ang-2 binden mit ähnlicher Affinität an den Endothel-spezifischen Rezeptor Tie2 (McDonald 2001; Koh et al. 2002).

In der Vergangenheit gab es bereits zahlreiche Veröffentlichungen über die Bedeutung des Ang/Tie2-Systems in der Embryogenese, in der Vaskularisation und im Tumorwachstum

(Suri et al. 1996; Gale et al. 2002; Nasarre et al. 2009; Huang et al. 2011; Oliner et al. 2004; Holopainen et al. 2009; Feng et al. 2009). Mittlerweile konnte aber auch gezeigt werden, dass das Ang/Tie-Liganden Rezeptor System einen direkten regulatorischen Einfluss auf die Endothelstabilität und -integrität hat und an der Regulation von Inflammation beteiligt ist (Baffert et al. 2006; Gamble et al. 2000; Lemieux et al. 2005). Eine durch Ang-1 vermittelte Tie2-Aktivierung gewährleistet ein Ruhen des Endothels (Fukuhara et al. 2010). Diese agonistische Rezeptorwirkung wird durch den kompetitiven Antagonisten Ang-2 inhibiert (Scharpfenecker et al. 2005).

2.6.2 Angiopoietin-1

Ang-1 hat eine bausteinartige Struktur, bestehend aus einer Rezeptorbindungsdomäne, einem Dimerisationsmotiv und einem Superclusteringmotiv, welches unterschiedlich große Multimere formt. Tetramere sind die kleinste Einheit, die den endothelialen Tie2-Rezeptor aktivieren, jedoch können künstliche Dimere den Tie2-Rezeptor antagonisieren (Davis et al. 2003). Ang-1 besitzt 498 Aminosäuren und befindet sich auf Chromosom 8q22 (Maisonpierre et al. 1997). Ang-1 wird von perivaskulären Zellen und glatten Muskelzellen produziert (Meurs et al. 2009), ist ein natürlicher Agonist von Tie2 und reguliert Endothelzell-Überleben und Blutgefäßreifung (Suri et al. 1996). Es hat zudem einen Gefäß-stabilisierenden Effekt (Thurston et al. 2000), antiinflammatorische Wirkung (Gamble et al. 2000; Jeon et al. 2003; Ramsauer & Amore 2002), schützt vor herztransplantationsbedingter Arteriosklerose (Nykänen et al. 2003) und strahlungsinduzierter Endothelzellschädigung (Cho et al. 2004). Ang-1 agiert parakrin (Fiedler et al. 2004). Eine homozygote Ang-1-Defizienz (Ang-1^{-/-}) führt bei Mäusen zu embryonaler Sterblichkeit (Suri et al. 1996). In transgenen Mäusen hingegen, die Ang-1 überexprimieren, wird eine verstärkte Vaskularisation (Suri et al. 1998) sowie eine verminderte Permeabilität des vaskulären Endothels (Thurston et al. 2010) beobachtet. Ang-1 verhindert im adulten Gefäßsystem nicht nur einen Plasmadurchtritt durch das Endothel, z.B. durch eine Reduktion der Größe und Anzahl endothelialer Lücken (Thurston et al. 2000; Baffert et al. 2006), sondern es wirkt auch antiinflammatorisch, u.a. durch Reduktion der VEGF-stimulierten Leukozytenadhäsion (VEGF = *vascular endothelial growth factor*) (Kim et al. 2001), durch die Inhibition der von TNF- α -stimulierten Leukozyten-Transmigration (Gamble et al. 2000) und durch das Unterbinden der IL-8-Produktion (Pizurki et al. 2003). Außerdem verhindert Ang-1 Apoptose durch Inhibition einer durch FOXO1 (FOXO1 = *forkhead box protein O1*) geregelten Genexpression (Daly et al. 2004), via Hochregulierung von Survivin (Papapetropoulos 2000) und durch eine Inhibition der smac-Freisetzung (smac = *second mitochondria-derived activator of caspase*) aus Mitochondrien (Harfouche et al. 2002).

2.6.3 Angiopoietin-2

Ang-2 ist ein natürlicher Antagonist für Ang-1 und dessen Rezeptor Tie2. Die Basenpaarlänge beträgt 496 Aminosäuren. Menschliches Ang-2 und das von Mäusen weisen eine 85 %ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz auf. Eine Homologie gegenüber Ang-1 besteht zu 60 %. Ang-2 besitzt ein NH₂-terminales (*coiled-coil*) Ende und eine COOH-terminale Fibrinogen-ähnliche Domäne (Maisonpierre et al. 1997). Ang-2 hat ähnlich wie Ang-1 einen bausteinartigen Aufbau. Der Multimerisationsstatus ist ebenfalls derselbe. Es wurde beschrieben, dass die Antagonistenaktivität in der Rezeptorbindungsdomäne kodiert ist (Davis et al. 2003).

Das Fehlen des Ang-2-Gens führt zunächst nicht zu einem Vitalitätsverlust. Ang-2-defiziente (Ang-2^{-/-}) Tiere werden klinisch unauffällig geboren und weisen phänotypisch keine Veränderungen auf (Gale et al. 2002). Funktionell ist ihr Blut- und Lymphsystem intakt und weist nur geringgradige Veränderungen wie z.B. eine persistierende proliferative Retinopathie auf (Feng et al. 2009). Jedoch entwickelt, in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund, eine signifikante Anzahl der neugeborenen Ang-2-defizienten Mäuse eine letale chylöse Aszites innerhalb der ersten Tage *post natum* aufgrund ungeklärter Defekte des lymphatischen Systems (Gale et al. 2002). Im Gegensatz zu der relativ milden Verlaufsform des Ang-2^{-/-} Phänotyps haben transgene Mäuse, die Ang-2 überexprimieren, einen letalen Phänotyp, der sich wie bei Ang-1- und Tie2-defizienten Tieren auswirkt (Maisonpierre et al. 1997; Suri et al. 1996; Davis et al. 1996). Zudem zeigten Ang-2^{-/-} Mäuse eine langsamere Immunantwort und einen stark reduzierten Influx neutrophiler Granulozyten in peritonealer Lavage-Flüssigkeit nach Thioglycollate-Gabe (Fiedler et al. 2006).

Ang-2 destabilisiert und stimuliert das Endothel derart, dass es leichter auf weitere exogene Stimuli anspricht. Ang-2 erleichtert somit die Wirkung inflammatorischer und angiogener Zytokine wie TNF- α , IL-1 oder VEGF. Auch im ruhenden Endothel sind stets niedrige Ang-2-Mengen nachweisbar, wobei es erst nach Endothelaktivierung zur Hochregulation der Ang-2-Expression kommt (Fiedler & Augustin 2006). Ang-2 wird in den Weibel-Palade *bodies* des Endothels gespeichert und auf einen Stimulus hin, z.B. Thrombin und Histamin, schnell und kurzfristig ausgeschüttet (Fiedler et al. 2004). Einmal sekretiertes Ang-2 bleibt meist löslich, wohingegen Ang-1 auch in gebundener Form an der extrazellulären Matrix gefunden wird (Xu & Yu 2001). Ang-2 dient somit als ein dynamischer Regulator und Schalter zwischen dem ruhenden, unempfindlichen und einem hoch empfindlichen, aktivierten Endothel (Fiedler & Augustin 2006). Ang-2 kann daher als potentieller Marker für Endothelaktivierung und -dysfunktion betrachtet werden (Rondaij et al. 2006). In der Lunge wird das Ang-2-Gen in bestimmten Situationen (z.B. bei Hyperoxygenierung) überexprimiert und übernimmt so

eine bedeutende Funktion bei der Regulation von Oxidationsschäden, epithelalem Zelltod und Entzündung (Bhandari et al. 2006).

2.6.4 Tie2-Rezeptor

Tie2 ist eine Rezeptor-ähnliche Tyrosinkinase, die von fast allen Endothelzellen und Zellen der hämatopoetischen Reihe exprimiert wird. Für die normale Entwicklung von Gefäßen während der Embryogenese ist Tie2 essentiell (Davis et al. 1996). Tie2-defiziente Mäuse versterben noch während der Embryogenese (Puri et al. 1995).

Der extrazelluläre Teil der Tie-Rezeptor Tyrosin Kinasen besteht aus einem kugeligen Kopfelement. Dieses setzt sich aus drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen, drei epidermalen Wachstumsfaktor-Modulen und einem kurzen, stabartigen Stiel aus drei Fibronectin III-Wiederholungen, die als Abstandhalter zur Angiopoietinbindungsstelle dienen, zusammen. Alternative Spleißprodukte führen zu verschiedenen Tie-Rezeptor-Typen, z.B. Tie2 ECD Fc (ECD = *extracellular domain*, Fc = *Fragment crystallizable*), Tie2 ECD, Tie2 (23-442), Tie2 Ig12 Fc (Ig = Immunoglobulin), Tie1 ECD Fc und Tie1 Δ EGF1 Fc (EGF = *epidermal growth factor*) (Macdonald et al. 2006; Partanen et al. 1992). Die Angiopoietinbindungsstelle befindet sich an einer Stelle mit Tandemwiederholungen der immunglobulinähnlichen Domänen am N-Terminus des Proteins (Partanen et al. 1992). Während der embryonalen Entwicklung exprimieren die Endothelzellen Tie1- und Tie2-Rezeptoren (Hashimoto & Pittet 2006). Tie1 besitzt einen homologen Aufbau zu Tie2 (Macdonald et al. 2006).

Während die Funktion von Tie2 mit seinem Ligandensystem bereits gut untersucht ist, gibt es über die Funktion von Tie1 kaum Erkenntnisse. So wurde herausgefunden, dass Ang-1 und Ang-4 eine Tie1-Phosphorylierung induzieren können und diese unter Tie2/Tie1-Heterodimer-Komplexbildung noch verstärkt werden kann (Saharinen et al. 2005; Milner et al. 2009). Im Tierversuch zeigten Tie1-defiziente Mäuse eine erhöhte Gefäßdichte bestehend aus „hyperaktiven“ Endothelzellen, woraus geschlossen wurde, dass Tie1 ebenfalls an der Regulation des endothelialen Ruhezustandes beteiligt sein könnte (Patan 1998).

2.6.5 Signaltransduktion des Angiopoietin/Tie2-Systems und Wirkung auf das Endothel

Bindet Ang-1 im ruhenden Endothel an die Rezeptortyrosinkinase Tie2, erfolgt eine Rezeptor-vermittelte Dimerisation und eine Rezeptorautophosphorylierung. Die so freigelegten Tyrosinreste dienen als hochaffine Bindungsstellen für verschiedenste intrazelluläre Signalmoleküle (Jones et al. 1999).

Nach erfolgter Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors durch Ang-1 werden die PI3K (PI3K = Phosphoinosid-3-Kinase) und Rac1 (Rac1 = *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) aktiviert, wodurch es wiederum zu einer Stimulation des p190RhoGTPase-aktivierenden Proteins kommt, welches zu einer Inaktivierung von RhoA (RhoA = *ras homolog family member A*) führt. Dies bewirkt eine Verminderung der F-Aktin Stressfasern und letztendlich eine Reduktion der endothelialen Permeabilität (Mammoto et al. 2007). Weiterhin blockiert Ang-1 den Inositol-tri-Phosphat (IP3) Rezeptor und verhindert dadurch einen extrazellulären Kalziuminflux, welcher durch den TRPC1-Ionenkanal (TRPC = *transient receptor potential channel*) gesteuert wird. Dies führte *in vitro* ebenfalls zu einer Reduktion endothelialer Hyperpermeabilität (Jho et al. 2005; Ahmed et al. 2004). Beschrieben wurde auch eine ERK1/2-abhängige (ERK = *extracellular-signal regulated kinase*) Aktivierung der Sphingosinkinase-1. Über diesen Weg steigert Ang-1 die Menge des Junctionproteins VE-Cadherin (VE = *vascular endothel*), was ebenfalls zu einer Verminderung endothelialer Hyperpermeabilität führt (Li et al. 2008). Ang-2 hingegen vermindert das Vorkommen von VE-Cadherin. Dieser Effekt ist durch Ang-1 antagonisierbar (Mammoto et al. 2007; Parikh et al. 2006).

Es wurde beschrieben, dass Ang-2 Kontext-abhängig agonistisch sowie antagonistisch am Tie2-Rezeptor wirken kann. Ang-2 wird zum Beispiel nach Stress von Endothelzellen über den Transkriptionsfaktor FOXO1 autokrin sekretiert und führt zu einer Inhibition des Tie2-Signalweges (Daly et al. 2006). In einer anderen Publikation wurde gezeigt, dass Ang-2 agonistisch in Ang-1-Abwesenheit und Dosis-abhängig antagonistisch in Anwesenheit von Ang-1 wirkt (Yuan et al. 2009). Im Gegensatz zur agonistischen Wirkung von Ang-1 ist die Ang-2-induzierte agonistische Antwort jedoch weniger ausgeprägt. Auch die Tie2-Rezeptoraffinität von Ang-2 im Vergleich zu Ang-1 ist wesentlich schwächer. Eine geringe gleichmäßige Dosis endogenes Ang-2 wird ständig von den Endothelzellen sekretiert. Diese Ang-2-Basalkonzentrationen sorgen in Abwesenheit von Ang-1 dafür, dass eine ständige Tie2-, PI3K- und Akt-Aktivität (Akt = Protein Kinase B) beibehalten wird und somit das Überleben der Endothelzellen und eine ständige Migration gewährleistet sind (Yuan et al. 2009).

Eine Endothelaktivierung verursacht eine vermehrte Freisetzung von Ang-2, welches die endotheliale Barriere destabilisiert und das Entzündungsgeschehen verstärkt (Lee & Liles 2011). *In vitro* zeigte sich, dass eine Ang-2-Behandlung (Konzentration 100 ng/ml) bei humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMVECs) zu einer erhöhten Bildung von dicken Aktin-Stressfasern und dem Auseinanderreißen der Zellverbindungen führt, welches sich in einer erhöhten interzellulären Lückenbildung bemerkbar machte (Parikh et al. 2006).

Außerdem sensibilisiert Ang-2 Endothelzellen z.B. für TNF- α und induziert spezielle Zelladhäsionsmoleküle (Fiedler et al. 2006).

Es ist allgemein bekannt, dass endotheliale Aktivierung und Dysfunktionen oft die Ursachen für Morbidität und Mortalität bei Sepsis und anderen schweren systemischen Erkrankungen sind. In deren Folge kommt es zum Integritätsverlust der mikrovaskulären Barriere, was zur Ödembildung, Schock und Multiorganversagen führen kann. SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*) ist eine Erkrankung, die oft nach einem schweren Trauma auftritt und ebenfalls durch eine überschießende proinflammatorische Reaktion unter Beteiligung des Endothels gekennzeichnet ist, die zu Multiorganversagen (MODS = *multi organ dysfunctions*) und somit zum Tod der Patienten führen kann. Kaninchen, die infolge eines experimentellen Traumas an einem SIRS früher verstarben, hatten höhere Ang-2-Serumwerte als Tiere mit einem späteren Todeszeitpunkt (Koutsostathis et al. 2011).

2.6.6 Bedeutung des Angiopoietin/Tie2-Systems bei Sepsis-induziertem Lungenversagen

In einer Studie über Patienten, die an einem septischen Schock infolge einer VAP erkrankt waren, konnten erhöhte Ang-2-Werte im Blut nachgewiesen werden. Patienten mit steigendem Schweregrad einer Sepsis wiesen steigende Ang-2-Werte auf (Orfanos et al. 2007). Patienten mit einem durch Sepsis-induzierten ARDS hatten höhere Ang-2-Werte als Patienten mit einem Sepsis-induzierten ALI* (Parikh et al. 2006). In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass Ang-2 wichtig für die Entstehung von Hyperoxie-bedingtem ALI* ist (Bhandari et al. 2006). Genetische Varianten der Ang-2-Gene können zu veränderten Aktivitäten des Proteins führen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine bestimmte Variation des Ang-2-Gens mit einem erhöhten ARDS-Risiko einhergeht. Dieses durch die Variation im Ang-2-Gen erhöhte Risiko war bei Patienten mit nicht Lungen-assoziierten Verletzungen ausgeprägter als bei Patienten ohne Lungen-assoziierte Verletzungen (Su et al. 2009).

2010 konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis der Plasma-Konzentration von Ang-2 zu Ang-1 eine Voraussage über die Sterblichkeit von ALI*-Patienten zulässt (Ong et al. 2010). 2011 folgte eine Veröffentlichung über die Verwendung von Ang-1- und Ang-2-Plasmakonzentrationen als prognostische Biomarker für eine Vorhersage von Morbidität und Mortalität bei der schweren Sepsis (Ricciuto et al. 2011). Bei beiden Veröffentlichungen ging eine Erhöhung der gemessenen Ang-2-Konzentrationen mit einer schlechteren Prognose und somit einer geringeren Überlebenschance der Patienten einher. Es konnte gezeigt werden, dass die Plasma Ang-2-Konzentrationen bei Patienten mit Sepsis-bedingtem ALI*

und Infektions-bedingtem ALI* in Hinsicht auf die Prognose und Pathogenität eines ALI* signifikante Aussagefähigkeiten haben (Calfee et al. 2012; Agrawal et al. 2013).

Eine Beteiligung des Ang/Tie2-Systems an der Beeinflussung der pulmonalen endothelialen Integrität unter Berücksichtigung vergangener Forschungsarbeiten ist bereits belegt. Es konnten u.a. Aussagen über einen prognostischen Wert von Ang-1 und Ang-2 für den Verlauf von Trauma, Sepsis und ALI* gemacht werden (Parikh 2013). Die Bedeutung des Ang/Tie2-Systems in der Pneumokokkenpneumonie wurde bislang noch nicht beschrieben.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchung von Serumproben von Pneumoniepatienten

3.1.1 Herkunft

Vergleich der Angiotensin-1- und Angiotensin-2-Konzentrationen im Serum von Pneumoniepatienten gegenüber gesunden Kontrollen (CAPNETZ Studie 1)

Für einen Vergleich des Ang-1- und Ang-2-Serumgehalts zwischen Pneumoniepatienten und gesunden Kontrollprobanden wurden von der CAPNETZ Stiftung zur Verfügung gestellte Serumproben analysiert. Diese Serumproben wurden bei einer Temperatur von -80 °C aufbewahrt. Die Charakteristika der Pneumoniepatienten und gesunden Kontrollprobanden sind in der nachfolgenden Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Charakteristika der Pneumoniepatienten und Kontrollprobanden in der CAPNETZ Studie 1

CAPNETZ Studie 1	Kontrollprobanden	Pneumoniepatienten
Probanden insgesamt	20	20
Frauen/Männer	10/10	10/10
Mittleres Alter ± SD	51.45 ± 7.16 Jahre	74.00 ± 10.24 Jahre
Nicht-letal/letal	20/0	15/5

Vergleich der Angiotensin-1- und Angiotensin-2-Konzentrationen im Serum von Pneumoniepatienten bei letalem und nicht-letalem Pneumonieverlauf (CAPNETZ Studie 2)

Für eine Untersuchung zum Vergleich des Ang-1- und Ang-2-Gehaltes bei verstorbenen (letal) und nicht verstorbenen (nicht-letal) Pneumoniepatienten wurden von der CAPNETZ Stiftung Blutserumproben und Patientendaten zur Verfügung gestellt. In die Studie aufgenommen wurden nur Patienten, die an einer Pneumonie mit einem CRB-65 (*confusion, respiratory, blood pressure, age ≥ 65*) (Bauer et al. 2006) von 0 - 3 erkrankt waren und innerhalb eines Überwachungszeitraumes von 28 Tagen entweder an der Pneumonie verstarben (28-Tage-Mortalität) oder diese überlebten. 100 Pneumoniepatienten erfüllten

diese Kriterien (n = 100). Allgemeine Charakteristika dieser Patienten sowie gesunder Kontrollprobanden zeigt Tabelle 4. Die Blutproben wurden innerhalb der ersten 24 h nach stationärer Aufnahme entnommen und das Serum ebenfalls bei einer Temperatur von -80 °C aufbewahrt.

Tabelle 4: a) und b) Charakteristika der Pneumoniepatienten mit letalem und nicht-letalem Verlauf im Vergleich zu Kontrollprobanden (CAPNETZ Studie 2)

a) Angaben zu Kontrollprobanden und Pneumoniepatienten

CAPNETZ Studie 2	Kontrollprobanden	Pneumoniepatienten
Probanden insgesamt	25	100
Frauen/Männer	10/15	42/58
Mittleres Alter ± SD	61,24 ± 5,09 Jahre	77,54 ± 10,16 Jahre
Nicht-letal/letal	25/0	42/58

b) Angaben zu Pneumoniepatienten

CAPNETZ Studie 2	Letal	Nicht-letal
Mittleres Alter ± SD (Frauen)	83,06 ± 8,00 Jahre (n = 21)	82,33 ± 8,99 Jahre (n = 15)
Mittleres Alter ± SD (Männer)	75,21 ± 8,93 Jahre (n = 37)	74,17 ± 10,78 Jahre (n = 27)

Vergleich der Angiotensin-2-Konzentration im Serum von Pneumoniepatienten bei letalem und nicht-letalem Verlauf (CAPNETZ Studie 3, Wiederholungsstudie)

Zur statistischen Validierung von Teilergebnissen der CAPNETZ Studie 2 erfolgte erneut eine Messung der Ang-2-Konzentration im Serum von Pneumoniepatienten. Hierfür wurden von der CAPNETZ Stiftung Proben anderer Patienten zur Verfügung gestellt und nach einer Fallzahlab-schätzung auf Grundlage der CAPNETZ Studie 2 ein größerer Probenumfang verwendet. Die Fallzahlschätzung wurde von Herrn Prof. Dr. Martus vom Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Es galten die gleichen Kriterien wie für die CAPNETZ Studie 2. 148 Pneumoniepatienten erfüllten diese Kriterien, deren Charakteristika in Vergleich zu Kontrollprobanden in der Tabelle 5 dargestellt sind.

Tabelle 5: a) und b) Charakteristika der Pneumonienpatienten mit letalem und nicht-letalem Pneumonieverlauf im Vergleich zu Kontrollprobanden (CAPNETZ Studie 3)

a) Angaben zu Kontrollprobanden und Pneumonienpatienten

CAPNETZ Studie 3	Kontrollprobanden	Pneumonienpatienten
Probanden insgesamt	47	148
Frauen/Männer	22/27	54/94
Mittleres Alter ± SD	59,32 ± 5,73 Jahre	76,39 ± 9,42 Jahre
Nicht-letal/letal	47/0	74/74

b) Angaben zu Pneumonienpatienten

CAPNETZ Studie 3	Letal	Nicht-letal
Mittleres Alter ± SD (Frauen)	77,67 ± 11,72 Jahre (n = 27)	77,67 ± 11,72 Jahre (n = 27)
Mittleres Alter ± SD (Männer)	75,66 ± 7,91 Jahre (n = 47)	75,66 ± 7,91 Jahre (n = 47)

Bestimmung der Angiotensin-1- und Angiotensin-2-Serumkonzentrationen im Verlauf eines Pneumonie-induzierten *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) (VALID Studie)

Zur Ermittlung der Ang-1- und Ang-2-Werte im Verlauf einer schweren Pneumonie wurden Blutserumproben der VALID Studienreihe der Firma Nycomed (Nycomed GmbH, Konstanz) analysiert (Spragg et al. 2011). Die darin inkludierten Patienten waren alle an einem durch Pneumonie-induzierten ARDS erkrankt und mussten intensivmedizinisch betreut und beatmet werden. Alle Patienten überlebten die ersten 30 Tage auf der Intensivstation. Die Ang-1- und Ang-2-Konzentrationen der Serumproben dieser Patienten wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt: direkt zu Beginn der intensivmedizinischen Behandlung sowie 24 Stunden und 7 Tage nach Beginn der intensivmedizinischen Behandlung. Ursprünglich wurde in der VALID Studie der therapeutische Nutzen von Surfactant untersucht. Die für diese Arbeit analysierten Proben stammen jedoch alle von Kontrollpatienten aus der VALID Studie und wurden daher nicht mit Surfactant behandelt. Die Charakteristika der Patienten sind in der Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Charakteristika der Patienten mit Pneumonie-induziertem ARDS im Vergleich zu Kontrollprobanden (VALID Studie)

VALID Studie 4	Kontrollprobanden	VALID-Patienten
Probanden insgesamt	25	38
Frauen/Männer	10/15	20/18
Mittleres Alter ± SD	61,24 ± 5,09 Jahre	59,26 ± 14,77 Jahre
Nicht-letal/letal	25/0	38/0

Als Kontrollproben diente in allen durchgeführten Studien das Serum gesunder Blutspender. Die Aufbewahrung der Serumproben erfolgte bei einer Temperatur von -80 °C.

3.1.2 Angiotensin-1- und Angiotensin-2-Quantifizierung

Die Quantifizierung der Proben bezüglich ihres Ang-1- und Ang-2-Gehaltes erfolgte mittels humanem Ang-1 und Ang-2 ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt). Nachdem die Proben auf Eis aufgetaut waren, wurden die ELISA-Untersuchungen nach Protokollvorlage des Herstellers durchgeführt. Die Messung der ELISA-Platten erfolgte bei einer Wellenlänge (λ) von 450 nm mit nachgeschaltetem 550 nm Filter zur λ -Korrektur am Anthos ht2 Mikroplatten Photometer (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld). Die Berechnung der Standardkurve und der Konzentrationen wurde mit der zugehörigen Software (Win Read Anthos) durchgeführt. Des Weiteren wurde das Ang-2/Ang-1-Verhältnis berechnet.

3.2 Marathonstudie

Während des Berlin-Marathons 2010 wurde gesunden Marathonläufern (n = 18) 24 h bis 48 h vor dem Lauf, unmittelbar nach Durchlaufen der Ziellinie und 24 h nach der Teilnahme am Marathon Blut an der *Vena mediana cubiti* in Blutentnahmeröhrchen (BD Vacutainer® für Serum, EDTA (Ethyldiamintetraacetat)-Blut und Litium-Heparin Plasma) abgenommen. Hierfür wurde ein Forschungszelt hinter der Ziellinie errichtet. Für die Serumgewinnung wurde das Blut nach einer Inkubation von 30 min bei 4 °C für 15 min zentrifugiert (1000 x g), das Serum abpipettiert und bei -80 °C gelagert. Gemessen wurden verschiedene klinische Laborparameter, inflammatorische Marker (Bioplex-Analyse, siehe auch Kapitel 3.7.6) sowie Ang-1 und Ang-2 mittels unter 3.1.2 beschriebener ELISA-Technik. Die CRP-Konzentration (CRP = C-reaktives Protein) aus Litium-Heparin Plasma sowie Leukozyten- und Neutrophilengehalt aus EDTA-Blut wurden mit freundlicher Unterstützung durch das Labor Berlin (Labor Berlin - Charité Vivantes GmbH) ermittelt. Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen der RUNINFLAME-Studie unter der Leitung von Dr. Ralf-Harto Hübner und Dr. Jan-

Moritz Doehn (beide Charité - Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik m.S. Infektiologie und Pneumologie, Berlin). Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission in Berlin unter der Nummer EA1/141/10 genehmigt.

3.3 Immunhistologie

Die immunhistologische Aufarbeitung und Beurteilung der humanen Lungenproben wurde freundlicherweise von den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie (Lars Morawitz, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Institut für Pathologie, Berlin) durchgeführt. Dabei wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

Lungengewebeproben mit und ohne Anzeichen einer akuten Pneumonie wurden aus dem Archiv des Institutes für Pathologie bereitgestellt. Bei den Proben handelte es sich um klinisches Autopsiematerial von Patienten, die in der Charité – Universitätsmedizin Berlin aufgrund eines Atemstillstandes oder an Herzversagen verstorben waren. Alle Patienten hatten nach ausführlicher Information ihr Einverständnis für den wissenschaftlichen Gebrauch ihrer Gewebe im Falle einer Operation oder ihres Todes gegeben. Ursprünglich wurden alle Gewebeproben zum diagnostischen Gebrauch entnommen und nicht für Forschungszwecke. Die Diagnose Pneumonie basierte auf den klinischen Angaben der behandelnden Ärzte sowie auf der Aussage, dass histologisch neutrophile Granulozyten-Infiltrate und Fibrin in den Alveolen nachweisbar waren, ebenso wie Makrophagen, einige Lymphozyten und Plasmazellen. Infiltrate, wie sie insbesondere bei neoplastischen Erkrankungen auftreten, wurden ausgeschlossen. Zusätzliche mikrobiologische Analysen wurden nicht durchgeführt. Die Autopsie erfolgte zwischen ein und drei Tagen *post mortem*. Kontrollgewebe ohne Pneumonie stammte aus Proben von Lobektomien zur Resektion bösartiger Tumore. In diesen Fällen wurden ein oder zwei Gewebelöcke von Gewebeproben mit Abstand vom Tumor nach Routineverfahren eingebettet. Die Proben wurden für die aktuelle Studie verwendet, wenn sie histologisch unauffällig und ohne Zeichen jedweder Pathologie waren. Die Gewebeproben wurden sofort nach ihrer Entnahme in 4 % Formaldehydlösung für ein bis zwei Tage fixiert und daraufhin in Paraffin eingebettet. Nach Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wurden die Proben mikroskopisch untersucht, um die oben genannten histologischen Kriterien zu evaluieren. Von den selektierten Blöcken wurden Gewebeschnitte von 1 – 2 µm Dicke auf Superfrost+ Objektträger überführt. Für das Antigen-Retrieval wurden die Schnitte im Citrat-Puffer mit Hilfe eines Druckkochers erhitzt. Der monoklonale Maus Ang-2-Antikörper (SC-74403, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:100 in Verdünnungsmedium (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Weitere Immunfärbungen wurden mit Antikörpern durchgeführt, die gegen Ang-1 (AP07808SU-N,

Acris Antikörper GmbH, Herford, Deutschland, Verdünnung 1:100 in Verdünnungsmedium, Inkubation über Nacht bei 4 °C), und Tie2 (GT15148, Acris, Verdünnung 1:100, Inkubation 30 min bei Raumtemperatur) gerichtet waren. Die Endogene Peroxidase wurde mit Wasserstoffperoxid geblockt. Zur Antikörperdetektion wurde das LSAB™ + HRP (*horseradish peroxidase*) Kit (Dako, Glostrup, Dänemark) verwendet. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Die immunhistochemisch angefärbten Schnitte wurden mit einem Standardmikroskop (Leitz DMRBE, Leica, Wetzlar, Deutschland) bei einer Vergrößerung von 25 x bis 400 x untersucht.

3.4 Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS)

Prinzip

Im ECIS erfolgte die Bestimmung des Wechselstromwiderstandes (Impedanz) einer Zellschicht, der sich aus der Frequenz eines Erregersignals ergibt. Abgeleitet daraus ergeben sich nähere Informationen über Morphologie und Dynamik der Zellschicht.

In diesem Modell wird ein niedriger Strom mittels Goldelektroden durch einen Zellmonolayer geleitet. Die Zellen in ihrem dichten Zellverband bilden dabei einen charakteristischen Widerstand. Wird dieser Zellverband durch exogene Faktoren so beeinflusst, dass die Zellverbindungen verloren gehen, sinkt der Widerstand, so dass der Strom nahezu ungehindert durch die Versuchsanordnung fließen kann. Daher bedeutet ein Absinken des transzellulären Widerstandes eine Erhöhung der Permeabilität des Zellmonolayers. Diese Methode kann mit verschiedenen Zellarten/-linien durchgeführt werden (Giaever & Keese 1993; Tirupathi et al. 1992).

Zellisolierung und Versuchsaufbau

Nach Isolation der Endothelzellen aus humanen Nabelstrangvenen (HUVECs = *human umbilical cord vein endothelial cells*) (Schnittler 1990; Hippenstiel et al. 2000) wurden diese auf den Messarrays in die 8 zuvor gelatinisierten Messkammern, die jeweils 10 Goldelektroden enthielten (8W10E Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA), kultiviert. 16 Stunden vor Versuchsbeginn erfolgte ein letzter Mediumwechsel (400 µl Endothelial Basal Medium + 25 % ECGM (*endothelial cell growth medium*) + 2 % FCS (*foetal calf serum*) pro Messkammer) und die weitere Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 Vol-% CO₂. Vor Versuchsbeginn wurden 2 Arrays in die Messkammer (37 °C, 5 Vol-% CO₂) eines computergesteuerten Impedanz-Analysators

(Applied BioPhysics®, Applied Biophysics Inc, Troy, New York, USA) je zwischen eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode gespannt. Während des Versuches wurde Strom mit konstanter Stromfrequenz (4000 Hz) und Spannung (1 V) durch die Versuchsanordnung geleitet. Es folgte eine einstündige Baseline-Phase. Die im Versuch erhaltenen Daten wurden synchron durch den PC aufgezeichnet und gespeichert.

Die Zellisolierung und Kultivierung wurde freundlicherweise von Doris Stoll (Charité - Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

3.4.1 Stimulation von humanen umbilicalvenösen Endothelzellen mittels Pneumolysin und Thrombin im ECIS

Lagen im Verlauf der Baselinephase die Widerstände der Zellmonolayer in den Vertiefungen bei 900 bis 1000 Ω , konnten die Zellen anschließend mit verschiedenen Konzentrationen Pneumolysin (1,0 $\mu\text{g/ml}$, 1,5 $\mu\text{g/ml}$, 2,0 $\mu\text{g/ml}$) und Thrombin (0,5 U/ml) in einem Volumen von 4 μl pro Vertiefung stimuliert werden (pro Stimulationsgruppe jeweils zwei Vertiefungen pro Array als Doppelbestimmung). Dazu wurde der Inkubator des Impedanzanalysators vorsichtig geöffnet und die jeweiligen PLY-Konzentrationen bzw. PBS (*phosphate buffered saline*) als Kontrolllösung möglichst schnell und gleichmäßig über die Goldelektroden der jeweiligen Vertiefung pipettiert. Nach Schließen des Inkubators folgte eine dreistündige computergestützte Aufzeichnung von Impedanz, Resistance und Kapazität. Im Anschluss an diese Versuche wurden jeweils die Überstände aus den Vertiefungen entnommen, die Doppelbestimmungen jeweils zusammengenommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für anschließende Untersuchungen aufbewahrt.

3.4.2 Quantifizierung von Angiopoietin-2 und Interleukin-6 in den Zellüberständen

Die Zellüberstände aus den unter 3.4.1 durchgeführten Versuchen wurden auf Eis aufgetaut und mittels ELISA auf ihre Ang-2-Konzentrationen (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt; Protokoll nach Herstellerangaben) sowie auf ihre IL-6-Konzentrationen (BD, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg; Protokoll nach Herstellerangaben) untersucht.

3.4.3 Stimulation von humanen umbilicalvenösen Endothelzellen mit Angiopoietin-2 im ECIS

Nach einer einstündigen Einlaufphase musste ein gleichmäßiger Verlauf des transzellulären elektrischen Widerstandes von 900 – 1000 Ω an den *Monolayern* der HUVECs pro Vertiefung messbar sein. Dann folgte eine Stimulation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (200 ng/ml, 2000 ng/ml) von zuvor gemäß Herstelleranleitung in BSA (bovines Serumalbumin) und PBS gelöstem Ang-2 (R&D Systems) und einer Kontrolllösung

(5000 µg BSA in 1 ml PBS) mit jeweils einem Gesamtvolumen von 8 µl pro Vertiefung. Nach dieser Stimulation erfolgte eine sechsstündige computergestützte Aufzeichnung von Impedanz, Resistance und Kapazität des durch den Zellmonolayer geleiteten Stromes.

3.5 Tierversuche

3.5.1 Tiere

Die Pneumokokken-Infektionsversuche erfolgten mit weiblichen C57Black/6N-Wildtyp-Mäusen (C57BL/6N) im Alter von 8 Wochen und einem Gewicht von 18 – 20 g. Die in der isoliert perfundierten und ventilerten Mauslunge (IPML) eingesetzten BALB/c-Mäuse waren 8 - 9 Wochen alt und wogen 20 – 22 g. Alle Tiere wurden aus einer „*specific pathogen-free*“ Haltung von Charles River (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Ein Studiendesign über die Anzahl der verwendeten Tiere befindet sich im Anhang.

Dieses tierexperimentelle Versuchsvorhaben wurde vom zuständigen Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin genehmigt (Antragsnummer: G 0077/05).

3.5.2 Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte in geschlossenen IVC-Käfigen (IVC = *isolated ventilated cage*) mit Filterdeckel (Typ II-L, EHRET, Emmendingen, Deutschland) mit Standardeinstreu und Nestbaumaterialien (Zellstoff, Pappkartonrolle). Dabei standen jedem Tier Wasser und pelletiertes Futter *ad libitum* zur Verfügung. Alle 12 h erfolgte ein Wechsel zwischen Hell- und Dunkelphase. Die Raumtemperatur betrug durchschnittlich 22 °C bei einer relativen Luftfeuchte von 45 – 65 %.

3.6 Untersuchung des Einflusses einer Angiotensin-2 siRNA-Vorbehandlung bei Mäusen auf die Pneumolysin-induzierte pulmonale Permeabilität

3.6.1 siRNA-Behandlung

Für eine mögliche Reduzierung der Ang-2-Expression bei weiblichen BALB/c Mäusen wurden diese nach 3 Tagen Adaptationszeit vier Mal, jeweils im Abstand von 24 h, mit spezifischer, chemisch stabilisierter, lipoplexierter und gegen Ang-2 gerichteter *small interfering* (si) RNA (AtuPLEX) behandelt (Konzentration von 2,8 mg/kg + 21,7 mg/kg Lipid). Die siRNA wurde freundlicherweise von der Firma Silence Therapeutics AG (Berlin) zur Verfügung gestellt. Bei diesem Produkt handelt es sich um in eine Lipidhülle verpackte 2'-O-methylierte 23mer blind endende siRNA, die von der Firma selbst nach einem standardisierten Verfahren hergestellt worden war (Santel, Aleku, Keil, Endruschat, Esche,

Durieux, et al. 2006). Die siRNA-Moleküle wurden von der Firma BioSpring (Frankfurt am Main) synthetisiert. Den Tieren wurden neben der siRNA gegen Ang-2 auch Kontrollformulierungen intravenös verabreicht. Als Kontrollen dienten hierbei siRNA gegen Luciferase und siRNA gegen den Angiotensinrezeptor Tie2. Während dieser Zeit wurden regelmäßig Gewicht, Temperatur und Verhalten der Tiere kontrolliert und dokumentiert.

3.6.2 Die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge (IPML)

Einleitung

In der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML) wird nach Narkose und Tötung des Tieres durch Entbluten die Lunge bei kontinuierlicher künstlicher Beatmung durch eine spezielle Präparation vom Blutkreislauf des Tieres separiert und anschließend mit einer speziellen Elektrolytlösung blutfrei perfundiert. Somit ergibt sich die Möglichkeit, das intakte und native Organ frei von humoralen und nervalen Einflüssen und unabhängig vom Gesamtorganismus zu untersuchen. Dabei können verschiedenste Lungenparameter erfasst werden (z.B. dynamische Compliance, Resistance, Hämodynamik), die einen Einblick in die Zusammenhänge von Funktion, Aufbau und Einfluss der Lunge geben können. Zudem ist es möglich, durch verschiedene Zugänge in der IPML die Wirkung verschiedener pharmakologischer Wirkstoffe zu ermitteln. Es lassen sich ebenfalls Aussagen über die Entstehung endothelialer Permeabilität und Lungenödeme treffen (Uhlig & Taylor 1998).

Aufbau

Für die IPML fand die Perfusionsanlage der Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH (March-Hugstetten) Verwendung. Hierbei handelt es sich um eine doppelwandige Plexiglaswanne, die zusammen mit einem ebenfalls doppelwandigen Deckel eine mit destilliertem Wasser ($T = 37,5\text{ °C}$) beheizbare Kammer ($T = 37\text{ °C}$) bildet. Über zu- und ableitende, in die Kammer eingelassene Schlauchsysteme konnte die Lunge adäquat ventiliert und perfundiert und die daraus abgeleiteten Daten computergestützt erfasst und reguliert werden (PULMODYN®, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA). Die Neigung der Kammer zum horizontalen Untergrund betrug 20 ° , damit die Trachea in erhöhter Position zur Lungenbasis positioniert war (Uhlig & Taylor 1998).

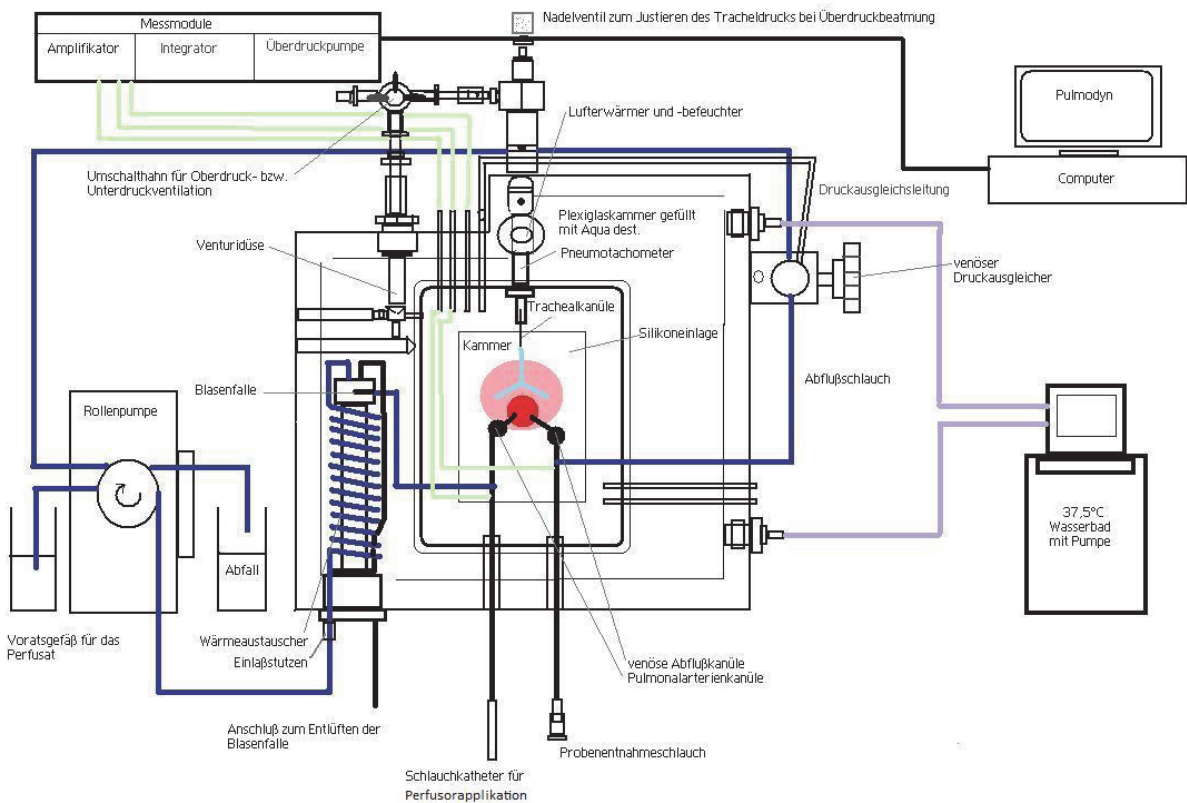


Abbildung 1: Die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge
 Versuchsaufbau modifiziert nach (Bethmann et al. 1998; Held et al. 2012)

Präparation der Lunge und Versuchsdurchführung

Die Präparation der Tiere erfolgte unter Narkose. Dazu wurde ein Narkosegemisch bestehend aus Xylazin (20 mg/kg) und Ketamin (100 mg/kg) *intraperitoneal* (i.p.) appliziert. Nach Erreichen einer tiefen Narkose (Toleranzstadium) wurden die Tiere zunächst zur Reinigung des Operationsfeldes mit Braunol® ventral von der *Regio colli ventralis* bis zur *Regio abdominalis caudalis* abgetupft und dann mithilfe von Stecknadeln auf einer Silikonmatte in der oben beschriebenen Apparatur fixiert. Nach einem medianen Hautschnitt in der *Regio colli ventralis* wurde zunächst die *Trachea* dargestellt und diese 2 - 3 Trachealspangen kaudal des *Larynx* zur Einführung einer Trachealkanüle ventral eröffnet. Die Fixation der Trachealkanüle erfolgte mithilfe einer doppelten Ligatur (Nähgarn). Zunächst erfolgte eine Beatmung der Lungen über die Trachealkanüle mit Raumluft durch Überdruck (Inspirationsdruck: 9 cmH₂O, Endexpirationsdruck: 4,5 cmH₂O, Atemfrequenz: 90 /min, Inspiration zu Expiration: 1:1). Nach erfolgtem medianen Hautschnitt von der *Regio abdominalis caudalis* bis zur *Regio sternalis*, Laparotomie (*Regio abdominalis* bis *Regio xiphoidea*) und dem Anlegen von Entlastungsschnitten an der lateralen Bauchwand wurde der *Thorax* durch eine kleine Inzision am ventralen Ansatzpunkt des Diaphragmas eröffnet. Durch die entstandene Öffnung war das Herz frei sichtbar und es erfolgte unter

Sichtkontrolle eine Applikation von 50 µl Heparin (2500 I.E./ml) in die rechte Herzkammer. Nach kurzer Verteilung des Heparins im Kreislaufsystem wurde die Maus durch finale Blutentnahme aus der *Vena renalis sinistra* und anschließender Durchtrennung der *Vena cava caudalis* entblutet. Nun konnte das *Diaphragma* vollständig an seinen Ansatzpunkten an der Thoraxwand abgetrennt werden und durch einen Schnitt auf Höhe des dorsalen Diaphragmaansatzes die gesamte untere Körperhälfte abgesetzt werden. Der *Thorax* wurde nun durch Inzision entlang des *Sternums* eröffnet, die seitlichen Brustwände vorsichtig nach Entfernen von Pleuraverwachsungen und Verklebungen abgeklappt und lateral mithilfe von Stecknadeln an der Silikonunterlage befestigt. Als nächstes wurde der *Thymus* heraus präpariert und eine Ligatur um die *Arteria pulmonalis* vorgelegt. Danach konnte die rechte Herzkammer quer eingeschnitten und die Herzspitze abgesetzt werden. Durch die erste Öffnung wurde daraufhin ein Pulmonalkatheter in den *Truncus pulmonalis* zur blutfreien Perfusion der Lunge vorgeschoben und fixiert (Perfusatemperatur: 37,5 °C, Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min). Als Perfusionslösung diente dabei Krebs-Henseleit-hydroxyethylamylpectin Puffer (Hersteller: Serag, Deutschland) versetzt mit 8,4 % Natriumhydrogencarbonat-Lösung (20 mM) und einem Kohlendioxid-haltigen Gas (5 % CO₂, 20 % O₂, 75 % N₂), welches zusätzlich über eine Glasfritte in die Lösung geleitet wurde. Dieses Gas wurde zudem bei Unterdruckbeatmung über Schlauchelemente der Beatmungsluft zugeführt. Zu Beginn der Perfusion wurden letzte Blutreste aus der Lunge gespült. Anschließend wurde ein venöser Abflusskatheter in die linke Herzkammer eingeführt und mit einer doppelten Ligatur fest fixiert. Über ein Schlauchsystem erfolgte somit die Ableitung der Perfusionsflüssigkeit in einen separaten Behälter. Jetzt konnte die Kammer mit einem Deckel geschlossen und die Beatmung auf Unterdruck (Inspirationsdruck: -9 cmH₂O, Endexpirationsdruck: -4,5 cmH₂O, Atemfrequenz: 90 /min, Inspiration zu Expiration: 1:1) umgestellt werden. Es erfolgte ein einmaliger tiefer Atemzug (-24 cmH₂O) um eine vollständige Belüftung bereits atelektatischer Lungenregionen zu gewährleisten. Die Unterdruckventilation nach Schluss der Kammer (-4,5 zu -9,0 cmH₂O) und der venöse Abflussdruck (+ 2,2 cmH₂O) standen unter ständiger Kontrolle. Der tiefe Atemzug (-24 cmH₂O) wurde über die ganze Versuchslänge mit einem Abstand von 4 min automatisiert durchgeführt (Zeitmodul TCM; Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland).

Zunächst wurden unter diesen Konditionen 25 min lang oben genannte Parameter eingestellt und kontrolliert (Baseline). Zur späteren Permeabilitätsbestimmung wurde anschließend über einen separaten, arteriellen Zugangsschlauch mit Verbindung zum Pulmonalkatheter mit Hilfe eines Perfusors (Perfusor F Typ 871332/4, BRAUN, Melsungen) die humane Serumalbumin (HSA)-Lösung (Humanes Albumin Grifols® 20 %, Grifols Deutschland GmbH) unter das Perfusat gemischt (0,04 % HSA pro ml Perfusionslösung). 10 min später wurde

über den Perfusionszuflussschlauch über den Zeitraum von einer Minute eine Schädigung der pulmonalen Schranke mithilfe von rekombinatem Pneumolysin (1 µg/ml, 2 µl PLY und 998 µl Perfusatlösung) provoziert. Kontrolltiere erhielten stattdessen im gleichen Mischungsverhältnis Perfusionslösung (998 µl) und *Aqua dest.* (2 µl). Das rekombinante Pneumolysin wurde uns freundlicherweise von Prof. Timothy Mitchell (School of Immunity and Infection, College of Medical and Dental Science, Medical School Building, University of Birmingham, United Kingdom) zur Verfügung gestellt. Über das Perfusatabflusssystem wurde 25 min nach PLY-Applikation eine Perfusatprobe zur Kontrolle des HSA-Gehaltes im Perfusat genommen.

30 min nach der PLY-Stimulation wurden Ventilation und Perfusion gestoppt und eine bronchoalveoläre Lungenlavage (BAL) mit 650 µl NaCl 0,9 % zweimal durchgeführt und die zurückgewonnene bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) beider Lavagen gepoolt (siehe auch 3.7.3 b). Die Lungen wurden vorsichtig herauspräpariert und zunächst in Flüssigstickstoff schockgefroren. Alle Proben wurden bei -80 °C gelagert.

3.6.3 Quantifizierung von humanem Serumalbumin

Mit einem HSA-ELISA Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA) wurde die Konzentration an humanem Serumalbumin in den BALFs und den zugehörigen Perfusatproben ermittelt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die Messung der optischen Dichte (OD) der ELISA 96-well-Platten wurde mit einem Anthos ht2 Mikropplatten Photometer (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) bei 450 nm und der zugehörigen Software (WinRead Anthos) durchgeführt.

3.7 Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie

3.7.1 Infektion

Vorbereitende Arbeiten

Das FCS wurde zunächst bei 56 °C für 30 min im Wasserbad hitzeinaktiviert und anschließend in 50 ml Probenröhrchen (Falcon®) aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Vor der erstmaligen Anwendung wurde das aufgetaute FCS steril filtriert (Rotilabo® Spritzenfilter 0,45 µm Porengröße) und bei 4 °C aufbewahrt.

Die für die Anzucht von *Streptococcus pneumoniae* benötigte Nährlösung wurde mit 30 g Bacto™ Todd Hewitt-Bouillon (THY), 5 g Bacto™ Technischem Hefeextrakt (YEAST) und einem Liter *Aqua dest.* unter ständigem Rühren hergestellt und anschließend bei 115 °C für 15 min in sterilen Glasflaschen autoklaviert.

Anzucht von *Streptococcus pneumoniae*

Aus einem Stammstock des Erregers *S. pneumoniae* Serotyp 3 NCTC 7978 wurde zunächst ein Arbeitsstock angelegt, um eventuelle Kontamination zu vermeiden. Dafür wurde aus oben genanntem Stammstock zunächst ein Verdünnungsausstrich auf Columbiaagar (mit 5 % Schafblut) angefertigt und dieser 10 h bei 37 °C und 5 %-CO₂-Atmosphäre gezüchtet. Nach Ende der Inkubationszeit wurden von dieser Einzelplatte einige wenige Kolonien auf 3 neue Columbiaagarplatten überimpft und 10 h bei 37 °C und 5 %-CO₂-Atmosphäre bebrütet. Anschließend wurden die gesamten Kolonien der 3 Platten mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen und in ein Kryoröhrchen mit 1,5 ml Einfriermedium (80 % THY und 20 % Glycerol) überführt. Die Lagerung des angelegten Arbeitsstockes erfolgte bei -80 °C.

Aus dem Arbeitsstock wurden an Tag 1 des Protokolls mehrere Verdünnungsausstriche auf Columbiablutagar mit 5 % Schafblutanteil angefertigt. Diese inkubierten daraufhin über 9 – 10 h bei 37 °C und 5 %-CO₂-Atmosphäre. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden daraufhin einzelne Kolonien in ein steriles Flüssignährmedium (Todd-Hewitt Medium + 0,5 % Yeast + 10 % FCS) überimpft. Zur Bestimmung der Pneumokokkenmenge wurde die optische Dichte (OD) mittels Photometer gemessen (UVIKON XS Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) und auf eine Anfangs-OD zwischen 0,03 und 0,04 eingestellt. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 37 °C und 5 %-CO₂. Zeitgleich wurde das Pneumokokkenwachstum durch regelmäßige Bestimmung der OD überwacht. Zum Zeitpunkt des Beginns der exponentiellen Wachstumsphase (OD = 0,3) wurde die Inkubation

unterbrochen. Eine Isolation der Pneumokokken aus dem Medium erfolgte dann durch Zentrifugation (2009 x g, 10 min). Daraufhin erfolgte die Berechnung der für die Inokulation benötigten Pneumokokkenmenge. Da eine OD von $0,11 \times 10^8$ CFU/ml (CFU = *colony forming units*) entspricht, konnte die einzusetzende Menge durch Verdünnung mit PBS hergestellt werden. Um die Erregerkonzentration der Infektionssuspension zu kontrollieren, wurden am Ende eines jeden Versuches durch Beimpfen von Columbiablutagarplatten nach einer entsprechenden Verdünnungsreihe die CFUs pro Milliliter ermittelt.

Intranasale Inokulation von Streptococcus pneumoniae

Die Tiere wurden mit einer Infektionsdosis von 5×10^6 CFU/Tier *intranasal* inokuliert. Zuvor erfolgte nach Erfassung von Körpertemperatur und Gewicht eine Neuroleptanalgesie mit einem i.p. applizierten Narkosegemisch (Xylazin 15 mg/kg, Ketamin 90 mg/kg, NaCl 0,9 %). Die Narkosetiefe wurde anhand des Zwischenzehenreflexes überprüft. Sobald eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war und den Tieren protektiv Augensalbe (Thilo Tears®) auf die Hornhaut appliziert wurde, wurden die Mäuse an ihren *Incisivi* hängend fixiert. Nun konnte die *intranasale* Applikation von 10 µl Pneumokokken-haltiger Suspension pro Nasenloch durchgeführt werden. Da auch eine reine Flüssigkeitsapplikation Reaktionen in der Lunge hervorrufen kann, wurden Tiere mit dem gleichen Volumen PBS scheininfiziert. Mit Hilfe dieser Kontrollgruppe konnte unterschieden werden, welche Reaktion letztendlich allein durch die Pneumokokkeninfektion hervorgerufen wurde.

Nachdem die Tiere die aufgebrauchte Menge vollständig aspiriert hatten, wurden sie in *rostral* erhöhter Position in ihre Käfige verbracht und die Körpertemperatur mittels Rotlichtwärmelampe stabil gehalten. Bis zum Erwachen wurden die Tiere ständig beobachtet. Dabei wurden insbesondere Verhalten, Fellbeschaffenheit, Augen, Tasthaare und Bewegung beurteilt.

Überwachung der infizierten und scheininfizierten Tiere

Nach erfolgter *intranasaler* Inokulation wurden das Verhalten, die Körperhaltung, die Fellbeschaffenheit, die Atmung, die Körpertemperatur und das Körpergewicht der Tiere regelmäßig alle 12 h kontrolliert.

3.7.2 Untersuchung der pulmonalen Angiotensin-1-, Angiotensin-2- und Tie2-mRNA-Expression im Verlauf der murinen Pneumokokkenpneumonie

Die Untersuchung der mRNA-Expression (mRNA = *messenger ribonucleic acid*) von Ang-1, Ang-2 und Tie2 in murinem Lungengewebe mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion

(*quantitative polymerase chain reaction* = qPCR, Taqman) wurde von der Firma Silence Therapeutics AG (Berlin) durchgeführt (Santel, Aleku, Keil, Endruschat, Esche, Fisch, et al. 2006) . Zuvor wurden hierfür C57BL/6N Mäuse mit *S. pneumoniae* (5×10^6 CFU/Maus) *intranasal* inokuliert (Infektion siehe 3.7.1). Zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach erfolgter Infektion wurden die zuvor anästhesierten Tiere durch zervikale Dislokation getötet und ihre Lungen nach Eröffnung des *Thorax* entnommen, dann mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Analyse aufbewahrt. Die Ergebnisse wurden in Relation zum *Housekeeping* Gen PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) berechnet.

3.7.3 Infektionsversuche mit Angiotensin-1-Behandlung

Angiotensin-1-Behandlung

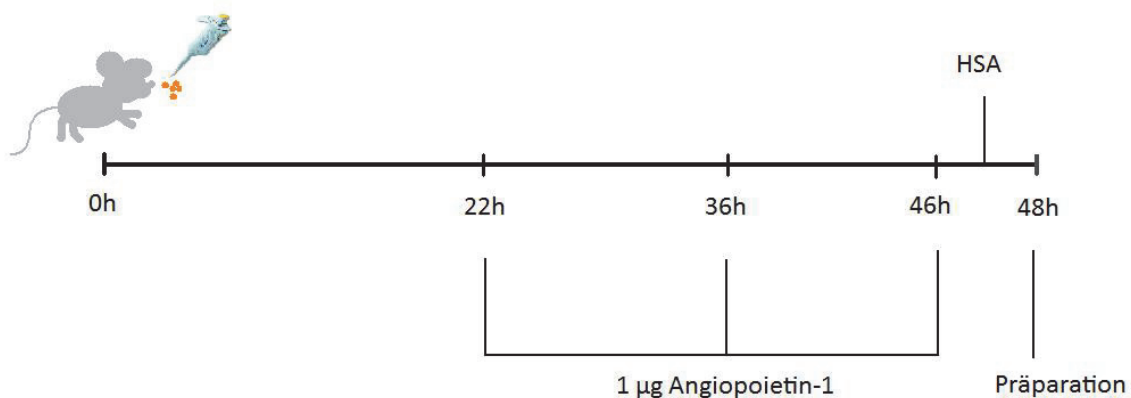


Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf des Infektionsversuches mit Angiotensin-1-Behandlung

Für diese Versuche erfolgte 22 h, 34 h und 46 h *post infectionem* (siehe Punkt 3.7.1) bei den Tieren jeweils eine intravenöse Verabreichung von 1 µg Ang-1 (R&D) in einem Volumen von 100 µl (PBS mit 0,1 % BSA). Dafür wurden die Tiere in einer selbst hergestellten Fixiereinrichtung zur intravenösen Applikation in die *Vena coccygea lateralis* fixiert. Durch kurze Erwärmung des Schwanzes mithilfe einer Infrarotlampe und Stauung des Blutes mit Zeigefinger und Daumen wurde die intravenöse Applikation erleichtert. Kontrolltiere erhielten 100 µl des Lösungsmittels (PBS mit 0,1 % BSA).

Präparation und Probengewinnung

Zur Bestimmung der Permeabilität wurde den Mäusen 47 h nach erfolgter Infektion intravenös 1 mg HSA in einem Volumen von 75 µl in die *Vena coccygea lateralis* injiziert. 1 h nach der HSA-Applikation bekamen die Tiere ein Narkosegemisch bestehend aus Xylazin (20 mg/kg) und Ketamin (100 mg/kg) i.p. appliziert. Im Anschluss erfolgte eine Präparation der Tiere wie unter 3.6.1 c beschrieben, jedoch wurde auf das Einbringen des venösen Abflusskatheters verzichtet und die Perfusion wurde mit steriler NaCl 0,9 % Lösung durchgeführt. Die Lungen wurden insgesamt für 3 – 4 min mit einer Perfusionsrate von 1 ml/min perfundiert, wobei ein weiterer tiefer Atemzug erfolgte. Während der isolierten Ventilation und Perfusion der Lungen wurden die dynamische Lungencompliance und die pulmonale Resistance mithilfe des Softwareprogrammes Pulmodyn (Hugo Sachs Elektronik HavardApparatus GmbH, March-Hugstetten) aufgezeichnet.

Im Anschluss an die Lungenperfusion und Aufzeichnung der Lungenfunktion wurde die Trachealkanüle vorsichtig von ihrem Ventilationsschlauch gelöst. Mithilfe einer speziell präparierten 1000 µl Spritze und 2 x je 650 µl sterilem, eiskaltem PBS mit Proteaseinhibitor (1 Tablette Complete™ Mini gelöst in 10 ml PBS) wurde die Lunge über die Trachealkanüle vorsichtig lavagiert. Nach Ermittlung des erhaltenen bronchoalveolären Flüssigkeitsvolumen (BALF 1 und BALF 2) wurde dieses in 5 ml - Polypropylen Round-Bottom-Röhrchen gegeben und nach Zentrifugation (301 x g, 4 °C, 10 min) zum Trennen von Überstand und Zellpellet direkt weiterverarbeitet (siehe 7.7.3 c). Zuletzt erfolgte die Entnahme der Lungen, die sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren wurden. Das aus der *Arteria renalis sinistra* gewonnene Blut wurde anschließend zentrifugiert (1500 x g, 10 min). Das erhaltene Blutplasma wurde abpipettiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Weiterverarbeitung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Für die Weiterverarbeitung wurden zur späteren HSA-Quantifizierung zunächst jeweils 250 µl BALF (vom Überstand) aus BALF 1 und BALF 2 entfernt, in einem separaten Reaktionsgefäß zusammengefügt und bei -80 °C gelagert. Im weiteren Vorgehen wurde jeweils so viel BALF-Überstand aus den Polypropylenröhrchen abgenommen, dass anschließend noch 50 µl Flüssigkeit in beiden vorhanden war. Die aus der BALF 1 entfernte Flüssigkeit wurde zusätzlich für eine anschließende Zytokinbestimmung separat bei -80 °C aufbewahrt. Nun wurden die Proben mit 900 µl PBS resuspendiert und zusammengeführt, so dass das Zellpellet in einem Gesamtvolumen von 1000 µl aufgenommen war. Aus dieser BALF-Resuspension konnten jetzt 5 µl mit 5 µl Methylviolett gemischt und daraus mit einer Neubauer-Zählkammer die Gesamtzellzahl der BALF ermittelt werden. Dafür wurden 4

Großquadrate zu je 16 Kleinquadraten ausgezählt und die mittlere Leukozytenzahl pro Großquadrat berechnet ($[\text{Leukozytenzahl in 4 Großquadraten}] / 4$). Die Gesamtleukozytenzahl der entnommenen BALF berechnete sich aus dem Gesamtvolumen BALF 1 + BALF 2, mit der Berechnungsformel: (mittlere Leukozytenzahl pro Großquadrat) x 2 x 10000.

3.7.4 Differenzierung der Leukozytensubpopulationen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Eine Differenzierung der Leukozyten in polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN = *polymorphnuclear neutrophils*), Makrophagen und Lymphozyten erfolgte mittels Durchflusszytometer (*fluorescence-activated cell sorting* = FACS Calibur, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) und entsprechender Computer Software (BD CellQuest™ Pro, Version 4.0.2).

Zunächst wurde das BALF-Resuspensionsröhrchen bis 1 cm unter den Rand zur Schonung der Zellen mit PBS aufgefüllt und anschließend zentrifugiert (470 x g, 5 min, Raumtemperatur). Nach Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert, die Restflüssigkeit mit 2 µl Fc-Block (0,5 mg/ml für 1×10^6 Zellen) versetzt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Währenddessen konnten die Antikörper (CD3 FITC-konjugiert, GR-1 PE-konjugiert, CD45 PerCP-konjugiert, F4-80APC-konjugiert) in FACS-Röhrchen (*polystyren round-bottom tube*, 5 ml) vorgelegt werden. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die mit Fc-Block versetzte Probe in die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern versehenen FACS-Röhrchen überführt, vermischt und 20 – 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 500 µl FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences, Heidelberg) (1X) versetzt und 10 min bei 4 °C inkubiert, dann mit „CellWash“ (BD Biosciences, Heidelberg) aufgefüllt und wieder zentrifugiert (470 x g, 5 min, Raumtemperatur). Als letztes wurde der Überstand noch einmal dekantiert und die Proben mit 1 ml „CellWash“ aufgefüllt. Es folgte die Messung am Durchflusszytometer mit 2 verschiedenen Lasern (*forward, sideward*).

Schlussendlich konnte anhand der Gesamtleukozytenzahl, des Gesamtvolumens der entnommenen BALF und der prozentualen, einzelnen Anteile der Leukozytenpopulationen die absolute Zellzahl der Leukozyten bestimmt werden sowie die der Subpopulationen bezogen auf 1 ml BALF.

3.7.5 Bestimmung der pulmonalen Permeabilität

Zur Ermittlung der pulmonalen Permeabilität wurden die bei -80 °C aufbewahrten BALF- und Plasmaproben zunächst aufgetaut und dann mit einem HSA-ELISA Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA) deren Konzentration an humanem Serumalbumin ermittelt. Als

Grad der Permeabilität und somit auch für die Schädigung der alveolokapillären Barriere durch die Pneumonie diente hier der Quotient aus BALF- und Plasma-HSA-Gehalt. Je größer dieser Quotient ist, desto höher ist die Permeabilität. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll wie unter 3.6.3 beschrieben.

3.7.6 Zytokinquantifizierung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Zunächst wurden die unter 3.7.3 c gewonnenen BALF 1-Überstand Proben langsam auf Eis aufgetaut. Zur Bestimmung der darin enthaltenen Zytokine RANTES (*regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted*), KC (*keratinocyte chemoattractant*), G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*), MIP-2 (*macrophage inflammatory protein-2*), TNF- α , IL-10, IL-1 β und IL-6 wurde ein Bio-Plex™ Mouse 8-Plex Cytokine Assay (BioRad, Franklin Lakes, New Jersey, USA) unter Verwendung der Multiplex Suspension Array Technologie der Firma BioRad durchgeführt. Der Zytokinstandard wurde in 500 μ l Probenmedium (PBS mit 0,5 % BSA) gelöst und 30 min auf Eis inkubiert. Aus dieser Standardlösung und Probenmedium erfolgte anschließend die Herstellung einer Verdünnungsreihe in 7 Verdünnungsstufen (je 1:4). Desweiteren wurden die vorgemischten *Beads* in Analysepuffer aufgenommen und anschließend auf eine spezielle, mit Analysepuffer befeuchtete 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Nach wiederholtem Waschen (3 x mit 100 μ l Waschpuffer pro Vertiefung) der Platte konnten die Standardverdünnungen und die unverdünnten BALF-1 Überstände in Doppelbestimmung auf die Platte gebracht werden. Nach Aufrüttelung und Inkubation im Dunkeln (60 min auf Rüttlerplatte 300 x g) wurden nach erneutem Waschen die vorgemischten Detektionsantikörper aufgebracht, 60 min inkubiert und erneut gewaschen. Dann wurden 50 μ l Streptavidin-PE-Lösung in jedes Loch der Platte pipettiert, die Platte erneut aufgerüttelt und bei 300 x g im Dunkeln auf der Rüttlerplatte für 10 min inkubiert. Nach den anschließenden drei Waschschrritten wurden die in den Vertiefungen gebliebenen, mit Phycoerythrin (PE)-markierten *Beads* in 125 μ l Analysepuffer resuspendiert und bei 1100 x g 30 s im Dunkeln inkubiert. Vor der Messung musste die Platte noch einmal gründlich gerüttelt werden (60 s, 1000 x g). Die Messung erfolgte im Bio-Plex *array reader* des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums (Charitéplatz 1, 10117 Berlin).

3.8 Statistische Datenanalyse

Eine statistische Auswertung aller Daten wurde mit dem Statistik- und Graphikprogramm GraphPad Prism 4.0 (Graph Pad Software Incorporated, San Diego, California, USA) nach Beratung durch einen Mitarbeiter des Instituts für Biometrie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Das Alter der Blutspender, der Pneumonie- und ARDS-Patienten wurde als arithmetischer Mittelwert (mean) \pm Standardabweichung (SD = *standard derivation*) angegeben. Eine statistische Analyse der Ang-1- und Ang-2-Werte der unterschiedlichen Gruppen in der CAPNETZ Studie 1 bis 3 (Abbildungen 3 - 5) gegeneinander erfolgte jeweils mit einem zweiseitigen T-Tests für unverbundene Stichproben. In der VALID Studie wurde die statistische Auswertung mit einem zweiseitigen T-Test für verbundene Stichproben durchgeführt (Abbildung 6). Die paarweise Korrelation zwischen den Serumbefunden und der klinischen Parameter bzw. des Alters wurde mit der Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson (Pearson-Korrelation) ebenfalls mit Graph Pad Prism 4.0 berechnet (Tabellen 7 – 13).

Mit einem zweiseitigen T-Test für die verbundenen Stichproben, vergleichend zwischen den Werten vor dem Lauf und direkt nach dem Lauf, sowie direkt nach dem Lauf und 24 Stunden danach, wurden die Daten der Marathonläufer bezüglich der Ang-2-Konzentration, des Leukozyten-, Neutrophilen-, IL-6- und CRP-Gehaltes statistisch ausgewertet (Abbildungen 7-10).

Die mittels ELISA ermittelten Konzentrationen von Ang-2 und IL-6 nach Stimulation von Endothelzellen mit PBS, Thrombin und PLY wurden mit einem *zweiseitigen* T-Test für unverbundene Stichproben jeweils miteinander statistisch analysiert (Abbildungen 13, 14). Dieser Test wurde ebenfalls zur Auswertung der Daten im siRNA-Vorbehandlungs-Experiment, im Experiment zur Ermittlung der pulmonalen mRNA-Expression bei *S. pneumoniae* infizierten und nicht-infizierten Mäusen und im Experiment zur Ang-1-Therapie *in vivo* angewendet (Abbildungen 16 – 23).

4 Ergebnisse

4.1 Pneumoniepatienten haben höhere Angiotensin-2- und niedrigere Angiotensin-1-Serumkonzentrationen gegenüber Gesunden

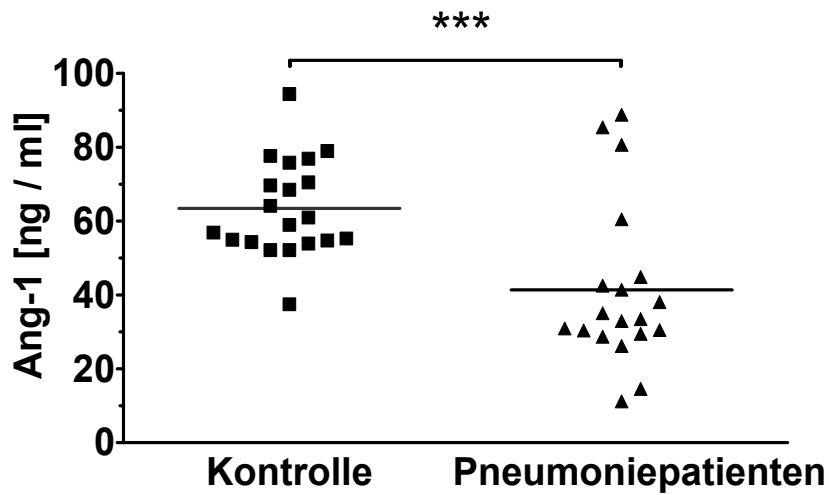
Initial erfolgte eine Messung des Ang-1- und Ang-2-Gehaltes in Serumproben von Pneumoniepatienten ($n = 20$), die von der CAPNETZ-Stiftung (CAPNETZ Studie 1) bereitgestellt wurden, im Vergleich zu dem Ang-1- und Ang-2-Gehalt im Serum gesunder Blutspender ($n = 20$). Alle Pneumoniepatienten hatten einen CRB-65 von 3. Die Kontrollprobanden waren jünger als die Pneumoniepatienten. Die Quantifizierung dieser Proben ergab signifikant verringerte Ang-1-Konzentrationen (Abb. 3 A) und signifikant erhöhte Ang-2-Konzentrationen (Abb. 3 B) bei den Pneumoniepatienten gegenüber gesunden Blutspenderkontrollen. Die Ang-1-Serumkonzentrationen korrelierten nicht mit dem Alter der Patienten. Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen Ang-2-Serumkonzentrationen und dem Alter. In Tabelle 7 sind die jeweiligen Ang-1- und Ang-2-Korrelationen mit dem Alter der Patienten und der Kontrollen dargestellt.

Tabelle 7: Korrelation des Patientenalters mit der Angiotensin-1- und Angiotensin-2-Serumkonzentration (CAPNETZ Studie 1)

R = Pearson's Korrelationskoeffizient, * $p < 0,05$

Korrelationskoeffizient	Kontrolle	Pneumonie
Angiotensin-1, Alter	$R = -0,055; p = 0,817$	$R = -0,027; p = 0,912$
Angiotensin-2, Alter	$R = 0,205; p = 0,387$	$R = -0,542; p = 0,014^*$

A



B

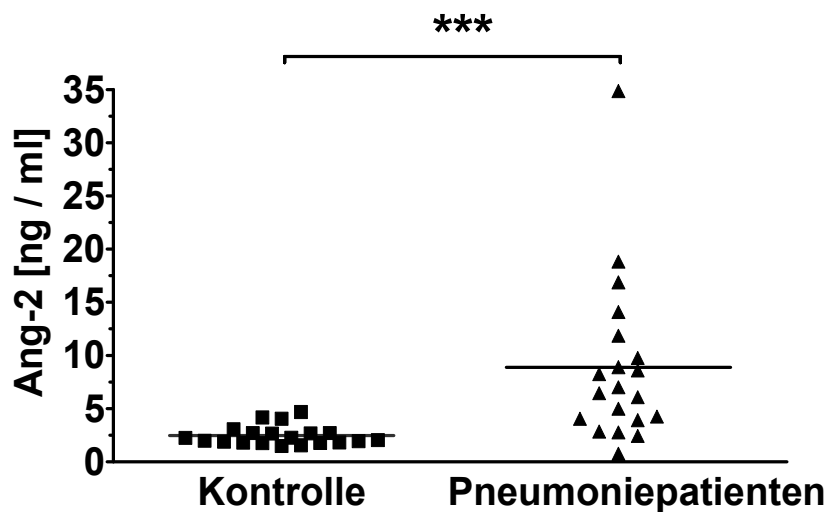


Abbildung 3: Verringerte Angiotensin-1- und erhöhte Angiotensin-2-Serumkonzentrationen bei Pneumoniepatienten (CAPNETZ Studie 1)

(A) Angiotensin (Ang)-1-Quantifizierung mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (Wellenlänge $\lambda = 450/550$ nm) im Serum von Pneumoniepatienten (n = 19) im Vergleich zu gesunden Blutspenderkontrollen (n = 20)

(B) Ang-2-Quantifizierung mittels ELISA ($\lambda = 450/550$ nm) im Serum von Pneumoniepatienten (n = 20, Serum wie (A)) im Vergleich zu gesunden Blutspenderkontrollen (n = 20, Serum von (A))

*** $p < 0,001$

4.2 Pneumoniepatienten mit letalem Pneumonieverlauf haben höhere Angiotensin-2-Spiegel

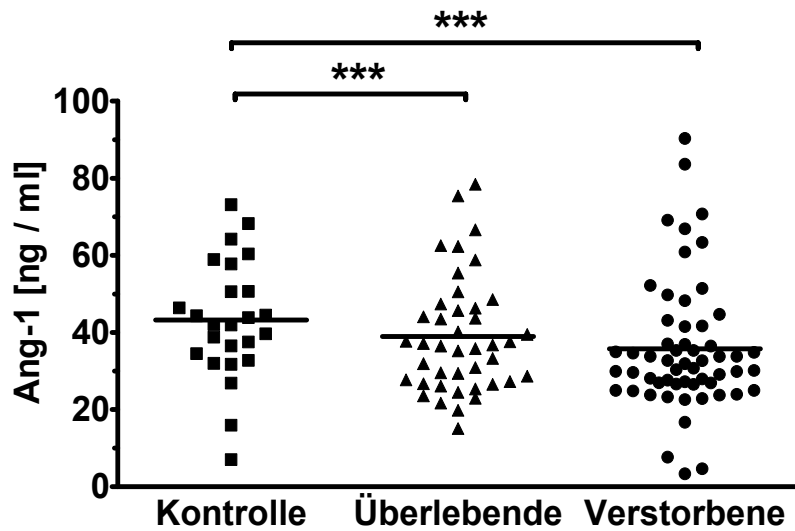
In einer weiteren Untersuchung von Serumproben der CAPNETZ-Stiftung (CAPNETZ Studie 2) sollte überprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Ang-1- und Ang-2-Serumspiegel und dem Schweregrad der Pneumonie gibt. Bei Patienten (n = 100), die an der Pneumonie (CRB-65 0 - 3) innerhalb eines 28-Tage-Zeitraumes verstarben (n = 58), wurden höhere Ang-2-Serumspiegel mittels ELISA ($\lambda = 450/550$ nm) gemessen als bei Patienten, die diese überlebten (n = 42). Wie in der ersten Studie (4.1) waren auch hier bei den Pneumoniepatienten die Ang-1-Konzentrationen (Abbildung 4 A) geringer und die Ang-2-Konzentrationen (Abbildung 4 B) höher gegenüber gesunden Blutspendern. Gesunde Blutspender, die als Kontrollpersonen dienten, waren etwas jünger als Pneumoniepatienten. Ang-1- und Ang-2-Serumkonzentrationen korrelierten nicht mit dem Alter (Tabelle 8). Aus den ermittelten Ang-1- und Ang-2-Serumkonzentrationen wurde das Ang-2/Ang-1-Verhältnis berechnet. Sowohl überlebende als auch verstorbene Pneumoniepatienten hatten ein höheres Ang-2/Ang-1-Verhältnis als Kontrollprobanden. Verstorbene Pneumoniepatienten hatten ein wenig, jedoch signifikant höheres Ang-2/Ang-1-Verhältnis als überlebende (Abbildung 4 C).

Tabelle 8: Korrelation des Patientenalters mit der Angiotensin-1- und Angiotensin-2-Serumkonzentration (CAPNETZ Studie 2)

R = Pearson's Korrelationskoeffizient

Korrelationskoeffizient	Kontrolle	Pneumonie
Angiotensin-1, Alter	R = -0,315; $p = 0,126$	R = 0,147; $p = 0,146$
Angiotensin-2, Alter	R = 0,285; $p = 0,168$	R = -0,107; $p = 0,289$

A



B

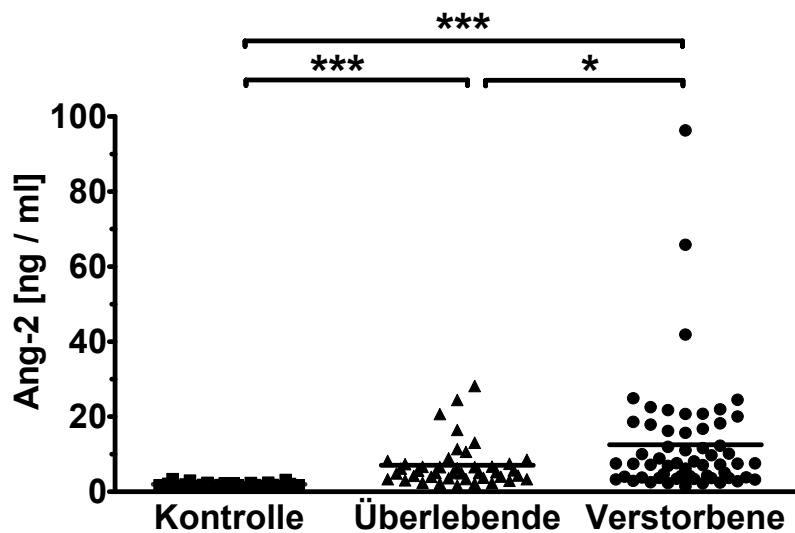


Abbildung 4: Angiotensin-2-Konzentrationen sind bei verstorbenen Pneumoniepatienten höher als bei Überlebenden (CAPNETZ Studie 2).

(A) Angiotensin (Ang)-1-Quantifizierung mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (Wellenlänge $\lambda = 450/550$ nm) im Serum von verstorbenen ($n = 58$) und überlebenden Pneumoniepatienten ($n = 42$) im Vergleich zu gesunden Blutspenderkontrollen ($n = 25$)

(B) Angiotensin-2-Quantifizierung mittels ELISA ($\lambda = 450/550$ nm) im Serum von verstorbenen ($n = 58$) und überlebenden Pneumoniepatienten ($n = 42$) im Vergleich zu gesunden Blutspenderkontrollen ($n = 25$)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

c

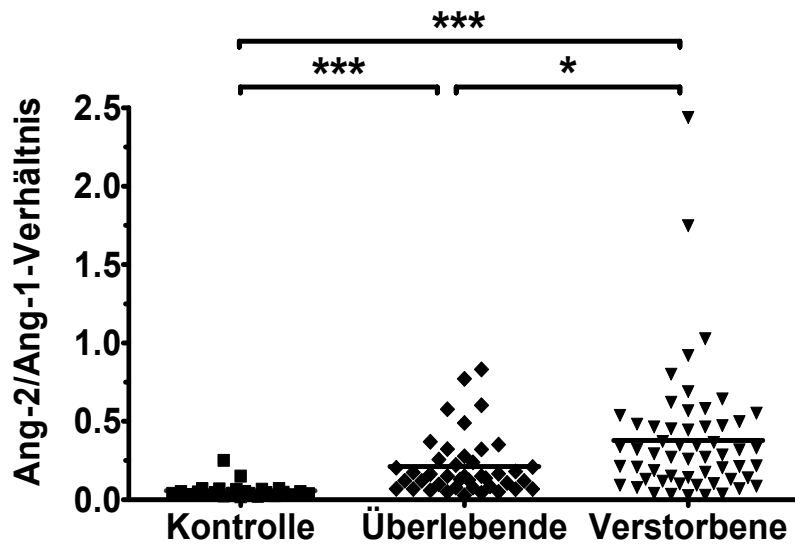


Abbildung 4 Fortsetzung: Angiotensin-2-Konzentrationen sind bei verstorbenen Pneumoniepatienten höher als bei Überlebenden (CAPNETZ Studie 2).

(C) Angiotensin (Ang)-2/Ang-1-Verhältnis aus Ergebnissen von (A) und (B)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3 Procalcitonin als klinischer Parameter korrelierte mit der Angiotensin-2-Serumkonzentration dieser Pneumoniepatienten (CAPNETZ Studie 2)

Bei einer Überprüfung der Korrelation der unter 4.2 gemessenen Ang-2-Konzentrationen mit verschiedenen klinischen Parametern, wie Leukozytengehalt, C-reaktives Protein (CRP), Harnstoff, Alter und Hospitalisierungsrate, korrelierte Ang-2 einzig mit der Procalcitonin-Konzentration im Blut der Patienten (Tabelle 9). Die paraklinischen Parameter wurden bei Studieneinschluss der Patienten erfasst.

Tabelle 9: Korrelation ausgewählter klinischer Parameter mit der Angiotensin-2-Serumkonzentration (CAPNETZ Studie 2)

CRP = C-reaktives Protein, R = Pearson's Korrelationskoeffizient, *** $p < 0,001$

Korrelationskoeffizient	Kontrolle	Pneumonie
Angiotensin-2, Alter	R = 0,285; $p = 0,168$	R = -0,107; $p = 0,289$
Angiotensin-2, Leukozyten	-	R = -0,010; $p = 0,920$
Angiotensin-2, CRP	-	R = 0,005; $p = 0,961$
Angiotensin-2, Procalcitonin	-	R = 0,642; $p < 0,0001^{***}$
Angiotensin-2, Harnstoff	-	R = 0,133; $p = 0,188$
Angiotensin-2, Dauer des Krankenhausaufenthaltes	-	R = 0,0003; $p = 0,998$

4.4 Verstorbene und überlebende Pneumoniepatienten haben annähernd gleiche Angiotensin-2-Spiegel

Um die unter 4.2 und 4.3 erhaltenen Ergebnisse statistisch zu verifizieren, wurde die Studie nach einer Fallzahlabstimmung auf Grundlage der vorausgegangenen Ergebnisse erneut mit einer größeren Anzahl von Patientenseren ($n_{\text{gesamt}} = 148$, $n_{\text{Verstorbene}} = 74$, $n_{\text{Überlebende}} = 74$) der CAPNETZ-Stiftung durchgeführt (CAPNETZ Studie 3). Bei Patienten, die an der Pneumonie innerhalb eines 28-Tage-Zeitraumes verstarben, sind ähnliche Ang-2-Serumspiegel mittels ELISA gemessen worden wie bei Patienten, die diese überlebten (Abbildung 5). Die gesunden Blutspender waren im Durchschnitt jünger als die Pneumoniepatienten dieser Studie. Die Ang-2-Serumkonzentrationen korrelieren nicht mit dem Alter der Patienten (Tabelle 10).

Tabelle 10: Korrelation Patientenalter mit der Angiotensin-2-Serumkonzentration (CAPNETZ Studie 3)

R = Pearson's Korrelationskoeffizient

Korrelationskoeffizient	Kontrolle	Pneumonie
Angiotensin-2, Alter	R = 0,022; $p = 0,883$	R = 0,051; $p = 0,535$

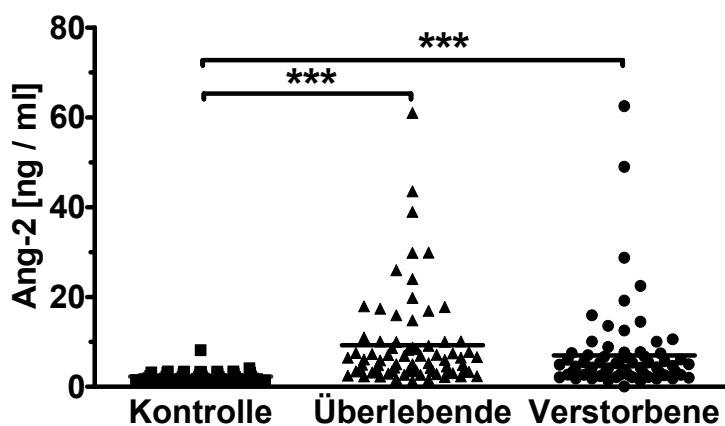


Abbildung 5: Kein signifikanter Unterschied in der Konzentration von Angiotensin-2 im direkten Vergleich von überlebenden und nicht überlebenden Pneumoniepatienten (CAPNETZ Studie 3)

Die Angiotensin (Ang)-2-Serumkonzentrationen wurden mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (Wellenlänge $\lambda = 450/550$ nm) in Seren von Pneumoniepatienten der CAPNETZ-Stiftung (CAPNETZ Studie 3; $n = 148$) erfasst, die 28 Tage nach stationärer Aufnahme verstarben oder überlebten. Kontrollen sind gesunde Blutspender ($n = 47$).

*** $p < 0,001$

4.5 Procalcitonin als klinischer Parameter korrelierte mit der Angiotensin-2-Serumkonzentration der Pneumoniepatienten (CAPNETZ Studie 3)

Bei einer Überprüfung der Korrelation von Ang-2 mit verschiedenen paraklinischen Parametern wie Leukozytengehalt, CRP, Procalcitonin, Harnstoff, Alter und Hospitalisierungsrate, korrelierte Ang-2 mit der zuvor bestimmten Procalcitonin-Konzentration, dem Harnstoffgehalt, dem CRP und dem pH im Blut der Pneumoniepatienten (Tabelle 11).

Tabelle 11: Korrelation ausgewählter klinischer Parameter mit der Angiotensin-2-Serumkonzentration (CAPNETZ Studie 3)

CRP = C-reaktives Protein, R = Pearson's Korrelationskoeffizient,

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Korrelationskoeffizient	Kontrolle	Pneumonie
Angiotensin-2, Alter	R = 0,022; $p = 0,883$	R = 0,051; $p = 0,535$
Angiotensin-2, Leukozyten	-	R = -0,005; $p = 0,950$
Angiotensin-2, pH	-	R = -0,235; $p = 0,017^*$
Angiotensin-2, CRP	-	R = 0,205; $p = 0,013^*$
Angiotensin-2, Procalcitonin	-	R = 0,624; $p < 0,0001^{***}$
Angiotensin-2, Harnstoff	-	R = 0,400; $p < 0,0001^{***}$
Angiotensin-2, Dauer des Krankenhausaufenthaltes	-	R = -0,015; $p = 0,862$

4.6 Die Angiotensin-2-Serumkonzentration ist beim Pneumonie-induzierten *acute respiratory distress syndrome* initial erhöht und sinkt nach 7 Tagen ab (VALID Studie)

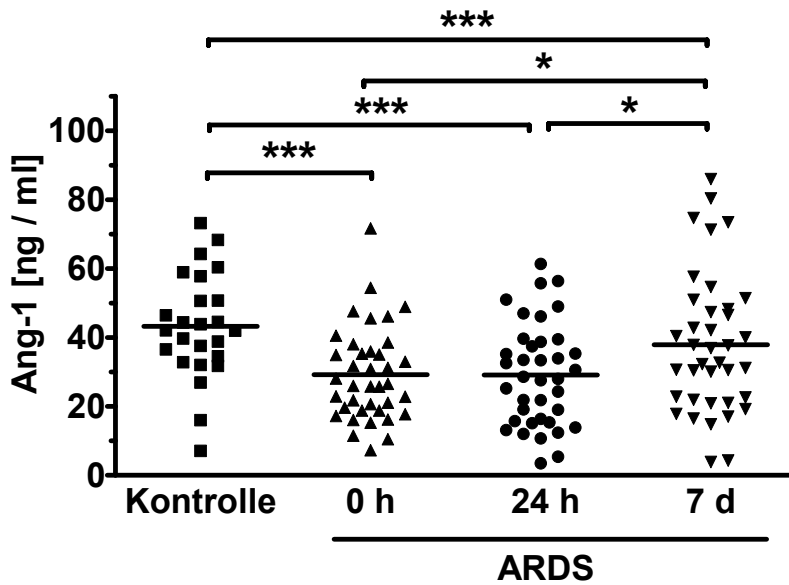
Patienten (n = 38), die aufgrund eines schweren Pneumonieerlaufes an einem ARDS erkrankten, hatten zu Beginn ihrer intensivmedizinischen Betreuung erhöhte Ang-2-Werte im Vergleich zu gesunden Probanden (n = 25). Bei weiteren Untersuchungen 24 h und 7 d nach Aufnahme in die Studie fielen die Werte auf ein niedrigeres Niveau ab. Demgegenüber lagen die Ang-1-Serumkonzentrationen initial in einem niedrigeren Konzentrationsbereich als zu den übrigen Zeitpunkten (Abbildung 6). Eine Korrelation des Alters der Probanden mit den gemessenen Ang-1- und Ang-2-Konzentrationen wurde nicht festgestellt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Korrelation des Alters der Probanden mit den Angiotensin-1- und Angiotensin-2-Serumkonzentrationen (VALID Studie)

ARDS = *acute respiratory distress syndrome*, R = Pearson's Korrelationskoeffizient

Korrelationskoeffizient	Kontrolle	ARDS Patienten		
		0 h	24 h	7 d
Angiotensin-1, Alter	R = -0,315; $p = 0,126$	R = 0,124; $p = 0,458$	R = 0,299; $p = 0,069$	R = 0,190; $p = 0,254$
Angiotensin-2, Alter	R = 0,285; $p = 0,168$	R = 0,043; $p = 0,797$	R = 0,166; $p = 0,319$	R = -0,177; $p = 0,286$

A



B

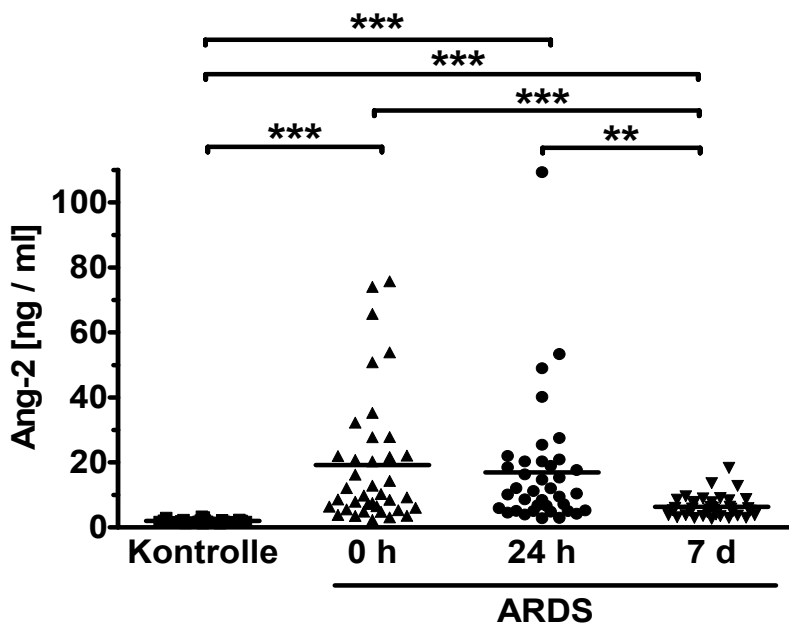


Abbildung 6: Die Angiotensin-2-Serumkonzentration ist zu Beginn der Pneumonie erhöht und sinkt im weiteren Verlauf (VALID Studie).

(A) Angiotensin (Ang)-1-Quantifizierung mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (Wellenlänge $\lambda = 450/550$ nm) in Seren von Patienten mit einem Pneumonie-induzierten *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) ($n = 38$) von den Zeitpunkten 0 Stunden (h), 24 h und 7 Tagen (d) nach Studieneinschluss. Als Kontrolle dienten gesunde Blutspenderkontrollen ($n = 25$).

(B) Angiotensin-2-Quantifizierung mittels ELISA ($\lambda = 450/550$ nm) in Seren von Patienten mit einem Pneumonie-induzierten ARDS ($n = 38$) von den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 7 d nach Studieneinschluss. Als Kontrolle dienten gesunde Blutspenderkontrollen ($n = 25$).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.7 Die Angiotensin-2-Serumkonzentration bei Pneumonie-induziertem *acute respiratory distress syndrome* korreliert mit dem Serum-pH

Die Ang-2-Serumkonzentrationen korrelierten zu den Zeitpunkten 0 h und 24 h negativ mit dem pH-Wert des Blutes der Patienten. Es konnten keine Korrelationen mit anderen klinischen Parametern festgestellt werden (Tabelle 13). Allerdings standen hier die Procalcitonin-Werte der Patienten nicht zur Verfügung.

Tabelle 13: Korrelation ausgewählter klinischer Parameter mit der Angiotensin-2-Serumkonzentration (VALID Studie)

ARDS = *acute respiratory distress syndrome*, R = Pearson's Korrelationskoeffizient

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Korrelationskoeffizient	Kontrolle	ARDS Patienten		
		0 h	24 h	7 d
Angiotensin-2, Alter	R = 0,285; $p = 0,168$	R = 0,043; $p = 0,797$	R = 0,166; $p = 0,319$	R = -0,177; $p = 0,286$
Angiotensin-2, Leukozyten	-	R = -0,131; $p = 0,433$	-	R = 0,126; $p = 0,450$
Angiotensin-2, pH	-	R = -0,346; $p = 0,033^*$	R = -0,420; $p = 0,009^{**}$	R = -0,118; $p = 0,450$
Angiotensin-2, Harnstoff	-	R = 0,109; $p = 0,532$	-	R = 0,050; $p = 0,771$
Angiotensin-2, PaO ₂ /FiO ₂	-	R = 0,269; $p = 0,103$	R = -0,195; $p = 0,242$	R = -0,253; $p = 0,131$

4.8 Hohe Angiotensin-2-Serumwerte und Entzündungsparameter bei Läufern nach dem Marathon

Um Erkenntnisse über die zeitliche Kinetik der Freisetzung von Ang-2 im menschlichen Körper zu erhalten, wurde Marathonläufern vor, unmittelbar nach und 24 h nach dem Marathon Blut entnommen und im Serum mittels ELISA der Ang-1- und Ang-2-Gehalt analysiert. Weiterhin wurden der Leukozytengehalt, der Anteil der neutrophilen Granulozyten, der IL-6- und CRP-Gehalt als Inflammationsmarker bestimmt. Bei gesunden Marathonläufern ($n = 18$) der RUNINFLAME-Studie konnten unmittelbar nach dem Marathonlauf erhöhte Ang-2-Werte gemessen werden, verglichen mit den Ausgangswerten vor dem Marathon (Abbildung 7 A). Auch das Ang-2/Ang-1-Verhältnis war erhöht (Abbildung 7 B). Ebenfalls waren Inflammations-Marker wie Leukozyten und IL-6 direkt nach dem Marathon erhöht. Alle Werte sanken 24 h nach der Belastung wieder auf das Ausgangsniveau (Abbildung 8 A, 8 B und 9 A). Die CRP-Serumkonzentration stieg 24 h nach dem Marathon an (Abbildung 9 B). Die Ang-2-Werte korrelierten zudem mit dem Leukozytengehalt und dessen Anteil an neutrophilen Granulozyten (Abbildung 10 A und B).

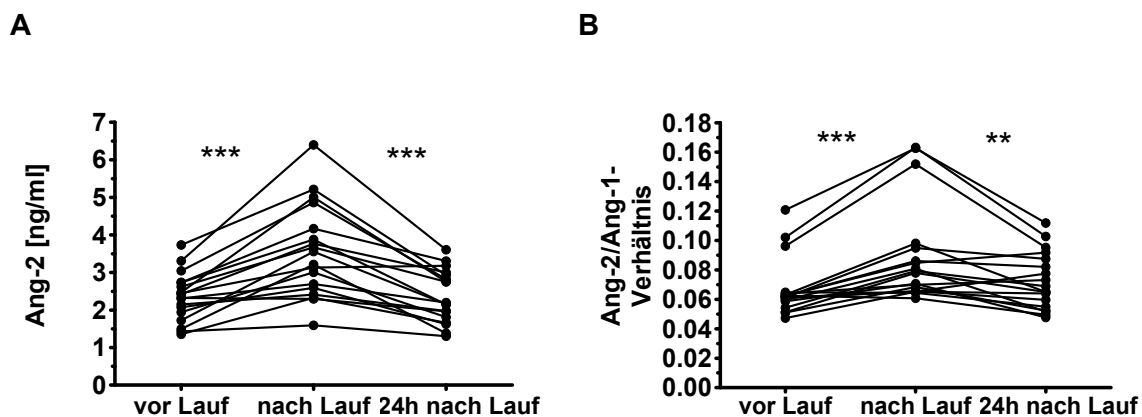


Abbildung 7: Hohe Angiotensin-2-Serumkonzentration (A) und ein erhöhtes Angiotensin-2/Angiotensin-1-Verhältnis (B) nach dem Marathonlauf

(A) Bestimmung der Angiotensin (Ang)-1 und Ang-2-Konzentrationen (*enzyme linked immunosorbent assay* ELISA, Wellenlänge $\lambda = 450/550$ nm) im Serum von gesunden Marathonläufern ($n = 18$) vor dem Marathonlauf (vor Lauf), direkt nach dem Marathonlauf (nach Lauf) und 24 Stunden (h) nach dem Marathonlauf (24 h nach Lauf). Ang-1 wird nicht gezeigt.

(B) Berechnung des Ang-2/Ang-1-Serumkonzentrationsverhältnisses anhand der Ergebnisse der durchgeführten Ang-1 und Ang-2 ELISA (siehe (A))

(A) *** $p < 0,0001$; (B) *** $p < 0,0001$; ** $p = 0,003$

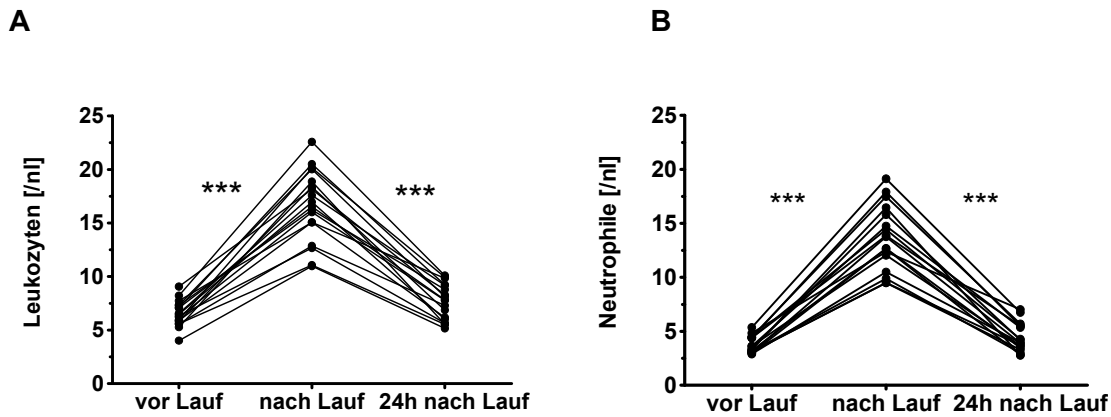


Abbildung 8: Erhöhter Leukozytengehalt (A), speziell des Anteils neutrophiler Granulozyten (B) nach dem Marathonlauf

(A) Leukozytengehalt im EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Blut von Marathonläufern (n = 18) unmittelbar vor dem Marathonlauf (vor Lauf), direkt nach dem Marathonlauf (nach Lauf) und 24 Stunden (h) nach dem Marathonlauf (24 h nach Lauf)

(B) Neutrophile Granulozyten im EDTA-Blut von Marathonläufern (n = 17) unmittelbar vor dem Marathonlauf, direkt nach dem Marathonlauf und 24 h nach dem Marathonlauf

(A) und (B) *** $p < 0,0001$

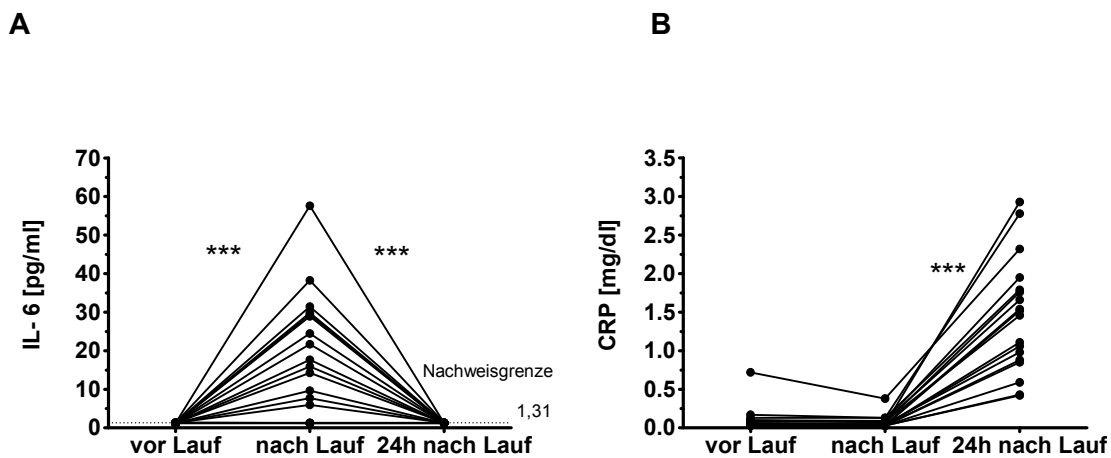


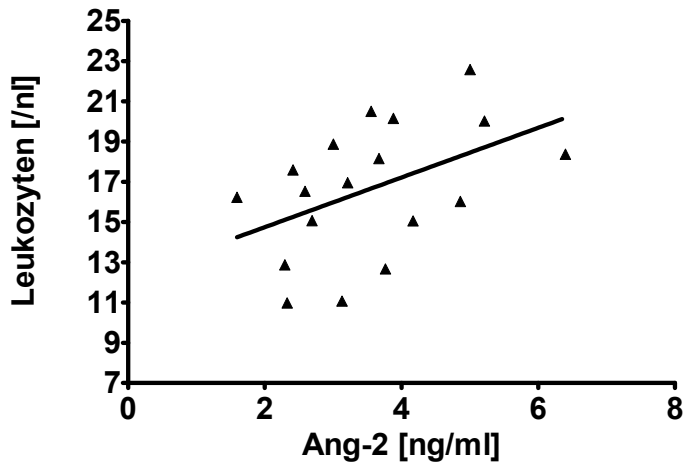
Abbildung 9: Erhöhter Serum-Interleukin-6-Gehalt direkt nach dem Marathonlauf (A) und erhöhtes C-reaktives Protein im Serum 24 h nach dem Marathonlauf (B)

(A) Interleukin (IL)-6-Bestimmung im Serum von Marathonläufern (n = 18) unmittelbar vor dem Marathonlauf (vor Lauf), direkt nach dem Marathonlauf (nach Lauf) und 24 Stunden (h) nach dem Marathonlauf (24 h nach Lauf) mittels BioPlex® Assay und *low*-Messung

(B) C-reaktives Protein (CRP) im Serum von Marathonläufern (n = 18) unmittelbar vor dem Lauf, direkt nach dem Lauf und 24 h nach dem Lauf

(A) *** $p = 0,0002$; (B) *** $p < 0,0001$

A



B

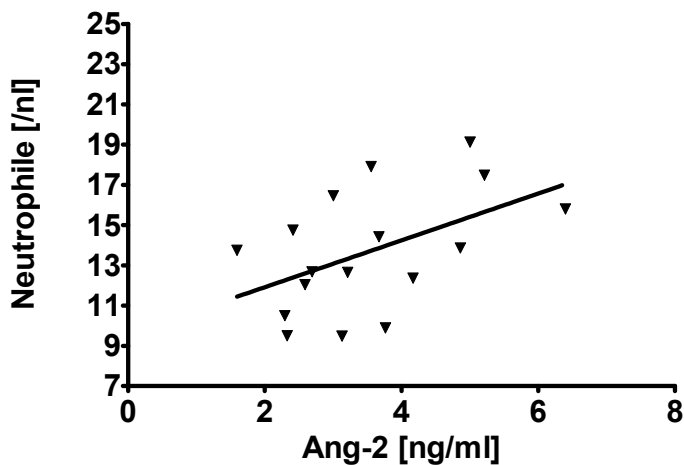


Abbildung 10: Korrelation zwischen der Angiotensin-2-Serumkonzentration und dem Leukozytengehalt (A), sowie zwischen der Angiotensin-2-Serumkonzentration und den neutrophilen Granulozyten (B)

(A) Korrelation zwischen der Angiotensin (Ang)-2-Serumkonzentration (direkt nach dem Marathonlauf) und dem Leukozytenanzahl im Blut (direkt nach Marathonlauf)

(B) Korrelation zwischen der Ang-2-Serumkonzentration (direkt nach dem Marathonlauf) und dem Gehalt an neutrophilen Granulozyten im Blut (direkt nach Marathonlauf)

(A) $R = 0,4619$; $p = 0,0536$; (B) $R = 0,4939$; $p = 0,0439$

4.9 Angiopoietin-2 ist in humanen *post mortem* Lungen von Pneumoniepatienten in Endothelzellen exprimiert

Um die Lokalisation von Ang-1, Ang-2 und Tie2 im Lungengewebe zu ermitteln, wurden humane *post mortem* Lungen von Pneumoniepatienten immunhistochemisch untersucht. Die Expression von Ang-2 und Tie2 im Lungengewebe von Pneumoniepatienten und entsprechenden Kontrollproben erfolgte ausschließlich in den Endothelzellen. Ang-1 wurde dagegen von verschiedenen Zellen (u.a. Pneumozyten Typ I) exprimiert. Ein Unterschied in der Expressionsstärke zwischen gesunden Kontrollen (n = 15) und Pneumoniepatienten (n = 15) konnte mit dieser Methode nicht festgestellt werden (Abbildung 11).

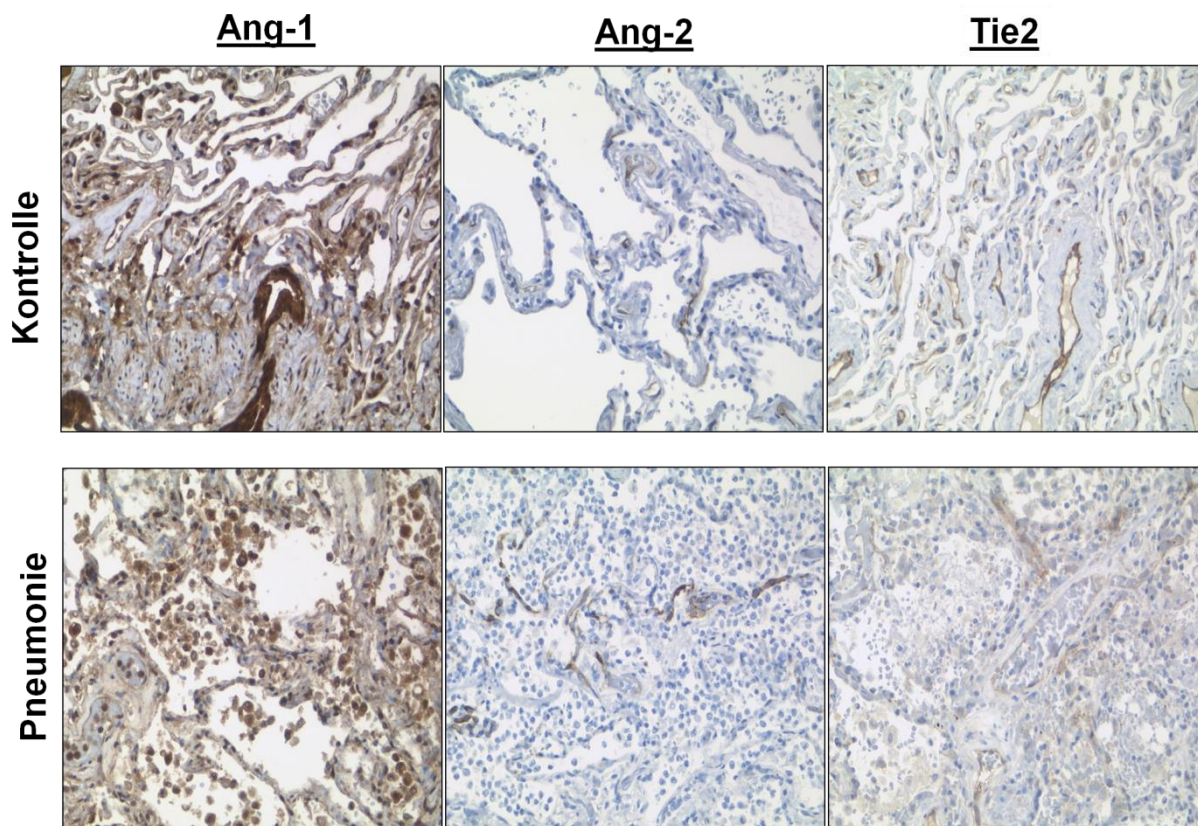


Abbildung 11: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 und Tie2 in humanen *post mortem* Lungen von Pneumoniepatienten und in gesundem Lungengewebe

Angiopoietin-1 (Ang-1) wurde in verschiedenen Zellen exprimiert. Die Angiopoietin-2 (Ang-2)- und Tie2-Expression wurde ausschließlich in Endothelzellen detektiert. Zwischen Lungen von Pneumoniepatienten und von gesunden Menschen gab es bezüglich der Expression von Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 und Tie2 keine sichtbaren Unterschiede. Die Abbildung zeigt repräsentative Lungenschnitte für jede Gruppe.

4.10 Eine Pneumolysin-Stimulation von humanen umbilicalvenösen Endothelzellen führte zu einer erhöhten Angiopoietin-2-Freisetzung in Zellkulturüberständen aber nicht zu einem Interleukin-6-Anstieg

Während der Messung des transzellulären Widerstandes von HUVECs mittels *Electric cell-substrate impedance sensing* (ECIS) konnte mit verschiedenen subzytolytischen Konzentrationen von PLY (1,0 µg/ml, 1,5 µg/ml, 2,0 µg/ml) eine konzentrationsabhängige Permeabilitätserhöhung provoziert werden (Abbildung 12). In den Zellüberständen dieser PLY-stimulierten HUVECs wurden erhöhte Ang-2-Konzentrationen im Vergleich zu nicht oder mit Kontrolllösung stimulierten Zellen gemessen (Abbildung 13). Die Stimulation mit Thrombin (0,5 U/ml) führte ebenfalls zu einem Ang-2-Anstieg, der jedoch nicht signifikant ($p = 0,0881$) war (Abbildung 13). Dafür kam es zu einem signifikanten Anstieg von IL-6. PLY induzierte keinen Anstieg dieses proinflammatorischen Zytokins (Abbildung 14).

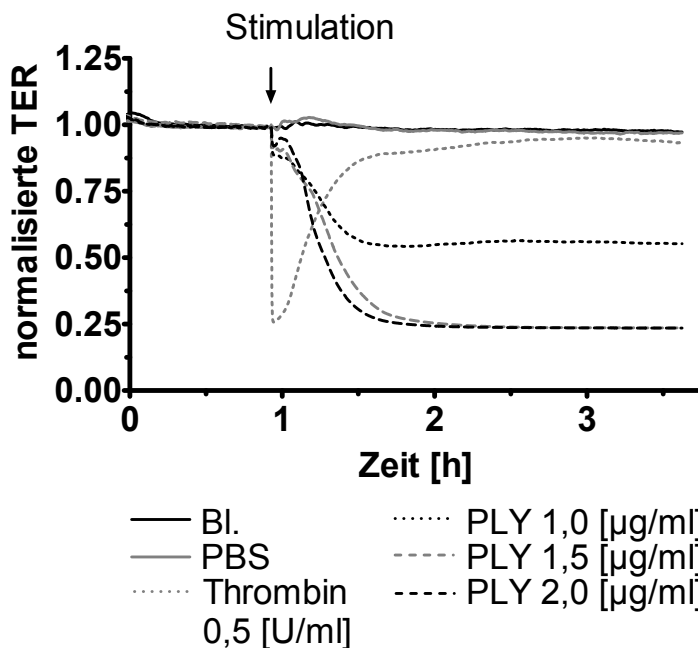


Abbildung 12: Mit Pneumolysin stimulierte humane umbilicalvenöse Endothelzellen haben einen verringerten transzellulären elektrischen Widerstand.

Humane umbilicalvenöse Endothelzellen (HUVEC = *human umbilical cord vein endothelial cell*) wurden, bei kontinuierlicher Messung des transzellulären elektrischen Widerstandes (TER), mit verschiedenen subzytolytischen Konzentrationen Pneumolysin (PLY) (1,0 µg/ml (n = 4); 1,5 µg/ml (n = 4); 2,0 µg/ml (n = 4)) stimuliert. Thrombin (0,5 U/ml) diente als Positivkontrolle (n = 5). Die Lösungsmittelkontrolle war *phosphate buffered saline* (PBS) (n = 5). Die Ergebnisse sind normalisiert dargestellt. Bl. ist der unstimulierte Leerwert (n = 7). Der Versuch wurde nach 3 h abgestoppt und die Zellüberstände abgenommen.

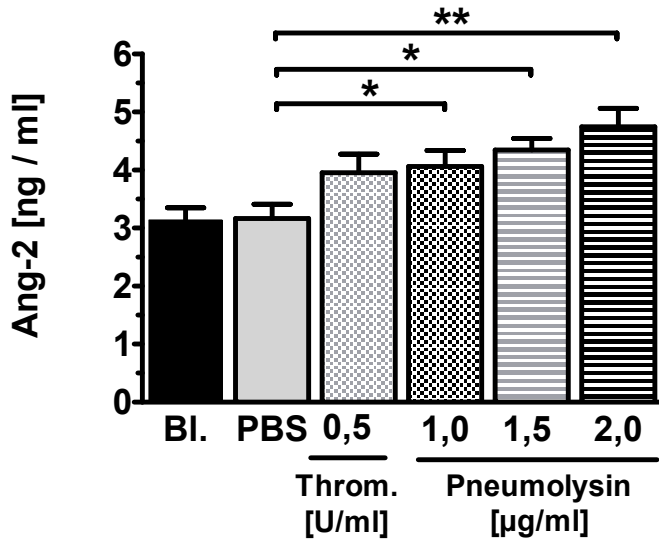


Abbildung 13: Angiopoietin-2 wird nach Pneumolysin-Stimulation von humanen umbilicalvenösen Endothelzellen freigesetzt.

Die mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmte Angiopoietin-2 (Ang-2) Konzentration in Zellüberständen aus den Versuchen im *electric cell-substrate impedance sensing*, 3 Stunden nach Stimulation mit *phosphate buffered saline* (PBS), 0,5 U/ml Thrombin (Throm.) und 1,0 µg/ml, 1,5 µg/ml bzw. 2,0 µg/ml Pneumolysin. Bl. ist die unstimulierte Kontrolle.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

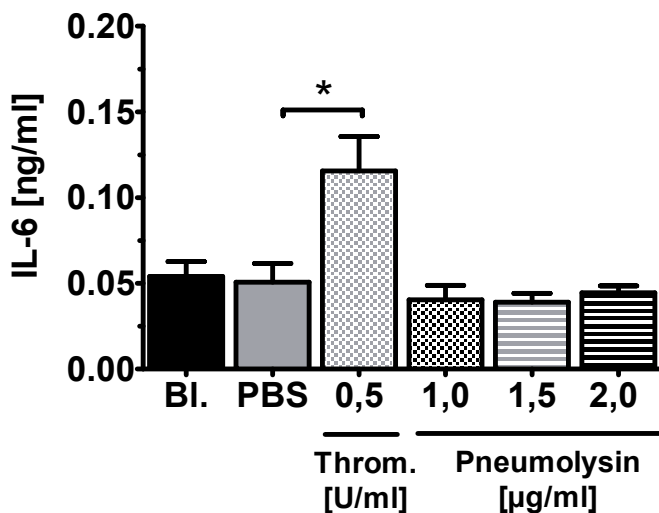


Abbildung 14: Interleukin-6 ist in Zellüberständen humaner umbilicalvenöser Endothelzellen nach Thrombin-Stimulation erhöht, nicht jedoch nach Pneumolysin-Stimulation.

Die mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) ermittelte Interleukin (IL)-6-Konzentration in Zellüberständen aus den Versuchen im *electric cell-substrate impedance sensing* 3 Stunden nach Stimulation durch *phosphate buffered saline* (PBS), 0,5 U/ml Thrombin (Throm.) und 1,0 µg/ml, 1,5 µg/ml bzw. 2,0 µg/ml Pneumolysin. Bl. ist die unstimulierte Kontrolle.

* $p < 0,05$

4.11 Eine Angiotensin-2-Stimulation von humanen umbilicalvenösen Endothelzellen führt bei hohen Dosierungen zu einem kurzen, reversiblen Abfall des transzellulären elektrischen Widerstandes

Bei einer Ang-2-Stimulation von HUVECs im ECIS führte von den eingesetzten Dosierungen (200 ng/ml, 2000 ng/ml) allein die höchste Dosis Ang-2 zu einem kurzen und reversiblen Abfall des transzellulären elektrischen Widerstandes (TER) und somit zu einer reversiblen Permeabilitätsinduktion (Abbildung 15).

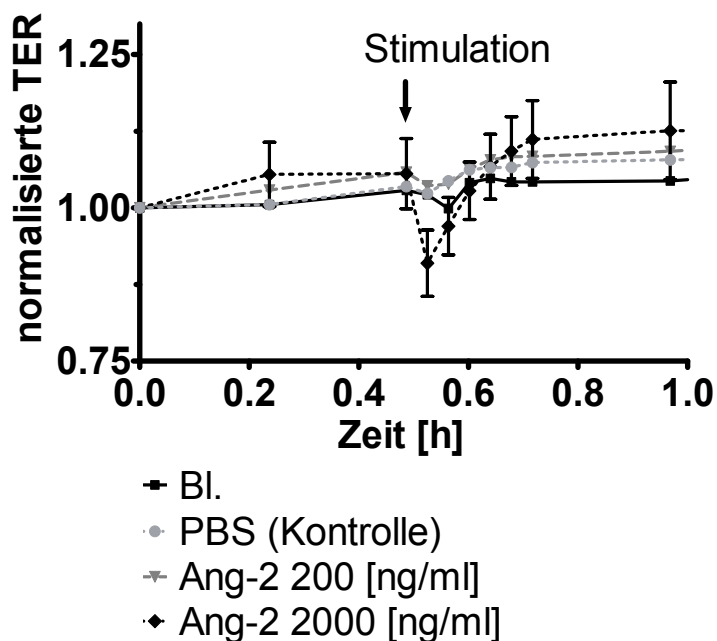


Abbildung 15: Eine Stimulation von humanen umbilicalvenösen Endothelzellen mit Angiotensin-2 führt zu einem kurzen, reversiblen Abfall des transzellulären elektrischen Widerstandes.

Humane umbilicalvenöse Endothelzellen wurden im *electric cell-substrate impedance sensing* mit Konzentrationen von 200 ng/ml und 2000 ng/ml Angiotensin (Ang)-2 sowie mit *phosphate buffered saline* (PBS) stimuliert (je n = 4). Für eine Stunde wurde der transzelluläre elektrische Widerstand (TER) erfasst und aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind normalisiert dargestellt. Bl. ist die unstimulierte Kontrolle.

4.12 Die Pneumolysin-induzierte Permeabilität ist bei Vorbehandlung von Mäusen mit spezifischer, gegen Angiotensin-2 gerichteter siRNA verringert

Weibliche BALB/c-Mäuse (n = 6), die mit spezifischer, chemisch stabilisierter und lipoplexierter, gegen Ang-2 gerichteter siRNA (2,8 mg/kg + 21,7 mg/kg Lipid) vier Mal in einem Abstand von 24 h vorbehandelt worden waren, zeigten in IPML-Experimenten nach Schädigung der alveolokapillären Barriere mittels PLY (1 µg/ml) eine geringere Permeabilität als Kontrolltiere, die mit siRNA gegen Luciferase oder siRNA gegen den Rezeptor Tie2 vorbehandelt worden waren (Abbildung 16). Die Ang-2-Expression wurde durch die siRNA-Behandlung um ca. 50 % reduziert (Daten nicht gezeigt).

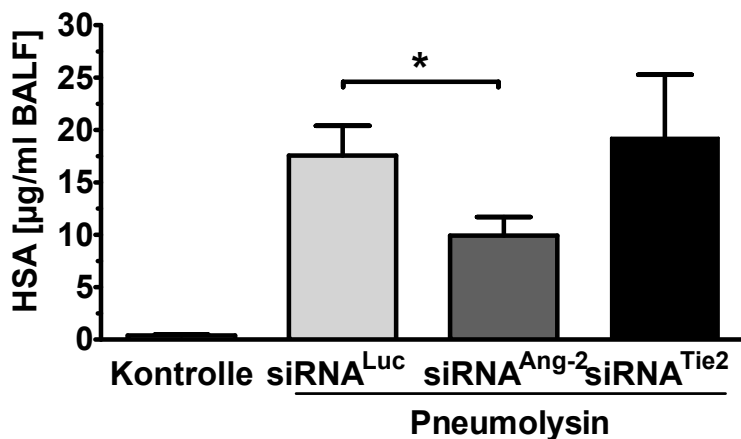


Abbildung 16: Durch eine Angiotensin-2 siRNA-Vorbehandlung kann die Pneumolysin-induzierte Permeabilität in der isoliert perfundierten Mauslunge gesenkt werden.

Weibliche BALB/c-Mäuse (jeweils n = 6) wurden vier Mal im 24 Stunden Abstand entweder mit siRNA gegen Angiotensin-2 (siRNA^{Ang-2}) oder als Kontrollbehandlung mit siRNA gegen Luciferase (siRNA^{Luc}) oder den Tie2-Rezeptor (siRNA^{Tie2}) (2,8 mg/kg) intravenös behandelt. In der isoliert perfundierten Mauslunge erfolgte die Pneumolysin-Stimulation (1 µg/ml) und Applikation von humanem Serumalbumin (HSA, 0,04 %/ml Perfusatgemisch) mit anschließender bronchoalveolärer Lavage (BAL). Die HSA-Quantifizierung in der Lavageflüssigkeit (BALF) wurde mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt. Kontrollversuche ohne Pneumolysin-Stimulation wurden an Lungen von unbehandelten Mäusen durchgeführt (Kontrolle n = 4)

* $p < 0,05$

4.13 Im Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie steigt die Angiotensin-2-mRNA-Expression in Lungen von infizierten Mäusen an und die Angiotensin-1- und Tie2-mRNA-Expression sinkt

Um in einem *in vivo* Experiment die Expression von Ang-1, Ang-2 und Tie2 in der Pneumonie untersuchen zu können, wurden weibliche C57BL/6N-Mäuse mit *S. pneumoniae* (5×10^6 CFU/Tier) *intranasal* inokuliert. Eine Entnahme der Lungen 6 h, 12 h, 24 h, 36 h und 48 h (je $n = 6$) nach der Infektion und von scheininfizierten Kontrollen zu den gleichen Zeitpunkten (je $n = 6$) mit anschließender Untersuchung des Lungengewebes mittels qPCR ließ erkennen, dass mit zunehmendem Schweregrad der Pneumokokkenpneumonie, u.a. erkennbar am Gewichtsverlust (Abbildung 17 A) und Absinken der Körpertemperatur (Abbildung 17 B), die mRNA-Expression von Ang-2 im Lungengewebe der Mäuse anstieg (Abbildung 18 B). Im Gegensatz dazu konnte ein Absinken der Ang-1- und Tie2-mRNA-Expression beobachtet werden (Abbildungen 18 A und C).

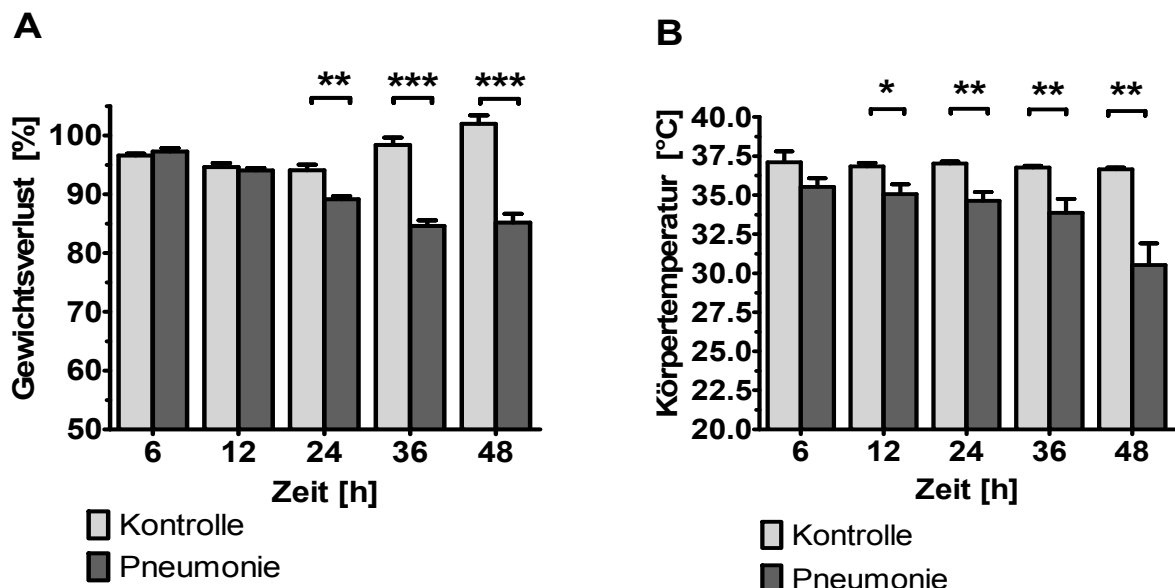


Abbildung 17: Körpergewicht und Körpertemperatur im Verlauf der murinen Pneumokokkenpneumonie

(A) Körpergewicht der mit *Streptococcus pneumoniae* (5×10^6 colony forming units (CFU)/Tier) infizierten Mäuse (= Pneumonie, siehe Abbildung 18: A, B, C) (für 12 h, 24 h, 36 h, 48 h je $n = 6$; für 6 h Kontrolle und Pneumonie je $n = 5$)

(B) Die rektale Körpertemperatur der mit *Streptococcus pneumoniae* (5×10^6 CFU/Tier) infizierten Mäuse (siehe Abbildung 18: A, B, C) (für 12 h, 36 h, 48 h je $n = 6$; für 6 h Kontrolle $n = 2$, für 6 h Pneumonie $n = 4$; für 24 h Kontrolle und Pneumonie je $n = 5$)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

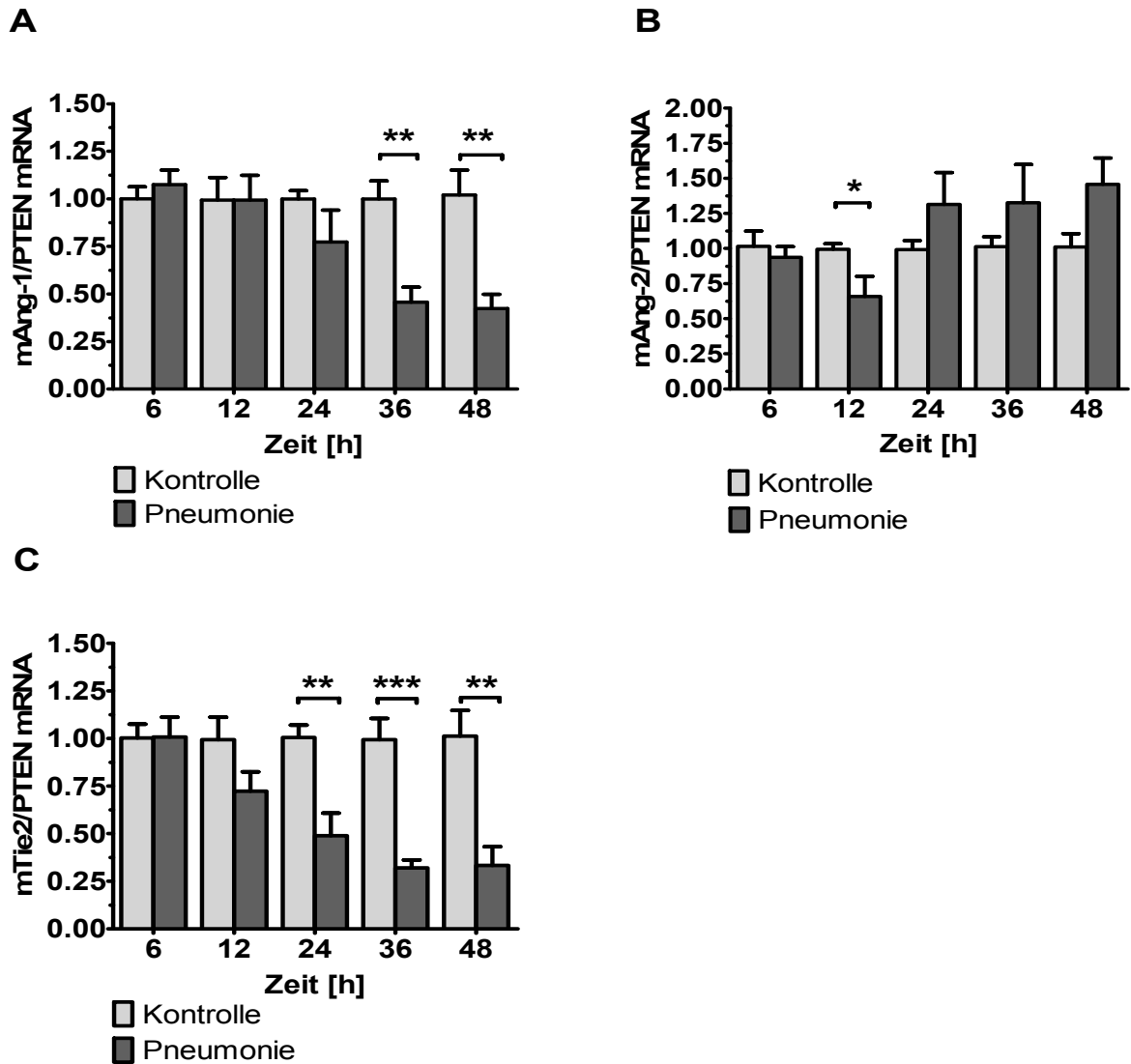


Abbildung 18: Die mRNA-Expression von Angiopoietin-1 und Tie2 sinkt und die von Angiopoietin-2 steigt im Verlauf der murinen Pneumokokkenpneumonie.

(A) Die mRNA-Expression (*messenger ribonucleic acid*) von Angiopoietin (Ang)-1 in murinem (m) Lungengewebe (mAng-1-mRNA) wurde 6 h, 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach Infektion (Pneumonie) mit *Streptococcus (S.) pneumoniae* (5×10^6 colony forming units (CFU)/Tier) im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt (je n = 6).

(B) Die Ang-2-mRNA-Expression in murinem Lungengewebe (mAng-2-mRNA) wurde 6 h, 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* (5×10^6 CFU/Tier) im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen mittels qPCR bestimmt (je n = 6).

(C) Die Tie2-mRNA-Expression in murinem Lungengewebe (mTie2-mRNA) wurde 6 h, 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* (5×10^6 CFU/Tier) im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen mittels qPCR bestimmt (je n = 6). Alle Ergebnisse sind in Relation zum *housekeeping* Gen PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) angegeben.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.14 Eine Angiopoietin-1-Behandlung von *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäusen senkt die pulmonale Inflammationsreaktion und Permeabilität 48 h nach der Infektion

Weibliche C57BL/6N Mäuse wurden mit *S. pneumoniae* (5×10^6 CFU/Tier) *intranasal* inokuliert und beginnend 22 h nach Infektion (p.i.) therapeutisch mit Ang-1 (1 μ g Ang-1 gelöst in 100 μ l PBS mit 0,1 % BSA) 3 Mal (22 h, 34 h und 46 h p.i.) behandelt. Es konnte 48 h p.i. eine Verminderung des Influxes neutrophiler Granulozyten in den Alveolarbereich beobachtet werden (Abbildung 20). Bemerkenswerterweise waren auch die Zytokine IL-6, IL-1 β , KC, MIP-2, RANTES und TNF- α in der BALF bei Ang-1 behandelten Tieren verringert (Abbildung 21). Die behandelten Tiere hatten einen geringeren Körpergewichtsverlust und Körpertemperaturabfall 48 h nach der Infektion (Abbildung 22) und eine geringere Permeabilität (HSA-Plasma/BAL-Verhältnis) als mit PBS (+ 0,1 % BSA) behandelte und infizierte Mäuse (Abbildung 23).

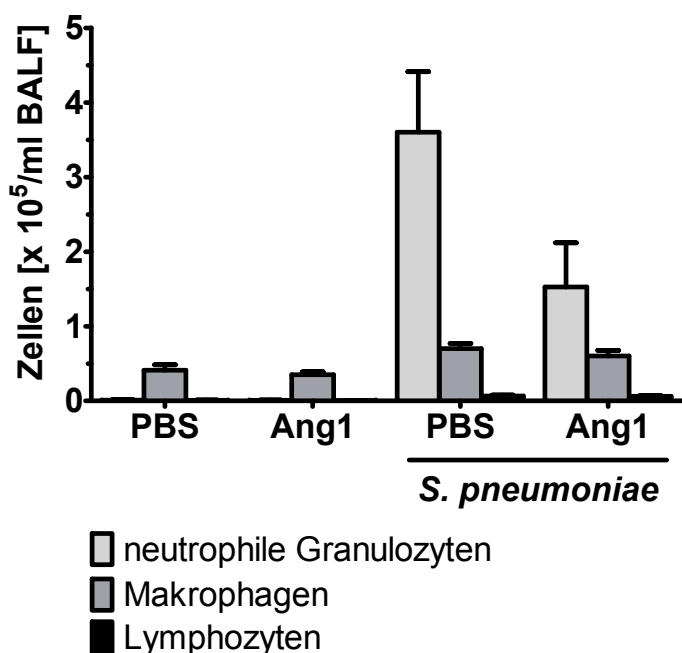


Abbildung 19: Eine Angiopoietin-1-Behandlung reduziert die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in der murinen Pneumokokkeninfektion.

22 h, 34 h und 46 h nach intranasaler Infektion (p.i.) mit *Streptococcus* (*S.*) *pneumoniae* (5×10^6 colony forming units (CFU)/Tier) erfolgte eine therapeutische intravenöse Angiopoietin (Ang)-1-Behandlung (1 μ g) oder die entsprechende Kontrollbehandlung mit *phosphate buffered saline* (PBS). Nicht infizierte Tiere wurden als Kontrollen ebenfalls entsprechend behandelt. Die Zellen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten) in der bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) wurden 48 h p.i. mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analyse quantifiziert.

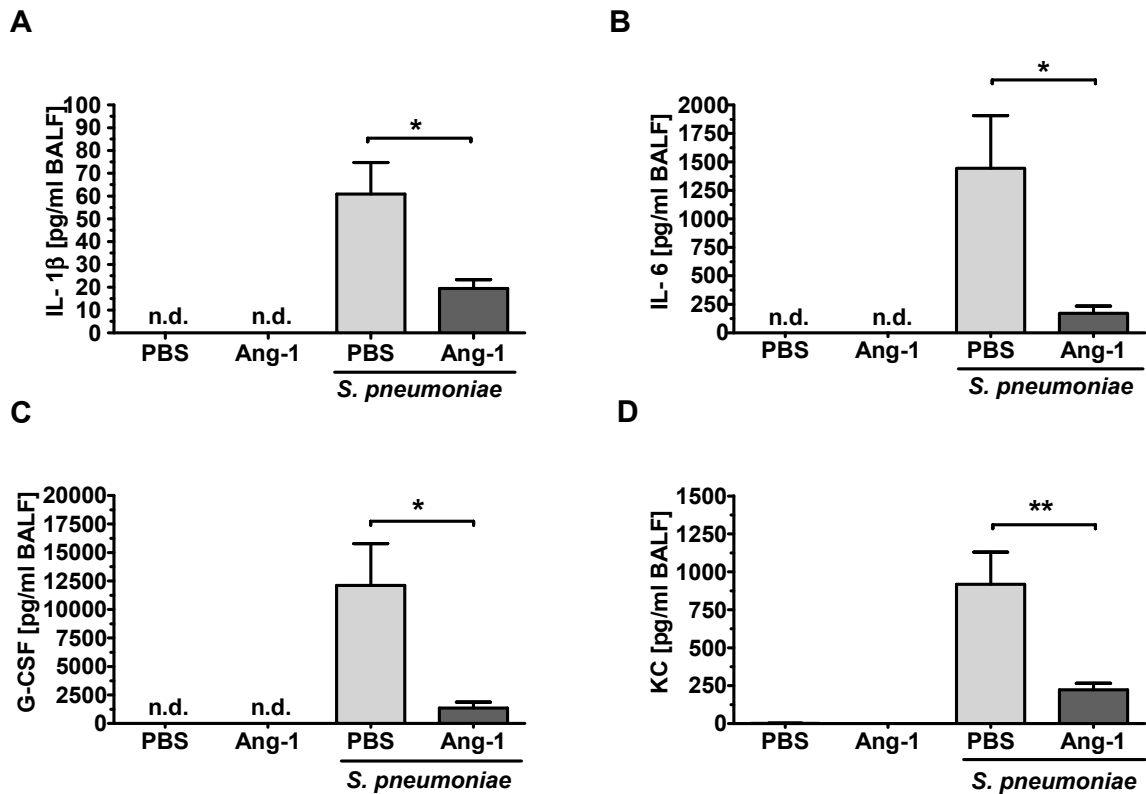


Abbildung 20: Eine Angiotensin-1-Behandlung reduziert die Zytokinexpression in der murinen Pneumokokkeninfektion.

22 h, 34 h und 46 h nach intranasaler Infektion (p.i.) mit *Streptococcus* (*S.*) *pneumoniae* (5×10^6 colony forming units (CFU)/Tier) erfolgte eine therapeutische intravenöse Angiotensin (Ang)-1-Behandlung ($1 \mu\text{g}$) oder die entsprechende Kontrollbehandlung mit phosphate buffered saline (PBS). Nichtinfizierte Tiere wurden als Kontrollen ebenfalls entsprechend behandelt. Die Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) wurden im Multiplex Assay (BioRad®) 48 h p.i. bestimmt. (A) Interleukin (IL)-1 β , (B) IL-6, (C) granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), (D) keratinocyte chemoattractant (KC), (E) IL-10, (F) Tumornekrosefaktor (TNF)- α , (G) macrophage inflammatory protein (MIP)-2 und (H) regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted (RANTES)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

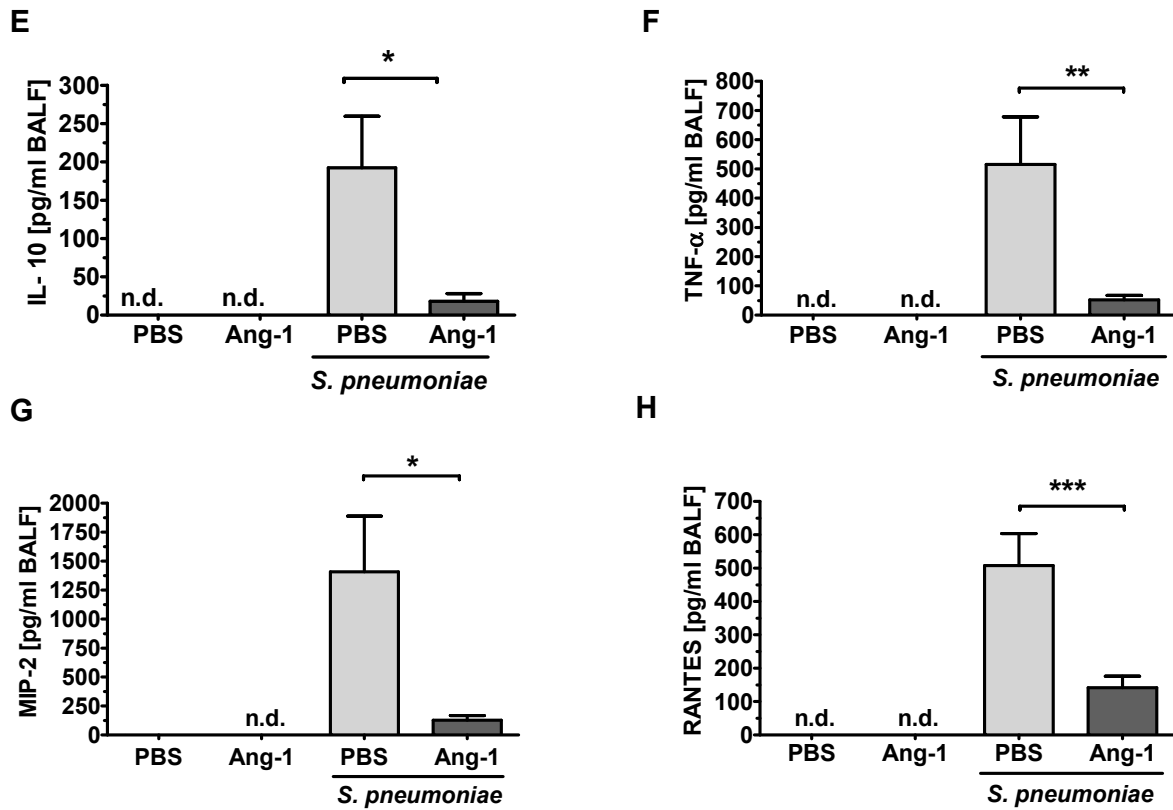


Abbildung 20 Fortsetzung: Eine Angiotensin-1-Behandlung reduziert die Zytokinexpression in der murinen Pneumokokkeninfektion.

22 h, 34 h und 46 h nach intranasaler Infektion (p.i.) mit *Streptococcus (S.) pneumoniae* (5×10^6 colony forming units (CFU)/Tier) erfolgte eine therapeutische intravenöse Angiotensin (Ang)-1-Behandlung (1 μ g) oder die entsprechende Kontrollbehandlung mit phosphate buffered saline (PBS). Nichtinfizierte Tiere wurden als Kontrollen ebenfalls entsprechend behandelt. Die Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) wurden im Multiplex Assay (BioRad®) 48 h p.i. bestimmt. (A) Interleukin (IL)-1 β , (B) IL-6, (C) granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), (D) keratinocyte chemoattractant (KC), (E) IL-10, (F) Tumornekrosefaktor (TNF)- α , (G) macrophage inflammatory protein (MIP)-2 und (H) regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted (RANTES)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

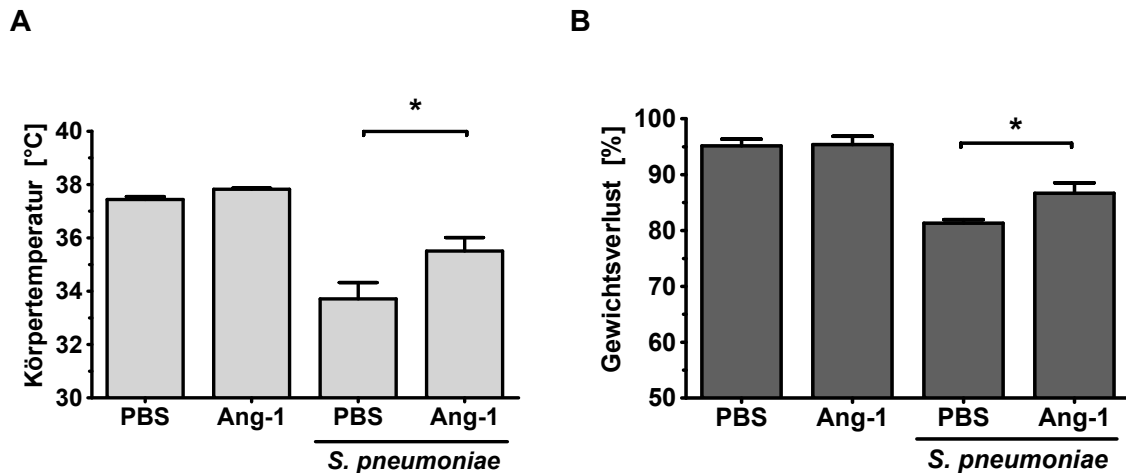


Abbildung 21: Angiopoietin-1 behandelte Mäuse haben einen attenuierten klinischen Verlauf in der Pneumokokkenpneumonie.

22 h, 34 h und 46 h nach intranasaler Infektion (p.i.) mit *Streptococcus (S.) pneumoniae* (5×10^6 colony forming units (CFU)/Tier) erfolgte eine therapeutische intravenöse Angiopoietin (Ang)-1-Behandlung (1 μ g) oder die entsprechende Kontrollbehandlung mit phosphate buffered saline (PBS). Nichtinfizierte Tiere wurden als Kontrollen ebenfalls entsprechend behandelt. Zum Zeitpunkt 48 h p.i. wurde die Messung der rektalen Körpertemperatur (A) und des Gewichtsverlustes (B) durchgeführt.

* $p < 0,05$

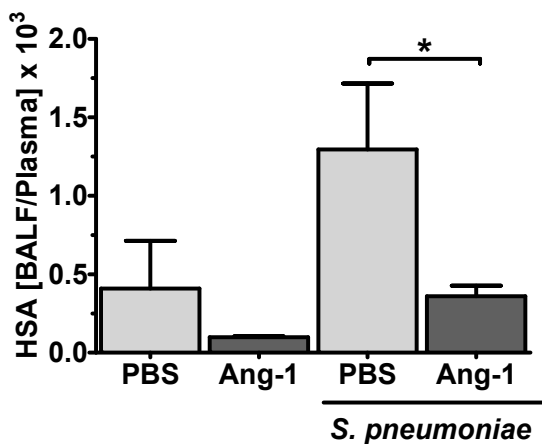


Abbildung 22: Eine Angiopoietin-1-Behandlung reduziert die Permeabilität in der murinen Pneumokokkeninfektion.

22 h, 34 h und 46 h nach intranasaler Infektion (p.i.) mit *Streptococcus (S.) pneumoniae* (5×10^6 colony forming units (CFU)/Tier) erfolgte eine therapeutische intravenöse Angiopoietin (Ang)-1-Behandlung (1 μ g) oder die entsprechende Kontrollbehandlung mit phosphate buffered saline (PBS). Nichtinfizierte Tiere wurden als Kontrollen ebenfalls entsprechend behandelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Lungenpermeabilität durch intravenöse Gabe von Humanem Serum Albumin (HSA) 47 h p.i. mit anschließender Durchführung einer bronchoalveolären Lavage (BAL) 48 h p.i. und der Berechnung des HSA BALF/Plasma-Verhältnisses.

* $p < 0,05$

5 Diskussion

Die Bedeutung des Ang/Tie2-Systems für die Angiogenese und die Tumervaskularisation wurde in der Vergangenheit in vielen wissenschaftlichen Publikationen dargestellt (Bouis et al. 2006). Eine bedeutende Funktion kommt dem Ang/Tie2-System außerdem durch seine Beteiligung an der Entstehung von Inflammation und der direkten Wirkung am Endothel, z.B. durch die Induktion von vaskulärer endothelialer Permeabilität, zu (Roviezzo et al. 2005; van der Heijden et al. 2009). Unter anderem wurde die Beteiligung des Ang/Tie2-Systems bei Sepsis (Kümpers et al. 2009; Orfanos et al. 2007), Sepsis-assoziiertem ARDS (Parikh et al. 2006), MODS (*multiple organ dysfunction syndrome*) (Meurs et al. 2009) und SIRS (Koutsostathis et al. 2011) beschrieben. Es konnte sogar gezeigt werden, dass die Bestimmung der Ang-2-Konzentration im Blut und die Berechnung des Ang-2/Ang-1-Verhältnisses Voraussagen über den Schweregrad der Erkrankung und ein mögliches Versterben eines Patienten, z.B. mit einem ALI* (Ong et al. 2010) oder mit schwerer Sepsis (Ricciuto et al. 2011), ermöglicht.

Die Bedeutung des Ang/Tie2-Systems bei Pneumonie wurde bislang jedoch noch nicht untersucht. Zum besseren Verständnis hinsichtlich des möglichen prognostischen oder gar therapeutischen Nutzens der Liganden des Ang/Tie2-Systems und eventuell ablaufender Mechanismen und zeitlicher Zusammenhänge während einer Pneumonie wurden verschiedene *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* Experimente durchgeführt. Es sollte u.a. überprüft werden, ob Ang-2 als Biomarker in der schweren Pneumonie verwendet werden kann, ob Ang-2 eine mögliche Rolle für die Entstehung pulmonaler Hyperpermeabilität spielt und, ob eine Ang-1-Behandlung von mit *S. pneumoniae* infizierten Mäusen die pulmonale Hyperpermeabilität und Inflammation senken kann.

5.1 Die Angiopoietin-1- und Angiopoietin-2-Serumkonzentrationen von Pneumoniepatienten unterscheiden sich im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen

Ausgehend von der Tatsache, dass das Ang/Tie2-System an der Regulation von Endothelpermeabilität und –stabilität sowie an der Initiierung inflammatorischer Prozesse beteiligt ist, sollten zunächst mittels ELISA-Quantifizierung die Ang-1- und Ang-2-Serumkonzentrationen von Pneumoniepatienten und gesunden Blutspendern als Kontrollen gemessen werden. Es wurde eine erhöhte Ang-2- und reduzierte Ang-1-Serumkonzentration bei Pneumoniepatienten gegenüber den gesunden Kontrollen nachgewiesen (CAPNETZ Studie 1). In einer zweiten Studie sollte nicht nur der Unterschied der Ang-1- und Ang-2-

Serumkonzentrationen von Pneumoniepatienten gegenüber gesunden Menschen mit einer größeren Patientenzahl überprüft werden, sondern auch mögliche Unterschiede in der Ang-1- und Ang-2-Serumkonzentration von Patienten, die die Pneumonie innerhalb von 28 Tagen entweder überlebten oder daran verstarben, aufgedeckt werden (CAPNETZ Studie 2). Ein möglicher prognostischer Einsatz von Ang-2 in der schweren Pneumonie sollte so ermittelt werden.

Zunächst bestätigte sich, ähnlich wie in Studien zur Sepsis (Ricciuto et al. 2011; Siner et al. 2009), dass die Ang-2-Serumkonzentration und das Ang-2/Ang-1-Verhältnis bei letalem Pneumieverlauf höher waren. In einer darauf folgenden Untersuchung mit einer noch größeren Patientenzahl konnte jedoch zwischen überlebenden und verstorbenen Pneumonie-Patienten kein Unterschied in der Ang-2-Serumkonzentration gemessen werden (CAPNETZ Studie 3). In beiden Studien (CAPNETZ Studie 2 und 3) zeigte sich aber eine Korrelation zwischen den Ang-2-Serumkonzentrationen und Procalcitonin. Procalcitonin ist ein klinischer Indikator für das Vorhandensein einer bakteriell-induzierten Pneumonie (Boussekey et al. 2005; Boussekey et al. 2006; Hedlund & Hansson 2000; Gendrel & Bohuon 2000; Alkholi et al. 2011), aber auch für andere Infektionen bakterieller Genese (Lee 2013; Hedlund & Hansson 2000; Krüger & Welte 2012; Krüger et al. 2008).

Da die Ang-2-Serumkonzentration allein vermutlich keinen aussagefähigen prognostische Marker für den Schweregrad einer Pneumonie darstellt, könnte die Kombination mit anderen Biomarkern wie Procalcitonin eventuell zur Risikostratifizierung in der Frühphase der schweren Pneumonie geeignet sein. Übereinstimmend wurde in einer anderen Publikation diskutiert, dass sich mit Ang-2 allein keine prognostische Aussage treffen lässt, sondern immer das Ang-2/Ang-1-Verhältnis betrachtet werden sollte, da sich die beiden Liganden gegenseitig regulieren und nur durch diese Interaktion der Phänotyp des Endothels entstehen kann (Hashimoto & Pittet 2006). In einer Studie von 2012 wurden Ang-2-Plasmakonzentrationen von Patienten gemessen, die an einem nicht-infektionsbedingtem bzw. einem infektionsbedingtem ALI* verstorben waren oder dieses überlebten. Dabei lag bei Patienten mit einem infektionsbedingtem ALI*, deren Plasma-Ang-2-Level von Tag 0 zu Tag 3 anstieg, die Wahrscheinlichkeit zu versterben fast doppelt so hoch wie bei Patienten, deren Ang-2-Spiegel über die gleiche Zeit sanken (Calfée et al. 2012). An Tag 0 (Baseline) bestimmte Ang-2-Konzentrationsvergleiche ließen jedoch keine Rückschlüsse auf Verlauf und Mortalität zu. In dieser Studie diente der von Willebrand Faktor als bereits dokumentierter Indikator für die Prognose und Pathogenität bei Sepsis und ALI*. Bemerkenswert ist hier, dass es durch konservative Infusionstherapie zu einem Abfall um 15 % von der Ang-2-Serumkonzentration kam und somit zu einer Reduktion der

endothelialen Inflammation, nicht jedoch zu einem Abfall der Serumkonzentration des von Willebrand Faktors (Calfee et al. 2012).

Es muss bei dem Vergleich mit anderen Studien allerdings bedacht werden, dass in einigen der oben genannten Untersuchungen der Ang-1- und Ang-2-Gehalt in Blutplasmaproben und nicht wie in der vorliegenden Arbeit in Serumproben gemessen wurde (Ricciuto et al. 2011; Ong et al. 2010). Nach einer Präsentation der Daten der vorliegenden Arbeit auf einem Kongress wurde diskutiert, ob die Analyse von Serumproben im Vergleich zu Plasmaproben durch den fehlenden Gehalt wichtiger Proteine eine geringere Aussagekraft zulasse. Da Komplement, Zytokine und Chemokine eng mit Funktion und Wirkung des Ang/Tie2-Systems verknüpft sind, wäre die Wiederholung der Studie unter Verwendung von Plasmaproben interessant. Jedoch scheint Ang-1 nur schwer in EDTA-Plasma nachweisbar zu sein. (Lukasz et al. 2008), was wiederum eher für die Verwendung von Serum als geeignetes Probenmaterial sprechen würde.

Letztendlich scheint Ang-2 als alleiniger Biomarker in der schweren Pneumonie nicht geeignet zu sein. Jedoch gibt es in der Literatur einige Hinweise dafür, dass Ang-2 geeignet ist, Patienten mit erhöhtem Risiko für eine längere intensivmedizinische Beatmung und Betreuung sowie für ein erhöhtes Sterberisiko zu identifizieren (Agrawal et al. 2013; Meyer & Christie 2012).

5.2 Die Angiopietin-2-Serumkonzentration bei Patienten mit einem Pneumonie-induzierten *acute respiratory distress syndrome* ist initial erhöht und sinkt während der Genesung

In einer weiteren Studie sollte untersucht werden, wie sich die Ang-1- und Ang-2-Serumkonzentrationen im Verlauf eines Pneumonie-induzierten ARDS verhalten. Patienten, die an einem Pneumonie-induzierten ARDS erkrankt waren, wurde direkt nach Einweisung auf die Intensivstation (0 h), 24 h und 7 d später Blut entnommen. Die Ang-2-Serumkonzentration war gleich zu Beginn stark erhöht, nahm im Krankheitsverlauf aber deutlich ab. Die Ang-1-Serumkonzentration war zu Beginn der intensivmedizinischen Betreuung verringert und stieg im weiteren Verlauf wieder an. Es wird vermutet, dass Ang-2 eher zu Beginn der Erkrankung hochreguliert wird, ähnlich wie dies z.B. für Endotoxämie und Sepsis gezeigt worden ist (Kümpers et al. 2009).

In vitro konnte gezeigt werden, dass Ang-2 ein schneller Initiator ist, der das Endothel in einen aktiven Zustand versetzt und weitergehende inflammatorische Antworten katalysiert (Fiedler et al. 2006; Fiedler & Augustin 2006). Ang-2 wird durch verschiedene Stimuli (z.B. Thrombin, VEGF, TNF- α) aus den Weibel-Palade *bodies* rasch freigesetzt und nach und

nach verbraucht (Fiedler et al. 2004; van der Heijden et al. 2009). Dies könnte erklären, warum die Ang-2-Konzentration im akuten Stadium der Pneumonie erhöht ist. Sind weitere Entzündungskaskaden in Gang gesetzt, könnte zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung außerdem eine verminderte Freisetzung von Ang-2 über regulatorische Mechanismen erfolgen. So wird z.B. die Ang-2-Expression in Endothelzellen über einen (PI3K)Akt/FOXO1-Weg kontrolliert. Ang-1 inhibiert die FOXO1-Phosphorylierung, so dass letztendlich weniger Ang-2 exprimiert wird (Daly et al. 2006; Daly et al. 2004; Tsigkos et al. 2006).

Im ruhenden Endothel soll jedoch ständig ein niedriger Basis Ang-2-Spiegel vorhanden sein, der eine Tie2-Phosphorylierung und somit eine agonistische, aber schwächere Rezeptorantwort als Ang-1 auslöst um das Überleben der Endothelzellen zu verbessern (Yuan et al. 2009).

5.3 Marathonläufer weisen unmittelbar nach dem Marathon hohe Angiopoietin-2-Werte und erhöhte Entzündungsparameter im Blut auf

Um Aufschluss über die zeitliche Kinetik der Freisetzung von Ang-2 im menschlichen Körper zu erhalten, wurde Marathonläufern Serum abgenommen. Bei den Läufern des Berlin-Marathons (n = 18, RUNINFLAME-Studie) zeigten sich unmittelbar nach dem Marathon deutlich erhöhte Leukozytenwerte im Vergleich zu den vor dem Marathon erfassten Werten. Insbesondere der Anteil der neutrophilen Granulozyten war deutlich erhöht. Auch der CRP-Wert, ein Inflammationsmarker (Ho & Lipman 2009; Simon et al. 2004), zeigte einen Anstieg, aber erst 24 h nach dem Marathon. Die Ang-2-Serumkonzentration war jedoch bereits unmittelbar nach dem Marathonlauf erhöht und fiel 24 h nach dem Marathon wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Eine Korrelation der Ang-2-Werte mit der Anzahl der Leukozyten, im Speziellen der neutrophilen Granulozyten, konnte zum Zeitpunkt direkt nach dem Marathonlauf ebenfalls nachgewiesen werden. Diese zu einem sehr frühen Zeitpunkt nachweisbare Erhöhung von zirkulierendem Ang-2 deutet wieder darauf hin, dass Ang-2 in erster Linie sehr früh am Inflammationsprozess beteiligt ist. Während eines Marathons laufen vermutlich ähnliche inflammatorische Prozesse im Körper ab wie bei einer bakteriellen Infektion. Denn ein Marathonlauf wirkt als ein proinflammatorischer Stimulus auf den Körper und steigert besonders die Zytokinproduktion, u.a von IL-6, IL-10, TNF- α und CRP (Bernecker et al. 2011; Nickel et al. 2011). In einer anderen Arbeit wird vermutet, dass die Erhöhung von z.B. IL-6 durch die bei prolongierten Übungseinheiten einsetzende Hypokapnie verursacht wird (Waśkiewicz et al. 2011). Der Trainingsgrad der Läufer soll keinen Einfluss auf die Menge der Zytokinfreisetzung haben (Nickel et al. 2011).

5.4 Angiopoietin-2 wird in humanen Lungen (*post mortem*) von Endothelzellen exprimiert

Durch die Analyse von postmortalem humanem Lungengewebe wurde die Lokalisation von Ang-1, Ang-2 und Tie2 in der Lunge bestimmt. Ang-1 konnte in verschiedenen Zellen in der Lunge nachgewiesen werden, während sich die Expression von Ang-2 und Tie2 auf Lungenendothelzellen beschränkte. Diese Ergebnisse zeigen Übereinstimmung mit Publikationen über Untersuchungen an Knochenmarkszellen, Ovarien, Maus-Embryonen und Gehirnkapillaren (Maisonpierre et al. 1997; Sato et al. 1998; Schnürch & Risau 1993). Die Produktion von Ang-1 im Körper erfolgt überwiegend von Perizyten, glatten Muskelzellen, Megakaryozyten, Endothelzellen und Pneumozyten Typ I. Ang-2 wird ausschließlich von Endothelzellen exprimiert und auf bestimmte Signale hin aus deren Weibel-Palade *bodies* sekretiert. Tie2 befindet sich überwiegend auf der Oberfläche von Endothelzellen. Somit gehen die erhobenen Ergebnisse konform mit der aktuellen Literatur. Gespeichertes Ang-2 hat eine lange Halbwertszeit von 18 Stunden und wird innerhalb von Minuten nach Stimulation autokrin sekretiert, z.B. durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), Thrombin, Vasopressin und Histamin (Fiedler et al. 2004; Dikranian & Stoinov 1991; van der Heijden et al. 2009). Mittels semiquantitativer Immunhistochemie konnten jedoch keine Unterschiede hinsichtlich Expression und Speicherung von Ang-2 bei Infektion detektiert werden. Weiterführende Untersuchungen mittels *life-cell-imaging* an infizierten *ex vivo* kultiviertem humanem Lungengewebe, kombiniert mit Immun-Elektronenmikroskopie könnten Aufschluss über die dynamischen Prozesse der Ang-2-Regulation und Sekretion geben.

5.5 Angiopoietin-2 wird *in vitro* von Endothelzellen nach Pneumolysin-Stimulation freigesetzt

Die Messung des transzellulären elektrischen Widerstandes (TER) von HUVEC-Monolayern mittels ECIS-Technologie lässt Rückschlüsse auf deren Permeabilität zu. Der TER sinkt mit zunehmender Permeabilität des Zellverbandes, denn durch einen nicht intakten Zellmonolayer fließt der Strom leichter, der zwischen der Elektrode und der Gegenelektrode angelegt ist. Der Widerstand wird daher geringer. PLY ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor von *S. pneumoniae*. Dieses Exotoxin ist in der Lage, Zellen zu lysieren (Cockeran et al. 2002) bzw. in subzytolytischen Konzentrationen Permeabilität (auch im ECIS-Modell) zu induzieren, wie es bereits in Studien anderer Arbeitsgruppen, aber auch in der AG Witzenrath gezeigt werden konnte (Witzenrath et al. 2006; Rubins et al. 1992; Lucas, Sridhar, et al. 2012; Lucas, Yang, et al. 2012). Bei einer Stimulation von HUVECs mit verschiedenen PLY-Konzentrationen führte dies zu einer Dosis-abhängigen Senkung des

TER und damit zu einer erhöhten Permeabilität der Zellen. Von Thrombin ist bereits bekannt, dass es zu einer reversiblen Erhöhung der Permeabilität in HUVECs führt (Smurova et al. 2004). Im Gegensatz dazu war in der vorliegenden Arbeit die Permeabilität drei Stunden nach PLY-Gabe immer noch auf dem maximalen Stand. Diese PLY-induzierte Permeabilitätserhöhung ging mit einer signifikant erhöhten Freisetzung von Ang-2 einher. Im Überstand von Thrombin-stimulierten HUVECs konnte jedoch nur ein tendenzieller Ang-2-Anstieg beobachtet werden, während der IL-6-Gehalt im Zellkulturüberstand signifikant erhöht war. Durch PLY wurde die IL-6-Freisetzung aus den Zellen jedoch nicht beeinflusst. Interessanterweise soll Thrombin die Expression von Ang-1 und Tie2 in HUVECs hoch regulieren und die Ausschüttung von Ang-2 aus den Weibel-Palade *bodies* inhibieren (Bae & Rezaie 2010).

Die Ergebnisse könnten einen Hinweis darauf geben, dass bei der PLY-induzierten endothelialen Inflammation und Permeabilitätsentstehung Ang-2 eher eine Rolle zu spielen scheint als IL-6, was auch für das pulmonale Endothel bei einer Pneumokokkenpneumonie zutreffen könnte. Möglicherweise wird die PLY-induzierte Permeabilität auch über Ang-2 vermittelt. Eine explizite Erklärung für den Mechanismus der PLY-induzierten Permeabilitätserhöhung gibt es derzeit jedoch noch nicht (Witzenrath et al. 2006; Lucas, Yang, et al. 2012; Lucas, Sridhar, et al. 2012).

5.6 Angiopoietin-2 reduziert *in vitro* die endotheliale Integrität kurzfristig und reversibel

Um zu untersuchen, ob Ang-2 direkt die Permeabilität eines Endothelzellmonolayers beeinflussen kann, wurden HUVECs mit Ang-2 stimuliert. Bei der höchsten verwendeten Ang-2-Konzentration (2000 ng/ml) kam es innerhalb kürzester Zeit zu einem schnellen, rasch reversiblen Abfall des TER im ECIS-Versuch. Parikh und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass Ang-2 die Funktion der endothelialen Barriere durch Phosphorylierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase beeinträchtigen kann (Parikh et al. 2006). Andere *in vitro* Untersuchungen lassen darauf schließen, dass noch weitere nachfolgende Signalwege des Ang/Tie2-Systems eine Bedeutung für die vaskuläre Permeabilität haben. So aktiviert die Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors durch Ang-1 die PI3K und Rac1, wodurch das p190RhoGTPase-aktivierende Protein stimuliert wird, was zur Inaktivierung von RhoA und somit der Rho-Kinase führt. Dies resultiert in einer Reduktion der Bildung von F-aktin-Stressfasern und führt somit zu einer Verminderung der endothelialen Permeabilität (Mammoto et al. 2007). Außerdem blockiert Ang-1 den Inositol-tri-Phosphat (IP3)-Rezeptor und verhindert so den extrazellulären Kalziuminflux mittels eines TRPC1-Ionenkanals (TRPC

= *transient receptor potential channel*), wodurch *in vitro* endotheliale Hyperpermeabilität reduziert wird (Jho et al. 2005; Ahmmed et al. 2004).

Ang-1 vermindert auch die Expression der Phosphokinase-C (PKC), wodurch es zu einer geringeren Phosphorylierung der Myosin-Leichte-Kette kommt und somit zu einer reduzierten F-Aktin-Stressfaserbildung, was wiederum zu einer Stabilisierung der Endothelzellen führt (Yu et al. 2012).

Über eine ERK1/2-abhängige Aktivierung der Sphingosinkinase-1 steigert Ang-1 das Vorkommen des Junctionproteins VE-Cadherin. Dies führt *in vitro* zu einer Verminderung der endothelialen Permeabilität (Li et al. 2008). Ang-2 dagegen vermindert das Vorkommen des VE-Cadherins. Diese Wirkung kann durch Ang-1 aufgehoben werden (Parikh et al. 2006).

5.7 Eine Vorbehandlung mit spezifischer siRNA gegen Angiopoietin-2 vermindert die Pneumolysin-induzierte Permeabilität in der isoliert perfundierten Mauslunge

Um die Rolle von Ang-2 bei der PLY-induzierten Hyperpermeabilität in der Pneumokokkenpneumonie weiter zu untersuchen, sollte diese nach einer Reduktion der Ang-2-Expression durch Applikation von spezifischer, gegen Ang-2 gerichteter siRNA im Modell der IPML untersucht werden. Tatsächlich konnte in diesem Versuchsansatz die PLY-induzierte Permeabilität der isoliert perfundierten Mauslunge durch eine Ang-2 siRNA-Vorbehandlung reduziert werden.

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass PLY eine zentrale Rolle in der frühen Phase der Entstehung eines akuten Lungenschadens bei einer schweren Pneumokokkenpneumonie spielt (Witzenrath et al. 2006; Witzenrath et al. 2007; Witzenrath et al. 2011). Die genauen Mechanismen sind allerdings bisher nicht vollständig verstanden. Ang-2 kann durch verschiedene Stimuli freigesetzt werden (Fiedler et al. 2004). Die *in vitro* Versuche mit HUVECs in dieser Studie (Abbildungen 13 und 14) zeigen, dass PLY eine Ang-2-Freisetzung induzieren kann und dass die Permeabilität auch durch eine alleinige Ang-2-Applikation reversibel erhöht wird. Diese *in vitro* Ergebnisse und die Beobachtungen aus den IPML-Versuchen geben Hinweise darauf, dass Ang-2 an der PLY-induzierten Permeabilität beteiligt ist. Es ist bekannt, dass Ang-2 nach Freisetzung das Endothel aktiviert und zu einer erhöhten endothelialen Permeabilität und Inflammation führen kann (Fiedler et al. 2006). Durch Reduktion der freigesetzten Ang-2-Menge durch die siRNA-Vorbehandlung konnte eventuell die benötigte Konzentration für einen antagonistischen Ang-2-Effekt am Tie2-Rezeptor in diesen Lungen nicht erreicht werden und die agonistische Ang-1-Antwort, die zu endothelialer Stabilität und Ruhe führt, überwog, was möglicherweise die PLY-induzierte

pulmonale Hyperpermeabilität beeinflusste und zu einer Reduktion beitrug. Ob dabei die unter 5.6 genannten möglichen Mechanismen in der ablaufenden Signalkaskade von Bedeutung sind, müsste allerdings noch untersucht werden.

5.8 Im murinen Pneumokokkenpneumonie-Modell zeigt sich eine erhöhte pulmonale Angiopoietin-2-mRNA-Expression nach Infektion

In einem *in vivo* Experiment mit *S. pneumoniae* infizierten Mäusen stieg die Ang-2-mRNA-Expression im Lungengewebe im Vergleich zu gesunden, mit PBS-behandelten Mäusen an. Die Expression von Ang-1-mRNA und Tie2-mRNA sank mit zunehmendem Schweregrad der Pneumonie. Der Schweregrad der Pneumonie wurde u.a. am steigenden Gewichtsverlust und der abnehmenden Körpertemperatur der Tiere ermittelt.

In vorausgegangenen Experimenten anderer Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF- α (I Kim et al. 2000), aber auch Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF (*basic fibroblast growth factor*), Hypoxie (Mandriota & Pepper 1998) und bakterielle Bestandteile (u.a. LPS) die Expression von Ang-2 steigern können (Mofarrahi et al. 2008). Auch bei einer Pneumonie bzw. einem daraus resultierendem ALI* kommt es durch freigesetzte bakterielle Bestandteile, wie u.a. PLY (Witzenrath et al. 2006), aber auch durch andere Stimuli wie Hypoxie oder proinflammatorische Mediatoren zu einer Triggerung des Entzündungsgeschehens und dadurch auch zu einer Expressionserhöhung von Ang-2 (Bhandari & Elias 2007). Der erhöhte Ang-2-Spiegel könnte nun entscheidend zum Verlust der endothelialen Integrität während einer Sepsis beitragen (Parikh et al. 2006). Die gleichen Mechanismen zur Hochregulation der Ang-2-Expression könnten auch in der Pneumokokkenpneumonie eine Rolle spielen.

5.9 Therapie mit Angiopoietin-1 reduzierte die pulmonale Inflammation und Permeabilität bei muriner Pneumokokkenpneumonie

In dieser Arbeit zeigte sich, dass eine Ang-1-Therapie im Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie zu einer verringerten PMN-Rekrutierung, einem verminderten Gehalt proinflammatorischer Zytokine in der BALF und einer reduzierten pulmonalen Permeabilität führte. Das Allgemeinbefinden in Hinsicht auf Körpergewicht und -temperatur war ebenfalls verbessert. Die reduzierte Permeabilität und die verbesserte Klinik der Tiere waren vermutlich Folgen der verringerten pulmonalen Inflamationsreaktion.

Ang-2 führt unmittelbar nach seiner Freisetzung aus den Weibel-Palade *bodies* zu einer kurzen, initialen Aktivierung des Endothels und bewirkt somit eine schnelle und unmittelbare Antwort des Endothels auf unterschiedliche Stimuli. Entzündungskaskaden werden initiiert,

Endothelzellen für TNF- α sensibilisiert und Zelladhäsionsmoleküle exprimiert. Mit diesem autokrinen Mechanismus wird eine umgehende Antwort und Regulation des vaskulären Endothels auf exogene Stimuli hin zu einer proinflammatorischen und prokoagulatorischen Antwort gewährleistet (Fiedler et al. 2006; Fiedler et al. 2004).

Der antiinflammatorische Effekt einer Ang-1-Therapie wurde bereits in vielen Veröffentlichungen in ähnlichen Krankheitsmodellen dargestellt. So konnte in einem ALI*-Rattenmodell gezeigt werden, dass durch eine Modulation des Ang/Tie2-Systems mittels Ang-1-Gentherapie auch ein LPS-induzierter akuter Lungenschaden positiv beeinflusst werden kann (McCarter et al. 2007). In einer anderen Arbeit wurde Mäusen nach i.p. Endotoxingabe ein Adenovirus verabreicht, welches eine vermehrte Ang-1-Expression bewirkte. Diese vermehrte Ang-1-Expression führte zu einem verminderten vaskulären Proteinverlust und zu einer verminderten Endotoxin-induzierten Mortalität. Die erhöhte Mortalität bei einem ARDS nach einer Infektion wurde so reduziert (Huang et al. 2008). Bei einem LPS-induzierten Endotoxinschock führte ebenfalls eine Vorbehandlung mit Ang-1 exprimierendem Adenovirus zu einer reduzierten Mortalität und besserem klinischen Erscheinungsbild (Witzenbichler et al. 2005). Es wurde beschrieben, dass das Überleben von Endothelzellen durch Ang-1 über einen PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg erfolgt (I. Kim et al. 2000) und somit direkt eine Verstärkung von Zellverbindungen bewirkt, Thrombin- und VEGF-Antworten am Endothel inhibiert und die TNF- α -induzierte Leukozytentransmigration verhindert (Gamble et al. 2000).

Die Ang-1-Gabe könnte somit in der Zukunft eine potentielle Therapie in der Behandlung von ARDS Patienten darstellen. Jedoch ist das Timing der Applikation besonders kritisch (Huang et al. 2008), da das Ang/Tie2-System sehr früh in der Entstehung von Inflammation und Hyperpermeabilität in der Lunge zu wirken scheint.

Die Bedeutung des Ang/Tie2-Systems für die Angiogenese und die Tumervaskularisation muss jedoch für zukünftige Therapien bedacht werden. Die weitreichende Wirkung könnte einen gezielten therapeutischen Einsatz von Ang-1 erschweren. So induzierte Ang-1 experimentell eine vermehrte Vaskularisation (Suri et al. 1998), eine Hyperplasie der Lymphgefäße (Tammela et al. 2005) und pulmonale Hypertonie (Sullivan et al. 2003; Chu et al. 2004). Außerdem führte eine Ang-1-Therapie bei Patienten mit einem akuten Nierenschaden und Nekrosen der Nieren zu Inflammation und Fibrose der Nieren (Long et al. 2008). Bei Patienten mit einem okkulten Tumor könnte eine Ang-1-Therapie zu einer Metastasierung führen (Holopainen et al. 2009). Es konnte sogar ein mitogener Effekt von Ang-1 auf HUVECs nachgewiesen werden (Kanda et al. 2005). Kurzfristig ist das Ang/Tie2-System an der Pathologie des Entzündungsgeschehens beteiligt, längerfristige

Veränderungen dieses Systems führen jedoch zur Tumorinitiation (Augustin et al. 2009). Es ist daher möglich, dass in Zukunft Ang-2-beeinflussende Therapien bevorzugt werden (Fiedler & Augustin 2006). Ang-2-neutralisierende Medikamente wurden bereits für eine potentielle Tumorthherapie beim Menschen im Tiermodell erfolgreich getestet (Oliner et al. 2004). Eine weitere Möglichkeit würde auch die Aktivierung des Tie2-Rezeptors durch einen spezifischen synthetisch hergestellten Agonisten bieten, der keine Tie2-unabhängigen Effekte von Ang-1 induziert (Kümpers et al. 2011; David et al. 2013).

6 Zusammenfassung

Die Bedeutung der Angiopoietine-1 und -2 und ihres Rezeptors Tie2 in der Pneumokokkenpneumonie

Trotz einer adäquaten antimikrobiellen Therapie kommt es bei einer Pneumonie häufig zu überschießenden Entzündungsreaktionen und endothelialer Hyperpermeabilität, was zu akutem Lungenversagen und Tod führen kann. Der Grund hierfür liegt zumeist in einer inadäquaten Pathogen-Wirts-Interaktion. Eine Therapie des akuten Lungenversagens ist derzeit nur supportiv möglich. Zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten und zur frühzeitigen Identifikation von Risikopatienten mit erhöhter Mortalität ist ein tieferes Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen bei der Pneumonie unverzichtbar. Ang-1 und Ang-2 sind Liganden der Rezeptortyrosinkinase Tie2 mit weitreichender Bedeutung für die Angiogenese und Tumervaskularisation. Weiterhin sind sie an der Entstehung von endothelialer Permeabilität und Inflammation zentral beteiligt, denn Ang-1 erzeugt durch Tie2-Aktivierung ein inaktives, ruhendes Endothel, wohingegen Ang-2 als kompetitiver Antagonist Endothelaktivierung, erhöhte Permeabilität und eine Initiierung von Entzündungskaskaden bewirkt. Es wird u.a. durch inflammatorische Stimuli aus den endothelialen Weibel-Palade *bodies* frei gesetzt. Es wurde bereits gezeigt, dass bei Sepsis und insbesondere bei Sepsis mit Lungenversagen die Ang-2-Konzentration im Blut und das Ang-2/Ang-1-Verhältnis erhöht sind. Die Rolle des Ang/Tie2-Systems in der schweren Pneumonie wurde bisher noch nicht untersucht. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bedeutung des Ang/Tie2-Systems in der Pneumokokkenpneumonie zu untersuchen und zu evaluieren, ob Ang-2 als möglicher Biomarker zur Risikostratifizierung bei der schweren Pneumonie geeignet ist. In differenziellen experimentellen Ansätzen auf unterschiedlicher Komplexebene sollte die Rolle des Ang/Tie2-Systems beim Pneumonie-induzierten akuten Lungenversagen und sein Potential für mögliche therapeutische Ansätze geprüft werden. In einer initialen Messung wurden verringerte Ang-1- und erhöhte Ang-2-Serumkonzentrationen bei Pneumoniepatienten im Vergleich zu gesunden Blutspendern ermittelt (n = 20). In einer nachfolgenden Studie konnten diese Ergebnisse verifiziert werden. Weiterhin zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied in der Ang-2-Serumkonzentration zwischen Pneumoniepatienten mit letalem (innerhalb von 28 Tagen verstorben, n = 64) vs. nicht-letalem (n = 64) Verlauf. Dieser Unterschied konnte jedoch bei einer Wiederholungsstudie (n = 74 pro Gruppe) zur Prüfung der statistischen Validität der bereits erhobenen Ergebnisse nicht bestätigt werden. Für Rückschlüsse auf die Dynamik des Ang/Tie2-Systems wurden Serumproben (VALID Studie) von Patienten mit einem Pneumonie-induziertem ARDS zu drei verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der intensivmedizinischen Behandlung untersucht

(n = 38). Zu den Zeitpunkten 0 h und 24 h nach Aufnahme auf die Intensivstation wurden erhöhte Ang-2- und verringerte Ang-1-Serumkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Blutspender-kontrollen gemessen. Patienten, die das ARDS überlebten, hatten sieben Tage nach dem intensivmedizinischen Behandlungsbeginn nahezu normale Ang-1- und Ang-2-Werte. Um weitere Aussagen über die Kinetik der Ang-2-Freisetzung bei einer akuten Inflammation treffen zu können, wurden in einer prospektiven Studie Blutproben von Läufern des Berlin-Marathons (n = 18, Studie RUNINFLAME) auf verschiedene Entzündungsparameter hin untersucht, da ein Marathonlauf als ein proinflammatorischer Stimulus auf den Körper zu wirken scheint. Der CRP-Wert aller Läufer stieg erst 24 h nach dem Lauf an. Die Ang-2-Serumkonzentration war hingegen unmittelbar nach dem Lauf erhöht und sank 24 h später wieder auf die Ausgangskonzentrationen ab. Ang-2 könnte somit ein sehr frühzeitiger Marker für Inflammation sein. Zur Lokalisation von Ang-1, Ang-2 und ihres Rezeptors Tie2 in der Lunge wurden Lungenproben von gesunden und an Pneumonie erkrankten Menschen immunhistochemisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass Ang-1 von verschiedenen Zelltypen exprimiert wurde, wohingegen eine Ang-2- und Tie2-Expression ausschließlich in Endothelzellen detektiert wurde. *In vitro* konnte beobachtet werden, dass eine Pneumolysin-stimulation (PLY) zu einer Ang-2-Freisetzung aus Endothelzellen (HUVECs) führte, nicht aber zu einer Freisetzung von IL-6. Eine Stimulation von HUVECs mit Ang-2 bewirkte bei der höchsten Konzentration einen kurzen, reversiblen Permeabilitätsanstieg. Zur Ermittlung einer möglichen Beteiligung von Ang-2 an der PLY-induzierten pulmonalen Permeabilität wurden Mäuse mit spezifischer siRNA gegen Ang-2 (Atuplex) behandelt und anschließend ihre isolierten, perfundierten und ventilierten Lungen (IPML) mit PLY stimuliert. Diese siRNA-Vorbehandlung führte zu einer Reduktion der PLY-induzierten alveolokapillären Barriestörung. Abschließend wurde die Rolle des Ang/Tie2-Systems *in vivo* im Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie untersucht. Die pulmonale Ang-2-mRNA-Expression stieg im Pneumonieverlauf an, während die von Ang-1 und Tie2 reduziert war. Eine Ang-1-Therapie, beginnend 22 h nach einer Infektion mit *S. pneumoniae*, führte bei den Tieren zu einer verminderten Zytokinfreisetzung, verringerter Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und einer reduzierten Lungenpermeabilität 48 h nach der Infektion.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass das Ang/Tie2-System eine zentrale Bedeutung in der Pneumokokkenpneumonie hinsichtlich Inflammation und pulmonaler Hyperpermeabilität hat. Ein zuvor diskutierter Einsatz von Ang-2 als alleiniger prognostischer Biomarker für die schwere Pneumonie ist nach dieser Arbeit eher abzulehnen. Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen geben jedoch Hinweise darauf, dass eine Veränderung des Ang-1/Ang-2-Verhältnisses einen möglichen therapeutischen Ansatz in der schweren Pneumonie darstellen könnte.

7 Summary

The role of the Angiopoietins-1 and -2 and their receptor Tie2 in pneumococcal pneumonia

Despite effective antibiotic therapies, pathogen-host interaction in pneumonia may lead to excessive inflammation and endothelial hyperpermeability, which can result in life-threatening lung failure and death. The treatment of acute lung injury is hitherto mainly supportive. To develop new therapeutic approaches and to identify pneumonia patients at high risk of mortality as early as possible, it is essential to elucidate pathomechanisms underlying pneumonia.

Ang-1 and -2 are ligands of the receptor tyrosine kinase Tie2. Their roles in angiogenesis and tumor vascularization are well known, but they are also centrally involved in the development of endothelial permeability and inflammation. Generally Ang-1 evokes Tie2 activation, which in turn leads to an inactive, quiescent vascular endothelium, whereas on the contrary Ang-2 as the competitive antagonist leads to endothelial activation, increasing endothelial permeability and initiation of other inflammatory cascades. It has been shown that Ang-2 blood levels and the Ang-2/Ang-1 ratio were increased in sepsis and particularly in sepsis with lung failure. However, the role of the Ang/Tie2 system in severe pneumonia has not been investigated so far.

The aim of this study was to analyze the role of the Ang/Tie2 system in pneumococcal pneumonia and to evaluate Ang-2 as a possible biomarker for risk stratification in severe pneumonia. Therefore, different experimental approaches were employed to assess the role and the therapeutic potential of the Ang/Tie2 system in pneumonia-induced acute lung injury.

In a pilot analysis decreased Ang-1 and increased Ang-2 serum levels were observed in pneumonia patients (n = 20) as compared with healthy blood donors. In the following study, these results were verified. Furthermore, a difference in Ang-2 serum levels between survivors (n = 36) and non-survivors (n = 64) with significantly higher Ang-2 serum levels in non-survivors (28-day mortality) was determined. However, this finding could not be reproduced in a larger cohort study (n = 75 per group). Next, serum of mechanically ventilated intensive care unit patients during the course of pneumonia-induced ARDS (VALID study, n = 38) was analyzed. There were increased Ang-1 serum levels at study entry and 24 hours later. During recovery, Ang-1 increased and Ang-2 decreased almost to serum levels of healthy control subjects within seven days. To further decipher the kinetics of Ang-2 liberation in acute inflammation, a prospective, observational study was conducted with subjects who participated in the Berlin marathon (n = 18), which is known to be a pro-

inflammatory event (RUNINFLAME). All subjects showed increased CRP levels 24 h after the run as compared with their pre-run levels, but not directly after the run. Notably, Ang-2 levels were highly increased directly after the run and returned to pre-run levels 24 h later, suggesting that Ang-2 is a very rapid marker of inflammation. For localization of Ang-1, Ang-2 and their receptor Tie2 in the lung, immunohistochemistry was performed on human lung tissue of pneumonia patients and healthy controls. Ang-1 was found to be expressed in various cell types, whereas Ang-2 and the receptor Tie2 were exclusively expressed in endothelial cells. In further *in vitro* studies, we observed that stimulation of endothelial cells (HUVECs) with pneumolysin (PLY), an important pathogenic factor of *S. pneumoniae*, was associated with significantly increased Ang-2 release, while no effect on IL-6 release was documented. In *Electrical cell substrate impedance sensing* (ECIS) experiments Ang-2 had permeabilizing effects on HUVEC monolayers. Hypothesizing that Ang-2 might be involved in PLY-induced permeability, mice were intravenously treated with specific siRNA against Ang-2 (Atuplex), and their isolated perfused and ventilated lungs (IPML) stimulated with pneumolysin (PLY), an important pathogenic factor of *S. pneumoniae*. Lungs of mice treated with Ang-2 specific siRNA showed reduced permeability upon PLY stimulation compared to lungs of mice treated with luciferase-specific siRNA as control, suggesting that Ang-2 contributes to PLY-induced permeability in intact lungs. Finally, the role of the Ang/Tie2 system was examined in a mouse model of pneumococcal pneumonia. Pulmonary mRNA expression of Ang-2 increased in the course of pneumonia, while Ang-1 and Tie2 mRNA expressions were reduced. Remarkably, Ang-1 treatment of *S. pneumoniae* starting 22 h after infection led to reduced cytokine secretion, neutrophil recruitment and lung permeability 48 h after infection.

In summary, the results suggest that the Ang/Tie2 system plays a central role in pneumonia-evoked inflammation and hyperpermeability. As discussed, Ang-2 does not seem to be suitable for risk stratification in severe pneumonia. However, the results from the different experimental approaches suggest that targeting the Ang-1/Ang-2 balance may provide a new therapeutic perspective in severe pneumonia.

8 Literaturverzeichnis

- Agrawal, A. et al., 2013. Plasma angiopoietin-2 predicts the onset of acute lung injury in critically ill patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(7), pp.736–742.
- Ahmed, G.U. et al., 2004. Protein Kinase C Phosphorylates the TRPC1 Channel and Regulates Store-operated Ca²⁺ Entry in Endothelial Cells *. *The Journal of biological chemistry*, 279(20), pp.20941–20949.
- Alkholi, U.M. et al., 2011. Serum Procalcitonin in Viral and Bacterial Meningitis. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(1), pp.14–18.
- Anand, N. & Kollef, M.H., 2009. The Alphabet Soup of Pneumonia : CAP, HAP, HCAP, NHAP, and VAP. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 30(1), pp.3–9.
- Applebaum, P., 1987. World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *European Journal of Clinical Microbiology*, 6(4), pp.367–77.
- Ashbaugh, D.G. et al., 1967. Acute respiratory distress in adults. *The Lancet*, 2(7511), pp.319–23.
- Augustin, H.G. et al., 2009. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(3), pp.165–77.
- Bae, J.-S. & Rezaie, A.R., 2010. Thrombin upregulates the angiopoietin – Tie2 Axis : endothelial protein C receptor occupancy prevents the thrombin mobilization of angiopoietin 2 and P-selectin from Weibel – Palade bodies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8, pp.1107–1115.
- Baffert, F. et al., 2006. Angiopoietin-1 decreases plasma leakage by reducing number and size of endothelial gaps in venules. *American Journal of physiology. Heart and circulatory physiology.*, 290(1), pp.H107–118.
- Bauer, T., 2006. Brennpunkt CAPNETZ : Das Kompetenznetzwerk der ambulant erworbenen Pneumonie in Deutschland. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*, 60, pp.111–113.
- Bauer, T.T. et al., 2006. CRB-65 predicts death from community-acquired pneumonia. *Journal of internal medicine*, 260(1), pp.93–101.
- Bernard, G. et al., 1994. The American-European consensus conference on ARDS. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 149, pp.818–824.
- Bernecker, C. et al., 2011. Evidence for an exercise induced increase of TNF- α and IL-6 in marathon runners. *Scandinavian Journal of Medicine Science in Sports*, 23(2), pp.207–214.
- Bethmann, A.N. von et al., 1998. Hyperventilation Induces Release of Cytokines from. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 157, pp.263–272.

- Bhandari, V. et al., 2006. Hyperoxia causes angiopoietin 2-mediated acute lung injury and necrotic cell death. *Nature Medicine*, 12(11), pp.1286–1293.
- Bhandari, V. & Elias, J.A., 2007. The role of angiopoietin 2 in hyperoxia-induced acute lung injury. *Cell Cycle*, 6(9), pp.1049–1052.
- Bouïš, D. et al., 2006. A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 53(2), pp.89–103.
- Boulnois, G.J. et al., 1991. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 5(11), pp.2611–6.
- Boussekey, N. et al., 2005. Diagnostic and Prognostic Values of Admission Procalcitonin Levels in Community-Acquired Pneumonia in an Intensive Care Unit. *Infection*, 33(4), pp.257–263.
- Boussekey, N. et al., 2006. Procalcitonin kinetics in the prognosis of severe community-acquired pneumonia. *Intensive care medicine*, 32(3), pp.469–472.
- Bradley, J.S. & Scheld, W.M., 1997. The challenge of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* meningitis: current antibiotic therapy in the 1990s. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 24 Suppl 2(figure 3), pp.S213–21.
- Calfee, C.S. et al., 2012. Plasma angiopoietin-2 in clinical acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Critical care medicine*, 40(6), pp.1731–1737.
- CAPNETZ, The CAPNETZ FOUNDATION as a provider. 07.03.2013. Available at: www.capnetz.de/html/stiftung/traeger.
- Cho, C.H. et al., 2004. Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), pp.5553–5558.
- Chowdhury, O. et al., 2012. CPAP review. *European journal of pediatrics*, 171(10), pp.1441–8.
- Chu, D. et al., 2004. A new animal model for pulmonary hypertension based on the overexpression of a single gene, angiopoietin-1. *The Annals of Thoracic Surgery*, 77(2), pp.449–456.
- Cockeran, R., Anderson, R. & Feldman, C., 2002. The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Current opinion in infectious diseases*, 15(3), pp.235–239.
- Dahme, E., Weiss, E. & Rudolph, R., 1999. Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. In *Enke*. Stuttgart: Enke, p. 82ff.
- Daly, C. et al., 2004. Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). *Genes & Development*, 18(9), pp.1060–1071.

- Daly, C. et al., 2006. Angiotensin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), pp.15491–15496.
- David, S. et al., 2013. Mending leaky blood vessels: the angiotensin-Tie2 pathway in sepsis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 345(1), pp.2–6.
- Davis, S. et al., 2003. Angiotensins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nature structural biology*, 10(1), pp.38–44.
- Davis, S. et al., 1996. Isolation of angiotensin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, 87(7), pp.1161–1169.
- Dikranian, K. & Stoinov, N., 1991. Effect of vasoactive amines on Weibel-Palade bodies in capillary endothelial cells. *Experientia*, 47(8), pp.830–832.
- Donkor, E.S., 2013. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3(March), pp.Article 7, 1–5.
- Downes, J.J., 1976. CPAP and PEEP - A Perspective. *The Journal of Anesthesiology*, 44(1), pp.1–5.
- Eklund, L. & Olsen, B.R., 2006. Tie receptors and their angiotensin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Experimental Cell Research*, 312(5), pp.630–641.
- Ewig, S. et al., 2009. New perspectives on community-acquired pneumonia in 388 406 patients . Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax*, 64, pp.1062–1069.
- Fauci, A.S. & Morens, D.M., 2012. The perpetual challenge of infectious diseases. *The New England journal of medicine*, 366(5), pp.454–61.
- Feldman, C. et al., 1990. The effect of Streptococcus pneumoniae pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microbial Pathogenesis*, 9, pp.275–284.
- Feng, Y. et al., 2009. The absence of angiotensin-2 leads to abnormal vascular maturation and persistent proliferative retinopathy. *Thrombosis and haemostasis*, 102(1), pp.120–130.
- Fiedler, U. et al., 2006. Angiotensin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nature Medicine*, 12(2), pp.235–239.
- Fiedler, U. et al., 2004. The Tie-2 ligand angiotensin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood*, 103(11), pp.4150–4156.
- Fiedler, U. & Augustin, H.G., 2006. Angiotensins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends in Immunology*, 27(12), pp.552–558.
- File, T.M., 2004. Streptococcus pneumoniae and community-acquired pneumonia: A cause for concern. *The American Journal of Medicine Supplements*, 117(3), pp.39–50.

- Fox, J.G., Barthold, S.W. & Davisson, M.T., 2007. *The Mouse in Biomedical Research*, 2nd Edition J. G. Fox et al., eds., Elsevier, Inc.
- Fukuhara, S. et al., 2010. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histology and Histopathology*, 25(3), pp.387–396.
- Gale, N.W. et al., 2002. Angiopoietin-2 Is Required for Postnatal Angiogenesis and Lymphatic Patterning, and Only the Latter Role Is Rescued by Angiopoietin-1 Room 4406. *Angiogenesis*, 3, pp.411–423.
- Gallagher, D.C. et al., 2008. Circulating angiopoietin 2 correlates with mortality in a surgical population with acute lung injury/adult respiratory distress syndrome. *Shock*, 29(6), pp.656–661.
- Gamble, J.R. et al., 2000. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circulation Research*, pp.603–607.
- Gendrel, D. & Bohuon, C., 2000. Procalcitonin as a marker of bacterial infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 19(8), pp.679–688.
- Giaever, I. & Keese, C.R., 1993. A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature*, 366, pp.591–592.
- Hahn, H. et al., 2009. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. In *Springer Medizin Verlag*. Heidelberg, pp. 213–218.
- Harfouche, R. et al., 2002. Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of angiopoietin-1 on endothelial cells. *Microvascular research*, 64(1), pp.135–147.
- Hashimoto, T. & Pittet, J., 2006. Angiopoietin-2: Modulator of Vascular Permeability in Acute Lung Injury? *PLoS Medicine*, 3(3), pp.2–4.
- Hausdorff, W.P. et al., 2000. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 30(1), pp.100–21.
- Hedlund, J. & Hansson, L.O., 2000. Procalcitonin and C-reactive protein levels in community-acquired pneumonia: correlation with etiology and prognosis. *Infection*, 28(2), pp.68–73.
- Van der Heijden, M. et al., 2009. The angiopoietin-Tie2 system as a therapeutic target in sepsis and acute lung injury. *Expert opinion on therapeutic targets*, 13(1), pp.39–53.
- Held, H. et al., 2012. Basal lung mechanics and airway and pulmonary vascular responsiveness in different inbred mouse strains strains Basal lung mechanics and airway and pulmonary vascular responsiveness in different inbred mouse strains. *Journal of Applied Physiology*, pp.2192–2198.
- Henrichsen, J., 1999. Typing of Streptococcus pneumoniae: past, present, and future. *The American Journal of Medicine*, 107(1A), p.50S–54S.
- Hippenstiel, S. et al., 2007. New aspects of the pathophysiology of pneumonia. *Der Internist*, 48(5), pp.459–467.

- Hippenstiel, S. et al., 2000. Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Blood*, 95(10), pp.3044–51.
- Ho, K. & Lipman, J., 2009. An update on C-reactive protein for intensivists. *Anaesthesia and Intensive Care*, 37(2), pp.234–41.
- Höffken, G. et al., 2009. S3-Leitlinie zu Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobieller Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen tiefen Atemwegsinfektionen. *Thieme*. Available at: www.capnetz.de/html/docs/s3-leitlinie-capnetz-2.auflage-dez2009.pdf.
- Holopainen, T. et al., 2009. Angiopoietin-1 overexpression modulates vascular endothelium to facilitate tumor cell dissemination and metastasis establishment. *Cancer Research*, 69(11), pp.4656–4664.
- Huang, H. et al., 2011. Specifically targeting angiopoietin-2 inhibits angiogenesis, Tie2-expressing monocyte infiltration, and tumor growth. *Clinical Cancer Research*, 17(5), pp.1001–1011.
- Huang, Y.Q. et al., 2008. Angiopoietin-1 increases survival and reduces the development of lung edema induced by endotoxin administration in a murine model of acute lung injury. *Critical Care Medicine*, 36(1), pp.262–267.
- Huntemann, I. & Lorenz, J., 2004. Ambulant Erworbene Pneumonie (AEP) - Community Acquired Pneumonia (CAP). *CAPNETZ Kompetenznetzwerk Ambulant Erworbene Pneumonie*. *BMBF*, 29.
- Irvin, C.G. & Bates, J.H.T., 2003. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respiratory research*, 4, p.4.
- Janssen, W.J. et al., 2008. Surfactant proteins A and D suppress alveolar macrophage phagocytosis via interaction with SIRP alpha. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 178(2), pp.158–67.
- Jedrzejewski, M.J., 2001. Pneumococcal Virulence Factors : Structure and Function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), pp.187–207.
- Jeon, B.H. et al., 2003. Tie-ing the antiinflammatory effect of angiopoietin-1 to inhibition of NF-kappaB. *Circulation research*, 92(6), pp.586–8.
- Jho, D. et al., 2005. Angiopoietin-1 opposes VEGF-induced increase in endothelial permeability by inhibiting TRPC1-dependent Ca²⁺ influx. *Circulation research*, 96(12), pp.1282–1290.
- Jones, N. et al., 1999. Identification of Tek / Tie2 Binding Partners. *The Journal of biological chemistry*, 274(43), pp.30896–30905.
- Junqueira, L.C.U., Carneiro, J. & Gratzl, M., 2005. Histologie. *Springer Medizin Verlag Heidelberg*, 6.
- Kadioglu, A. et al., 2008. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature reviews. Microbiology*, 6(4), pp.288–301.

- Kanda, S. et al., 2005. Angiopoietin 1 is mitogenic for cultured endothelial cells. *Cancer Research*, 65(15), pp.6820–6827.
- Kim, I. et al., 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), pp.477–479.
- Kim, I. et al., 2000. Angiopoietin-1 Regulates Endothelial Cell Survival Through the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway. *Circulation Research*, 86(1), pp.24–29.
- Kim, I. et al., 2000. Tumor necrosis factor-alpha upregulates angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 269(2), pp.361–365.
- Koh, G.Y. et al., 2002. Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin. *Experimental & molecular medicine*, 34(1), pp.1–11.
- Kohlhammer, Y. et al., 2005. Risikofaktoren für die ambulant erworbene Pneumonie (Community Acquired Pneumonia). *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 130(8), pp.381–386.
- König, H.E. & Liebich, H.-G., 1999. Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. *Schattauer*, 4.
- Koutsostathis, S. et al., 2011. Early increase of serum angiopoietin-2 are associated with early progression to death in experimental injury. *Cytokine*, 56(3), pp.817–822.
- Krüger, S. et al., 2008. Procalcitonin predicts patients at low risk of death from community-acquired pneumonia across all CRB-65 classes. *The European respiratory journal*, 31(2), pp.349–55.
- Krüger, S. & Welte, T., 2012. Biomarkers in community-acquired pneumonia. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 6(2), pp.203–204.
- Kümpers, P. et al., 2011. The synthetic tie2 agonist peptide vasculotide protects against vascular leakage and reduces mortality in murine abdominal sepsis. *Critical care (London, England)*, 15(5), p.R261.
- Kümpers, P. et al., 2009. Time course of angiopoietin-2 release during experimental human endotoxemia and sepsis. *Critical care (London, England)*, 13(3), p.R64.
- Kurt, D., 1993. *Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch*, Stuttgart: Enke.
- Lee, H., 2013. Procalcitonin as a biomarker of infectious diseases. *The Korean journal of internal medicine*, 28(3), pp.285–91.
- Lee, W.L. & Liles, W.C., 2011. Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Current opinion in hematology*, 18(3), pp.191–196.
- Lemieux, C. et al., 2005. Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood*, 105(4), pp.1523–1530.

- Leonhardt, H., 1990. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. *Thieme, Stuttgart*, 8., pp.403–410.
- Li, X. et al., 2008. Basal and angiopoietin-1-mediated endothelial permeability is regulated by sphingosine kinase-1. *Blood*, 111(7), pp.3489–97.
- Long, D.A. et al., 2008. Angiopoietin-1 therapy enhances fibrosis and inflammation following folic acid-induced acute renal injury. *Kidney International*, 74(3), pp.300–309.
- López, R. et al., 2004. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS microbiology reviews*, 28(5), pp.553–80.
- Lucas, R., Sridhar, S., et al., 2012. Agonist of growth hormone-releasing hormone reduces pneumolysin-induced pulmonary permeability edema. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6), pp.2084–9.
- Lucas, R., Yang, G., et al., 2012. Protein Kinase C-alpha and Arginase I Mediate Pneumolysin-induced Pulmonary Endothelial Hyperpermeability. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47(4), pp.445–453.
- Lukasz, A. et al., 2008. Circulating angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in critically ill patients: development and clinical application of two new immunoassays. *Critical Care*, 12(4), p.R94.
- Macdonald, P.R. et al., 2006. Structure of the extracellular domain of Tie receptor tyrosine kinases and localization of the angiopoietin-binding epitope. *The Journal of biological chemistry*, 281(38), pp.28408–14.
- Maisonpierre, P.C. et al., 1997. Angiopoietin-2 , a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in vivo Angiogenesis. *Science*, 277(55), pp.55–60.
- Mammoto, T. et al., 2007. Angiopoietin-1 requires p190 RhoGAP to protect against vascular leakage in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), pp.23910–23918.
- Mandriota, S.J. & Pepper, M.S., 1998. Regulation of Angiopoietin-2 mRNA Levels in Bovine Microvascular Endothelial Cells by Cytokines and Hypoxia. *Circulation Research*, 83(8), pp.852–859.
- Mayr, A., 2007. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, Georg Thieme Verlag.
- McCarter, S.D. et al., 2007. Cell-based angiopoietin-1 gene therapy for acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 175(10), pp.1014–1026.
- McDonald, D.M., 2001. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(10 Pt 2), pp.S39–45.
- Meurs, M. Van et al., 2009. Bench-to-bedside review : Angiopoietin signalling in critical illness – a future target ? *Critical Care*, 13, pp.1–13.
- Meyer, N.J. & Christie, J.D., 2012. von Willebrand factor and angiopoietin-2: Toward an acute lung injury endothelial endophenotype?*. *Critical care medicine*, 40(6), pp.1966–7.

- Milner, C.S. et al., 2009. Roles of the receptor tyrosine kinases Tie1 and Tie2 in mediating the effects of angiopoietin-1 on endothelial permeability and apoptosis. *Microvascular research*, 77(2), pp.187–191.
- Mitchell, T.J., 2000. Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infection*, 151, pp.413–419.
- Mizgerd, J.P., 2008. Acute lower respiratory tract infection. *The New England journal of medicine*, 358(7), pp.716–27.
- Mofarrahi, M. et al., 2008. Regulation of Angiopoietin Expression ny Bacterial Lipopolysaccharide. *American Journal Of Physiology*, pp.1–36.
- Nasarre, P. et al., 2009. Host-derived angiopoietin-2 affects early stages of tumor development and vessel maturation but is dispensable for later stages of tumor growth. *Cancer Research*, 69(4), pp.1324–1333.
- Nickel, T. et al., 2011. Modulation of dendritic cells and toll-like receptors by marathon running. *European Journal of Applied Physiology*, pp.1–10.
- Nishimura, M. et al., 1999. Angiopoietin-3, a novel member of the angiopoietin family. *FEBS letters*, 448(2-3), pp.254–6.
- Nykänen, A.I. et al., 2003. Angiopoietin-1 Protects Against the Development of Cardiac Allograft Arteriosclerosis. *Circulation*, 107(9), pp.1308–1314.
- Ochoa, C. & Wu, S., 2010. New Developments in Lung Endothelial Heterogeneity: von Willebrand factor, P-selectin, and the Weibel-Palade Body. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36(3), pp.301–308.
- Oliner, J. et al., 2004. Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer cell*, 6(5), pp.507–16.
- Ong, T. et al., 2010. Ratio of angiopoietin-2 to angiopoietin-1 as a predictor of mortality in acute lung injury patients. *Critical care medicine*, 38(9), pp.1845–51.
- Orfanos, S.E. et al., 2007. Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators. *Critical Care Medicine*, 35(1), pp.199–206.
- Papapetropoulos, a., 2000. Angiopoietin-1 Inhibits Endothelial Cell Apoptosis via the Akt/Survivin Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), pp.9102–9105.
- Parikh, S.M., 2013. Dysregulation of the angiopoietin-Tie-2 axis in sepsis and ARDS. *Virulence*, 4(6), pp.517–24.
- Parikh, S.M. et al., 2006. Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoS Medicine*, 3(3), pp.0356–0370.
- Partanen, J. et al., 1992. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Molecular and Cellular Biology*, 12(4), pp.1698–1707.

- Patan, S., 1998. TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvascular research*, 56(1), pp.1–21.
- Paterson, G.K., Blue, C.E. & Mitchell, T.J., 2006. Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*, pp.355–363.
- Pizurki, L. et al., 2003. Angiotensin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production. *British journal of pharmacology*, 139(2), pp.329–36.
- Prince, A.S. et al., 2006. Cell signaling underlying the pathophysiology of pneumonia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 291(3), pp.L297–300.
- Progress, M., 2010. 030109 The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *The New England journal of medicine*, pp.138–150.
- Proudfoot, A.G. et al., 2011. Human models of acute lung injury. *Disease models & mechanisms*, 4(2), pp.145–53.
- Puri, M.C. et al., 1995. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *The EMBO journal*, 14(23), pp.5884–91.
- Quinn, P.J. et al., 2001. *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*, Blackwell Science Ltd.
- Ramsauer, M. & Amore, P.A.D., 2002. Getting Tie (2) d up in angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(11), pp.1615–1617.
- Ricciuto, D.R. et al., 2011. Angiotensin-1 and angiotensin-2 as clinically informative prognostic biomarkers of morbidity and mortality in severe sepsis. *Critical Care Medicine*, 39(4), pp.702–710.
- Rondaij, M.G. et al., 2006. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(5), pp.1002–7.
- Roviezzo, F. et al., 2005. Angiotensin-2 Causes Inflammation in Vivo by Promoting Vascular Leakage. *Pharmacology*, 314(2), pp.738–744.
- Rozenbaum, M.H. et al., 2013. The role of *Streptococcus pneumoniae* in community-acquired pneumonia among adults in Europe: a meta-analysis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 32(3), pp.305–16.
- Rubinfeld, G.D. et al., 2005. Incidence and outcomes of acute lung injury. *The New England journal of medicine*, 353(16), pp.1685–93.
- Rubinfeld, G.D. & Herridge, M.S., 2007. Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest*, 131(2), pp.554–62.
- Rubins, J.B. et al., 1992. Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infection and immunity*, 60(4), pp.1352–8.

- Ruiz, M. et al., 1999. Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity, and severity. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 160(2), pp.397–405.
- Saharinen, P. et al., 2005. Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2. *Journal of Cell Biology*, 169(2), pp.239–243.
- Santel, A., Aleku, M., Keil, O., Endruschat, J., Esche, V., Fisch, G., et al., 2006. A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene therapy*, 13(16), pp.1222–34.
- Santel, A., Aleku, M., Keil, O., Endruschat, J., Esche, V., Durieux, B., et al., 2006. RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy. *Gene therapy*, 13(18), pp.1360–70.
- Sato, A. et al., 1998. Characterization of TEK receptor tyrosine kinase and its ligands, Angiopoietins, in human hematopoietic progenitor cells. *International immunology*, 10(8), pp.1217–27.
- Scharpfenecker, M. et al., 2005. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *Journal of Cell Science*, 118(4), pp.771–780.
- Schmidt, R.F., Thews, G. & Lang, F., 2000. Physiologie des Menschen. *Springer*, 28.
- Schnittler, H., 1990. Role of Actin and Myosin in the Control of Paracellular Permeability in Pig, Rat and Human Vascular Endothelium. *Journal of Physiology*, 431, pp.379–401.
- Schnürch, 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, pp.957–968.
- Simon, L. et al., 2004. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 39(2), pp.206–17.
- Siner, J.M. et al., 2009. Elevated serum angiopoietin 2 levels are associated with increased mortality in sepsis. *Shock*, 31(4), pp.348–353.
- Smurova, K. et al., 2004. Reorganization of microtubule system in pulmonary endothelial cells in response to thrombin treatment. *Tsitoloqia*, 46(8), pp.695–703.
- Songer, J.G. & Post, K.W., 2005. *Veterinary Microbiology*, Saunders (W.B.) Co Ltd.
- Spragg, R.G. et al., 2011. Recombinant surfactant protein C-based surfactant for patients with severe direct lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183(8), pp.1055–61.
- Steinfort, C. et al., 1989. The effect of Streptococcus pneumoniae pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Infection and immunity*, 57(7), pp.2006–2013.
- Striebel, H.W., 2008. *Operative Intensivmedizin*, Stuttgart: Schattauer GmbH.

- Su, L. et al., 2009. Genetic variants in the angiopoietin-2 gene are associated with increased risk of ARDS. *Intensive Care Medicine*, 35(6), pp.1024–1030.
- Sullivan, C.C. et al., 2003. Induction of pulmonary hypertension by an angiopoietin 1/TIE2/serotonin pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), pp.12331–12336.
- Suri, C. et al., 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87(7), pp.1171–1180.
- Suri, C., McClain, J. & Thurston, G., 1998. Increased Vascularization in Mice Overexpressing Angiopoietin-1. *Science*, 282(468), pp.1–5.
- Tammela, T. et al., 2005. Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. *Blood*, 105(12), pp.4642–4648.
- TheARDSDefinitionTaskForce, 2012. Acute Respiratory Distress Syndrome. The Berlin Definition of ARDS. *Jama The Journal Of The American Medical Association*, 307(23), pp.2526–2533.
- Thomas, M. & Augustin, H.G., 2009. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*, 12(2), pp.125–137.
- Thurston, G. et al., 2000. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nature Medicine*, 6(4), pp.460–463.
- Thurston, G. et al., 2010. Leakage-Resistant Blood Vessels in Mice Transgenically Overexpressing Angiopoietin-1. *Science*, 286(1999), pp.2511–2514.
- Tiruppathi, C. et al., 1992. Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(17), pp.7919–23.
- Tomita, Y. et al., 2011. A new microarray system to detect *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, pp.1–21.
- Tsigkos, S. et al., 2006. Regulation of Ang2 release by PTEN/PI3-kinase/Akt in lung microvascular endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 207(2), pp.506–511.
- Uhlig, S. & Taylor, A.E., 1998. *Methods in pulmonary research*, Basel: Birkhaeuser.
- Valenzuela, D.M. 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), pp.1904–1909.
- Voss, S., Gámez, G. & Hammerschmidt, S., 2012. Impact of pneumococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules on colonization. *Molecular oral microbiology*, 27(4), pp.246–56.
- Ware, L.B., 2006. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 27(4), pp.337–349.

- Waškiewicz, Z. et al., 2011. Acute metabolic responses to a 24-h ultra-marathon race in male amateur runners. *European Journal of Applied Physiology*, pp.1679–1688.
- Welte, T. & Köhnlein, T., 2009. Global and Local Epidemiology of Community-Acquired Pneumonia : The Experience of the CAPNETZ Network. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 30(2), pp.127–135.
- Welte, T., Marre, R. & Suttorp, N., 2006. What is new in the treatment of community-acquired pneumonia? *Medizinische Klinik*, 101(4), pp.313–20.
- Welte, T., Torres, a & Nathwani, D., 2012. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax*, 67(1), pp.71–9.
- Wenisch, C., 2006. Außerhalb des Krankenhauses erworbene Pneumonie (community acquired pneumonia CAP). *Wiener Klinische Wochenschrift*, 3, pp.153–177.
- WHO, 2011. The Top 10 causes of death. Available at:
<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> [Accessed January 3, 2014].
- Witzenbichler, B. et al., 2005. Protective Role of Angiotensin-1 in Endotoxic Shock. *Circulation*, 111, pp.97–105.
- Witzenrath, M. et al., 2007. Role of platelet-activating factor in pneumolysin-induced acute lung injury. *Critical care medicine*, 35(7), pp.1756–1762.
- Witzenrath, M. et al., 2006. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Critical care medicine*, 34(7), pp.1947–1954.
- Witzenrath, M. et al., 2011. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *Journal of immunology*, 187(1), pp.434–40.
- Woodhead, M., 2002. Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. *European Respiratory Journal*, 20(Supplement 36), p.20S–27s.
- Xu, Y. & Yu, Q., 2001. Angiotensin-1, unlike angiotensin-2, is incorporated into the extracellular matrix via its linker peptide region. *The Journal of biological chemistry*, 276(37), pp.34990–8.
- Yu, H. et al., 2012. Recombinant human angiotensin-1 ameliorates the expressions of ZO-1, occludin, VE-cadherin, and PKC α signaling after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 46(1), pp.236–47.
- Yuan, H.T. et al., 2009. Angiotensin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Molecular and Cellular Biology*, 29(8), pp.2011–2022.

9 Anhang

9.1 Versuchsdesign

Mausstamm	Versuch	Gruppe	Anzahl der verwendeten Tiere		Untersuchungsparameter
BALB/c	<i>Ex vivo</i> -IPML siRNA- Behandlung	Unstimulierte Kontrolle	n = 3		HSA-Quantifizierung in der BAL zur Bestimmung der alveolokapillären Permeabilität
		siRNA Luciferase + PLY 1 µg/ml	n = 9		
		siRNAAng2 + PLY 1 µg/ml	n = 8		
		siRNATie2 + PLY 1 µg/ml	n = 9		
Wildtyp C57BL/6N	<i>In vivo</i> mRNA- Expression nach Infektion mit <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	Kontrolle/ PBS-Schein- infektion	6 h	n = 6	qPCR des Lungengewebes (Ang-1, Ang-2, Tie2)
			12 h	n = 6	
			24 h	n = 6	
			36 h	n = 6	
			48 h	n = 6	
		Infiziert mit <i>S.</i> <i>pneumoniae</i> 5x10 ⁶ CFU/Tier	6 h	n = 6	
			12 h	n = 6	
			24 h	n = 6	
			36 h	n = 6	
			48 h	n = 6	

Anhang

Mausstamm	Versuch	Gruppe	Anzahl der verwendeten Tiere	Untersuchungsparameter
Wildtyp C57BL/6N	<i>In vivo</i> Ang-1 Behandlung während Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	Kontrolle/ PBS-Schein- infektion)	n = 5	Zytokinbestimmung im Bioplex
				Permeabilitäts- bestimmung – HSA-Plasma Ratio
				FACS-Analyse und Neutrophilenzählung
		Kontrolle/ <i>S. pneumoniae</i> 5 x 10 ⁶ CFU/Tier	n = 10	Zytokinbestimmung im Bioplex
				Permeabilitäts- bestimmung – HSA-Plasma Ratio
				FACS-Analyse und Neutrophilenzählung
		Ang-1/ PBS-Schein- infektion	n = 5	Zytokinbestimmung im Bioplex und Neutrophilenzählung
				Permeabilitäts- bestimmung – HSA-Plasma Ratio
				FACS-Analyse und Neutrophilenzählung
		Ang-1/ <i>S. pneumoniae</i> 5 x 10 ⁶ CFU/Tier	n = 12	Zytokinbestimmung im Bioplex
				Permeabilitäts- bestimmung – HSA-Plasma Ratio
				FACS-Analyse und Neutrophilenzählung

9.2 Material

ELISA

ELISA	Hersteller
Quantikine® Human Ang-1 Immunoassay	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Quantikine® Human Ang-2 Immunoassay	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Human Albumin ELISA Quantification Set	Bethyl Laboratories, Inc., USA
Human IL-6 ELISA Set	BD, Becton Dickinson, Heidelberg

ECIS

Material	Hersteller
ECGM	PromoCell GmbH, Heidelberg
ECIS Cultureware™ Disposable Electrode Array (8W10E)	Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA
ECIS™ Model 1600R	Applied BioPhysics®, Applied Biophysics Inc, Troy, New York, USA
Endothel-Basal-Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Phosphate Buffered Saline (Dulbecco´s PBS (1x))	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Rekombinantes Pneumolysin	Prof. Timothy Mitchell, Division of Infection and Immunity, Institute of Biomedical and Life Science, University of Glasgow, United Kingdom
Steriles Fötales Kälberserum (Foetal Bovine Serum Gold)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Thrombin	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Sigma, Deisenhofen

Infektion

Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank (Heraeus, Typ BB6220 O2)	Kendra Laboratory Products, Hanau
Photometer (UVIKONXS)	Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA

Gerät	Hersteller
Rektalsonde (physitemp Model BAT- 12)	Physitemp Instruments Inc, Clifton, NJ, USA
Sicherheitsarbeitsbank (Heraeus Sorvall, Typ HS12)	Kendra Laboratory Products, Hanau
Waage (Model CS200)	Ohaus Corporation, NY, USA über VWR
Zentrifuge (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0R)	Kendra Laboratory Products, Hanau

Substanzen und Verbrauchsmaterialien

Substanz/ Material	Herstellung
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978)	Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Abteilung Genetik der Mikroorganismen Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald, Greifswald
Columbia Agarplatten mit 5 % Schafblut	BD, Becton Dickinson, Heidelberg
Sterile Einmal-Impfschlingen (farblos, 1 µl)	Nunc, Wiesbaden
Steriles Nährmedium: THY (Todd-Hewitt-Medium)	BD, Becton Dickinson, Heidelberg
0,5 % Yeast Extract (Hefeextrakt)	BD, Becton Dickinson, Heidelberg
Steriles Fötale Kälberserum (Foetal Bovine Serum Gold)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Phosphate Buffered Saline (Dulbecco's PBS (1x))	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Hyaluronidase	Sigma, Deisenhofen
Ketavet® (Ketamin-hydrochlorid 100 mg/ml)	Pfizer Pharmacia GmbH, Karlsruhe
Rompun 2 % (Xylazinhydrochlorid 20mg/ml)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Vidisic® Augengel	Bausch & Lomb Dr. Mann Pharma, Berlin

IPML**Geräte**

Gerät	Hersteller
Beatmungsgas (5 % CO ₂ , 20 % O ₂ , 75 % N ₂)	Abteilung Technische Gase, Charité - Universitätsmedizin, Berlin
Differenzial-Druckaufnehmer (Differential pressure Transducer Validyne DP45-14)	Hugo Sachs Elektronik HavardApparatus GmbH, March-Hugstetten
Druckaufnehmer (Pressure Transducer MPX/Typ 399/2 und P75/Typ 379)	Hugo Sachs Elektronik HavardApparatus GmbH, March-Hugstetten
Einhängethermostat (ecoline E 100)	Lauda Dr. R. Wolzer GmbH u. Co KG, Lauda-Königshofen
Messmodule (CFBA, TAM-A, VCM, TCM)	Hugo Sachs Elektronik HavardApparatus GmbH, March-Hugstetten
Perfusor (Perfusor F, Typ 871332/4)	BRAUN AG, Melsungen
Peristaltikpumpe (Reglo-Analog, Ismatec SA)	ISMATEC, Glattbrugg, Schweiz
Software (Pulmodyn)	Hugo Sachs Elektronik HavardApparatus GmbH, March-Hugstetten
Unterdruckkammer (Isolated Lung, size 1, Typ 839)	Hugo Sachs Elektronik HavardApparatus GmbH, March-Hugstetten

Substanzen

Substanz	Hersteller
siRNA Ang-2	Silence Therapeutics, Berlin
siRNA Tie2	Silence Therapeutics, Berlin
siRNA Luciferase	Silence Therapeutics, Berlin
Rekombinantes Pneumolysin	Prof. Timothy Mitchell, School of Immunity and Infection, College of Medical and Dental Sciences, Medical School Building, University of Birmingham, United Kingdom
Ketavet® (Ketaminhydrochlorid 100 mg/kg)	Pfizer Pharmacia GmbH, Karlsruhe
Rompun 2 %® (Xylazinhydrochlorid 20 mg/kg)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Braunol® (Povidon-Jod-Lösung)	B. Braun AG, Melsungen
Krebs-Henseleit-Hydroxyethylamylpectin Puffer	Serag-Wiessner KG, Naila
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 8,4 %	Fresenius Kabi Dts. GmbH, Bad Homburg

Substanz	Hersteller
Heparin (5000 I.E./ml)	Rotexmedica GmbH, Trittau
Human Albumin Grifols® 20 % (200 g Albumin/1000 ml)	Grifols Deutschland GmbH, Langen
Natrium-Chlorid-Lösung 0,9 %	Biomol, Hamburg

Allgemeine Materialien

Geräte

Material	Hersteller
Analysewaage (Sartorius, MC 5(-OCE))	Sartorius AG, Göttingen
AB 7300-Real Time PCR System	Applied Biosystems, USA
Autoklav Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg
Biometra® T1 Thermocycler	Biomedizinische Analytik, Göttingen
Bio-Plex™ Millipore	BioRad Laboratories, München
Bio-Plex™ Workstation	BioRad Laboratories, München
Dampfsterilisator (Varioklav, Typ 755)	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Gefrierschrank -80 °C	Engmann Kühleysteme, Mannheim
Gefrierschrank groß -20 °C (Liebherr Comfort)	Engmann Kühleysteme, Mannheim
Gefrierschrank klein -20 °C	Kirsch, Offenburg
IVC-Käfige (Typ II-L)	EHRET GmbH, Emmendingen
Kühlschrank groß 4 °C (Liebherr Profiline)	Engmann Kühleysteme, Mannheim
Kühlschrank klein (MED-85)	Kirsch, Offenburg
Magnetrührer (Variomag Elektronrührer Mno)	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Multi-Channel-Pipette (Eppendorf Research)	Eppendorf, Hamburg
Multipette (Eppendorf Multipette Plus)	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter (766 Calimatic, Typ 766)	Knick, Berlin
Rüttelplatte (IKA-Schüttler, TYP MT S2)	KIKA-Werke, Staufen
Tischzentrifuge (Galaxy Mini)	VWR, Darmstadt
Trockenschrank (Haereus, Function Line)	Kendro Laboratory Products, Hanau
Vortex (Vortex-2-Genie)	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Zentrifuge (Haraeus, Biofuge fresco)	Kendro Laboratory Products, Hanau

Substanzen

Substanz	Hersteller
Aqua ad iniectabilia (10 ml)	B. Braun AG, Melsungen
Braunol®	B. Braun AG, Melsungen
CellWash	BD Biosciences, Heidelberg
Ethanol, absolut reinst	Merck, Darmstadt
FACS™ Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Methylviolett	Merck, Darmstadt
Natriumchloridlösung 0,9 % (10 ml)	B. Braun AG, Melsungen
Natriumchloridlösung, isotonisch (100 ml)	Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Protease-Inhibitor Complete™ Mini	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
TMB (Tetramethylbenzidine Liquid Substrat)	Sigma, Deisenhofen
Tween® 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
BD Falcon™ Polypropylene Round-Bottom Tube	BD Biosciences, Heidelberg
BD Falcon™ Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Biosciences, Heidelberg
BD Trucount™ Tube	BD Biosciences, Heidelberg
Columbia-Agarplatten 5 %Schafblut	BD Biosciences, Heidelberg
Einmalhandschuhe DermaClean	Ansell Healthcare Europe, Belgien
Sterile Einmal-Impfshlingen (farblos, 1 µl)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Falcon Blue Max™ (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Kapillarblutentnahmesystem (mit EDTA)	Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth
Küvetten Nr. 67.742	Sarstedt, Nürnberg
Parafilm	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf, Hamburg
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Reagiergefäß SafeSeal (0,5 ml, 1,5 ml)	Sardstedt, Nümbrecht

Material	Hersteller
Rotilabo® Spritzenfilter, steril 0,45 µm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Serologische Pipetten (2 ml/5 ml/10 ml/25 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Spritzen BD Plastipak™ (1 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Spritzen BD Discardit™ II (2 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
BD Vacutainer® SST™ II Advance	BD Biosciences, Heidelberg
BD Vacutainer® LH PST™ II	BD Biosciences, Heidelberg
BD Vacutainer® K2E 3,6 mg	BD Biosciences, Heidelberg

9.3 Abkürzungsverzeichnis

AECC	<i>American European Consensus Conference</i>
Akt	Protein Kinase B
ALI*	<i>acute lung injury – siehe S. 12</i>
Ang-1	Angiopoietin-1
Ang-2	Angiopoietin-2
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
Aqua dest.	<i>aqua destillata</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BALT	<i>bronchial associated lymphoid tissue</i>
CAP	<i>community acquired pneumonia</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CRB-65	<i>score: confusion, respiratory, blood pressure, age ≥ 65</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CPAP	<i>continuous positive airway pressure</i>
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
ECD	<i>extracellular domain</i>
ECGM	<i>endothelial cell growth medium</i>
ECIS	<i>electric cell-substrate impedance sensing</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FC	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	<i>foetal calf serum</i>
FITC	Floureszeinisothiocynat
FOXO1	<i>forkhead box protein O1</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin

HLA II	<i>human leukocyte antigen II</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
HSA	Humanes Serum Albumin
HUVEC	<i>human umbilical cord vein endothelial cell</i>
I.E.	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-10	Interleukin-10
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPML	Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslung
i.v.	<i>intravenös</i>
KC	<i>keratinocyte chemoattractant</i>
λ	Wellenlänge
LPS	Lipopolysaccharid
LSAB	<i>labelled (strept-)avidin-biotin</i>
MAP	Mitogen Aktiviertes Protein
mean	Mittelwert
MHC II	<i>major histocompatibility complex II</i>
min	Minute
MIP-2	<i>macrophage inflammatory protein-2</i>
MODS	<i>multiple organ dysfunction syndrome</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NCTC	<i>national collection of type cultures</i>
n.d.	Nicht datiert
n.m.	Nicht messbar
OD	Optische Dichte
p	Signifikanzwert
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerithrin
PEEP	<i>positive end-expiratory pressure</i>
PerCP	Peridinin-Chlorophyll Protein

p.i.	<i>post infectionem</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
R	<i>Pearson's Korrelationskoeffizient</i>
Rac1	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RANTES	<i>regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted</i>
RhoA	<i>ras homolog family member A</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
smac	<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TER	Transzellulärer Elektrischer Widerstand
THY	Todd Hewitt-Bouillon
Tie2	<i>tunica internal endothelial cell kinase 2</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRPC	<i>transient receptor potential channel</i>
VAP	<i>ventilator associated pneumonia</i>
VE-Cadherin	<i>vascular endothelial-cadherin</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
YEAST	Bacto™ Technischer Hefeextrakt

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Vergleich der anatomischen Besonderheiten der Lunge von Maus und Mensch, nach (Fox et al. 2007; Irvin & Bates 2003)
Tabelle 2:	Berlin-Definition des ARDS
Tabelle 3:	Charakteristika der Pneumoniepatienten und Kontrollprobanden in der CAPNETZ Studie 1
Tabelle 4:	a) und b) Charakteristika der Pneumoniepatienten mit letalem und nicht-letalem Verlauf im Vergleich zu Kontrollprobanden (CAPNETZ Studie 2)
a)	Angaben zu Kontrollprobanden und Pneumoniepatienten
b)	Angaben zu Pneumoniepatienten
Tabelle 5:	a) und b) Charakteristika der Pneumoniepatienten mit letalem und nicht-letalem Pneumonieverlauf im Vergleich zu Kontrollprobanden (CAPNETZ Studie 3)
a)	Angaben zu Kontrollprobanden und Pneumoniepatienten
b)	Angaben zu Pneumoniepatienten
Tabelle 6:	Charakteristika der Patienten mit Pneumonie-induziertem ARDS im Vergleich zu Kontrollprobanden (VALID Studie)
Tabelle 7:	Korrelation des Patientenalters mit der Angiotensin-1- und Angiotensin-2-Serumkonzentration (CAPNETZ Studie 1)
Tabelle 8:	Korrelation des Patientenalters mit der Angiotensin-1- und Angiotensin-2-Serumkonzentration (CAPNETZ Studie 2)
Tabelle 9:	Korrelation ausgewählter klinischer Parameter mit der Angiotensin-2-Serumkonzentration (CAPNETZ Studie 2)
Tabelle 10:	Korrelation Patientenalter mit der Angiotensin-2-Serumkonzentration (CAPNETZ Studie 3)
Tabelle 11:	Korrelation ausgewählter klinischer Parameter mit der Angiotensin-2-Serumkonzentration (CAPNETZ Studie 3)
Tabelle 12:	Korrelation des Alters der Probanden mit den Angiotensin-1- und Angiotensin-2-Serumkonzentrationen (VALID Studie)
Tabelle 13:	Korrelation ausgewählter klinischer Parameter mit der Angiotensin-2-Serumkonzentration (VALID Studie)

9.5 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge
- Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf des Infektionsversuches mit Angiotensin-1-Behandlung
- Abbildung 3: Verringerte Angiotensin-1- und erhöhte Angiotensin-2-Serumkonzentrationen bei Pneumoniepatienten (CAPNETZ Studie 1)
- Abbildung 4: Angiotensin-2-Konzentrationen sind bei verstorbenen Pneumoniepatienten höher als bei Überlebenden (CAPNETZ Studie 2).
- Abbildung 4 Fortsetzung: Angiotensin-2-Konzentrationen sind bei verstorbenen Pneumoniepatienten höher als bei Überlebenden (CAPNETZ Studie 2).
- Abbildung 5: Kein signifikanter Unterschied in der Konzentration von Angiotensin-2 im direkten Vergleich von überlebenden und nicht überlebenden Pneumoniepatienten (CAPNETZ Studie 3)
- Abbildung 6: Die Angiotensin-2-Serumkonzentration ist zu Beginn der Pneumonie erhöht und sinkt im weiteren Verlauf (VALID Studie).
- Abbildung 7: Hohe Angiotensin-2-Serumkonzentration (A) und ein erhöhtes Angiotensin-2/Angiotensin-1-Verhältnis (B) nach dem Marathonlauf
- Abbildung 8: Erhöhter Leukozytengehalt (A), speziell des Anteils neutrophiler Granulozyten (B) nach dem Marathonlauf
- Abbildung 9: Erhöhter Serum-Interleukin-6-Gehalt direkt nach dem Marathonlauf (A) und erhöhtes C-reaktives Protein im Serum 24 h nach dem Marathonlauf (B)
- Abbildung 10: Korrelation zwischen der Angiotensin-2-Serumkonzentration und dem Leukozytengehalt (A), sowie zwischen der Angiotensin-2-Serumkonzentration und den neutrophilen Granulozyten (B)
- Abbildung 11: Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Angiotensin-1, Angiotensin-2 und Tie2 in humanen *post mortem* Lungen von Pneumoniepatienten und in gesundem Lungengewebe
- Abbildung 12: Mit Pneumolysin stimulierte humane umbilicalvenöse Endothelzellen haben einen verringerten transzellulären elektrischen Widerstand.
- Abbildung 13: Angiotensin-2 wird nach Pneumolysin-Stimulation von humanen umbilicalvenösen Endothelzellen freigesetzt.
- Abbildung 14: Interleukin-6 ist in Zellüberständen humaner umbilicalvenöser Endothelzellen nach Thrombin-Stimulation erhöht, nicht jedoch nach Pneumolysin-Stimulation.
- Abbildung 15: Eine Stimulation von humanen umbilicalvenösen Endothelzellen mit Angiotensin-2 führt zu einem kurzen, reversiblen Abfall des transzellulären elektrischen Widerstandes.

- Abbildung 16: Durch eine Angiotensin-2 siRNA-Vorbehandlung kann die Pneumolysin-induzierte Permeabilität in der isoliert perfundierten Mauslunge gesenkt werden.
- Abbildung 17: Körpergewicht und Körpertemperatur im Verlauf der murinen Pneumokokkenpneumonie
- Abbildung 18: Die mRNA-Expression von Angiotensin-1 und Tie2 sinkt und die von Angiotensin-2 steigt im Verlauf der murinen Pneumokokkenpneumonie.
- Abbildung 19: Eine Angiotensin-1-Behandlung reduziert die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in der murinen Pneumokokkeninfektion.
- Abbildung 20: Eine Angiotensin-1-Behandlung reduziert die Zytokinexpression in der murinen Pneumokokkeninfektion.
- Abbildung 20 Fortsetzung: Eine Angiotensin-1-Behandlung reduziert die Zytokinexpression in der murinen Pneumokokkeninfektion.
- Abbildung 21: Angiotensin-1 behandelte Mäuse haben einen attenuierten klinischen Verlauf in der Pneumokokkenpneumonie.
- Abbildung 22: Eine Angiotensin-1-Behandlung reduziert die Permeabilität in der murinen Pneumokokkeninfektion.

Danksagung

Univ.-Prof. Dr. Martin Witzernath danke ich für die Vergabe des Promotionsthemas und für die Möglichkeit diese Arbeit in der AG Witzernath, Charité - Universitätsmedizin der Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie in Berlin durchführen zu können.

Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Dissertation zur Einreichung im Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität über das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen.

Meiner ständig höchst engagierten und hilfsbereiten Dissertationsbetreuerin Birgitt Gutbier danke ich in besonderem Maße vor allem für die vielen Stunden, die wir uns gemeinsam durch so manch lange Experimentierwoche, aber auch wissenschaftliche Durststrecken geschlagen haben.

Prof. Timothy J. Mitchell und seiner Arbeitsgruppe an der School of Immunity and Infection, College of Medical and Dental Sciences, Medical School Building, University of Birmingham, United Kingdom danke ich für die Bereitstellung des rekombinanten Pneumolysins.

Frau Doris Stoll, danke ich für ihren Einsatz bei den ECIS-Versuchen und der HUVEC-Isolierung und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Dr. Ralf Hübner und Dr. Jan-Moritz Doehn, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, danke ich für die Bereitstellung der Marathondaten und für die Mitorganisation des „Großereignisses“ zur RUNINFLAME-Studie beim Berlin-Marathon 2010.

Ohne ein tolles Team mit guter Laune, Hilfsbereitschaft und Tatkraft macht keine Arbeit Spaß. Daher danke ich Katharina Hellwig, Dr. Katrin Reppe, Carla Rosa Gonzalez Calera, Katja Fischer, Dr. Jan-Moritz Doehn, Daniel Will, Dr. Daniel Lorenz, Peter Radünzel und Dr. Janine Zahlten für eine schöne Zeit.

Meinen Eltern Eva-Maria Neuhauß und Jörg-Thomas Neuhauß danke ich für die Ermöglichung meines Studiums der Veterinärmedizin und die finanzielle Unterstützung während meiner Dissertationsarbeit. Ohne sie wäre all dies gar nicht möglich gewesen.

Meinem Ehemann Sebastian Neuhauß danke ich von ganzem Herzen besonders dafür, dass er mich während der Schreibphase dieser Arbeit unterstützt hat. Durch seine Geduld und Motivation konnte ich diese schwierige Zeit gut überstehen.

Publikationen

Neuhauß AK, Gutbier B, Taut F, Günther A, Stoll D, Weißmann N., Mitchell TJ, Schütte H, Suttorp N, Witzenrath M, CAPNETZ Study Group (2012). Angiopoietins: possible biomarkers in severe pneumonia? **International Conference Innate immunity of the lung, Berlin**, Poster

Neuhauß AK, Gutbier B, Weißmann N, Mitchell TJ, Schütte H, Suttorp N, Witzenrath M, CAPNETZ Study Group (2012). Angiopoietine als Biomarker bei schwerer Pneumonie. **53. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Nürnberg**, Poster (P317)

Neuhauß AK, Gutbier B, Weissmann N, Mitchell TJ, Schütte H, Suttorp N, Witzenrath M, CAPNETZ Study Group (2012). Die Rolle des Angiopoietin-/Tie2-Systems bei Pneumonie. **15. Workshop des DVG-Arbeitskreises „Respiratorisches System“ – DGP 2012, Nürnberg**, Vortrag

Neuhauß AK, Gutbier B, Weißmann N, Mitchell TJ, Schütte H, Suttorp N, Witzenrath M, CAPNETZ Study Group (2011). Angiopoietine als Biomarker bei schwerer Pneumonie. **Herbsttagung der Sektion Zellbiologie und der Sektion Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Homburg (Saar)**, Vortrag

Gutbier B, Neuhauß AK, Reppe K, Santel A, Kaufmann J, Weißmann N, Morawietz L, Mitchell TJ, Suttorp N, Witzenrath M, CAPNETZ Study Group (2011). Role of the Angiopoietins Ang-1 and Ang-2 for the Development of Acute Lung Injury in Pneumococcal Pneumonia. **22nd European Students Conference, Berlin**, Poster

Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 11.03.2014

Anne-Kathrin Neuhaß