

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

DISSERTATION

Therapeutische Bedeutung eines Angiotensin-1 Mimetikums für  
den beatmungsassoziierten Lungenschaden in der murinen  
Pneumokokkenpneumonie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Aina Lask

aus Essen

Datum der Promotion: 17.09.2021

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
Zusammenfassung .....	XI
Abstract .....	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Ambulant erworbene Pneumonie .....	1
1.1.1 Inflammation in der Lunge.....	2
1.1.2 Antibiotische Behandlung der ambulant erworbenen Pneumonie .....	3
1.2 Maschinelle Beatmung und Pneumonie .....	4
1.2.1 Beatmungsassoziierte Lungenschädigung.....	4
1.2.2 Multiorganversagen.....	6
1.3 Das Angiotensin-Tie2 System .....	6
1.3.1 Die nachgeschalteten Signalkaskaden des Tie2-Rezeptors.....	7
1.3.2 Die Rolle des Angiotensin-Tie2 Systems bei Inflammation .....	8
1.3.3 Vasculotide.....	9
1.4 Zielsetzung.....	10
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Liste der verwendeten Materialien und Geräte.....	12
2.1.1 Geräte .....	12
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	14
2.1.3 Reagenzien .....	16
2.1.4 Antikörper FACS .....	17
2.1.5 Antikörper Western Blot .....	17
2.1.6 Primer qPCR .....	18
2.1.7 Enzyme.....	18

2.1.8	Medikamente .....	18
2.1.9	Medien und Puffer .....	19
2.1.10	Zelllinien und Bakterienstämme .....	22
2.1.11	Kits .....	22
2.1.12	Software .....	23
2.2	Versuchstiere und Haltung .....	23
2.3	Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie.....	23
2.4	Vasculotide-Behandlung und VILI-Präparation.....	26
2.5	Probenaufbereitung.....	28
2.5.1	Blut .....	28
2.5.2	ELISA für humanes Serumalbumin .....	28
2.5.3	Durchflusszytometrie .....	29
2.5.4	Bestimmung der bakteriellen Last.....	31
2.5.5	Zytokin und Chemokin Analyse mittels Multiplex Immunoassay.....	32
2.5.6	Serum-Marker für ein Multiorganversagen.....	32
2.6	Analyse der Auswirkung von VILI und Pneumonie auf die Expression des Tie2- Rezeptor und beteiligter Signalwege .....	32
2.6.1	RNA-Isolation .....	32
2.6.2	Umschreiben von RNA in cDNA.....	33
2.6.3	qPCR zur Quantifizierung des Tie2-Rezeptors in der Lunge .....	34
2.6.4	<i>In vitro</i> Stimulation von Endothelzellen mit Angiopoietin-1 und Vasculotide..	35
2.6.4.1	Anzucht der humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen .....	35
2.6.4.2	Stimulation der humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen .....	35
2.6.5	Proteinisolation aus Lungengewebe .....	36
2.6.6	Messung der Proteinkonzentration .....	36
2.6.7	Vorbereitung der Proteine für den Western Blot .....	37
2.6.8	Herstellung des Gels für den Western Blot .....	37
2.6.9	Durchführung des Western Blots .....	38

2.6.9.1	Western Blot Tie2 / phospho Tie2 und Actin.....	40
2.6.9.2	Western Blot p38/phospho p38 und Actin .....	41
2.7	Histologie Präparation .....	41
2.8	Versuchsgruppen .....	42
2.9	Statistik.....	43
3	Ergebnisse .....	44
3.1	Vasculotide reduzierte die durch Pneumonie und maschinelle Beatmung induzierte vaskuläre Hyperpermeabilität.....	44
3.2	Vasculotide hatte keinen Einfluss auf die klinischen Parameter im Modell des Beatmungsassoziierten Lungenschadens bei Pneumonie.....	47
3.3	Die zelluläre pulmonale und systemische Immunreaktion wurde durch Vasculotide nicht beeinflusst.....	55
3.4	Die Produktion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und Chemokine wurde durch Vasculotide nicht moduliert .....	66
3.5	Vasculotide hatte keinen Effekt auf die lokale Elimination und die hämatogene Dissemination von <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	72
3.6	Die Kombinationstherapie von Vasculotide und Ampicillin reduzierte den Lungenschaden in der histologischen Beurteilung.....	73
3.7	Vasculotide hatte keinen Einfluss auf ein durch Pneumonie und maschinelle Beatmung induziertes Multiorganversagen .....	83
3.8	Die Expression des Tie2-Rezeptors wurde durch Vasculotide nicht erhöht .....	87
3.9	Eine vermehrte Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors durch Vasculotide konnte im Western Blot nicht nachgewiesen werden.....	88
3.10	Eine vermehrte Phosphorylierung von p38 durch Vasculotide konnte im Western Blot nicht nachgewiesen werden .....	93
4	Diskussion.....	98
4.1	Nur die Kombinationstherapie aus Ampicillin und Vasculotide reduzierte die Hyperpermeabilität und die Lungenschädigung bei <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten und maschinell beatmeten Tieren .....	98

4.2	Vasculotide beeinflusste die Permeabilität unabhängig von der bakteriellen Last und dem innaten Immunsystem .....	99
4.3	Die Vitalparameter wurden durch die Vasculotide Therapie nicht beeinflusst .....	102
4.4	Der Einfluss von Vasculotide auf ein Multiorganversagen konnte in den vorliegenden Versuchen nicht beurteilt werden .....	104
4.5	Die Expression von Tie2 wurde sowohl durch die Pneumokokkeninfektion als auch durch die Beatmung reduziert.....	105
4.6	Die Wirkungsweise von Vasculotide als Tie2-Agonist konnte nur <i>in vitro</i> nachgewiesen werden .....	106
4.7	Ausblick.....	107
5	Literaturverzeichnis .....	109
6	Eidesstattliche Versicherung.....	120
7	Lebenslauf.....	121
8	Danksagung.....	123

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Chemische Struktur von Vasculotide.....	9
Abbildung 2.1 Wachstum des für die Infektion verwendeten Kryostocks von <i>S. pn</i> .....	25
Abbildung 2.2 Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Untersuchung der BALF- und Lungenproben.....	31
Abbildung 3.1 Pulmonale Permeabilität 30 h p.i. ....	45
Abbildung 3.2 Pulmonale Permeabilität der nicht-ventilierten Kontrollgruppen 30h p.i. ....	46
Abbildung 3.3 Blutgasanalyse 30 h p.i., $paO_2$ und $paCO_2$ .....	50
Abbildung 3.4 Blutgasanalyse 30 h p.i. pH und Laktatkonzentration .....	51
Abbildung 3.5 Blutgasanalyse 30 h p.i., Base Excess und Standardbicarbonat .....	52
Abbildung 3.6 Blutgasanalyse 30 h p.i. Natrium- und Kaliumkonzentration.....	53
Abbildung 3.7 Blutgasanalyse 30 h p.i., Kalzium- und Chloridkonzentration .....	54
Abbildung 3.8. Lokale zelluläre Immunantwort in der BALF 30 h p.i. Neutrophile Granulozyten. ....	56
Abbildung 3.9 Lokale zelluläre Immunantwort in der BALF 30 h p.i., Alveolarmakrophagen.....	57
Abbildung 3.10 Lokale zelluläre Immunantwort in der BALF 30 h p.i., inflammatorische Makrophagen.....	58
Abbildung 3.11 Lokale zelluläre Immunantwort im Lungenparenchym 30 h p.i., Neutrophile Granulozyten. ....	59
Abbildung 3.12 Lokale zelluläre Immunantwort im Lungenparenchym 30 h p.i. Alveolarmakrophagen .....	60
Abbildung 3.13 Lokale zelluläre Immunantwort im Lungenparenchym 30 h p.i. inflammatorische Makrophagen.....	61
Abbildung 3.14 Systemische zelluläre Immunantwort im Blut 30 h p.i., Neutrophile Granulozyten .....	63
Abbildung 3.15 Systemische zelluläre Immunantwort im Blut 30 h p.i., Monozyten.....	64
Abbildung 3.16 Systemische zelluläre Immunantwort im Blut 30 h p.i., Lymphozyten.....	65
Abbildung 3.17 Pulmonale Zytokin- und Chemokin-Produktion 30 h p.i. (GM-CSF, KC, IL-1 $\beta$ , IL-10) .....	67
Abbildung 3.18 Pulmonale Zytokin- und Chemokin-Produktion 30 h p.i. (IL-12p40, IL-6, MIP-2).....	68
Abbildung 3.19 Systemische Zytokin- und Chemokin-Produktion 30 h p.i. (GM-CSF, KC, IL-1 $\beta$ , IL-10) .....	70

Abbildung 3.20 Systemische Zytokin- und Chemokin-Produktion 30 h p.i. (IL-12p40, IL-6, MIP-2) .....	71
Abbildung 3.21 Pulmonale und systemische bakterielle Last 30 h p.i.....	72
Abbildung 3.22 Histologische Beurteilung des Gesamtvolumens der Lungen 30 h p.i. ....	74
Abbildung 3.23 Histologische Beurteilung von VILI und Pneumonie 30 h p.i.....	76
Abbildung 3.24 Histologische Beurteilung des Lungenödems 30 h p.i.....	78
Abbildung 3.25 Transaminasen im Plasma 30 h p.i.....	84
Abbildung 3.26 Bilirubin und Cystatin C im Plasma 30 h p.i.. ....	85
Abbildung 3.27 Expression des Tie2-Rezeptors 30 h p.i.....	87
Abbildung 3.28 Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors in der Zellkultur .....	88
Abbildung 3.29 Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors 30 h p.i. im Lungenhomogenat .....	89
Abbildung 3.30 Tie2 und phospho Tie2 30 h p.i. im Lungenhomogenat. ....	91
Abbildung 3.31 Quotient aus phosphoryliertem Tie2 zu Tie2 30 h p.i. im Lungenhomogenat .....	92
Abbildung 3.32 Phosphorylierung von p38 30 h p.i. im Lungenhomogenat .....	94
Abbildung 3.33 p38 und phospho p38 30 h p.i. im Lungenhomogenat .....	96
Abbildung 3.34 Quotient aus phosphoryliertem p38 zu p38 30 h p.i. im Lungenhomogenat .	97

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten Geräte.....	12
Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	14
Tabelle 2.3 Liste der verwendeten Reagenzien.....	16
Tabelle 2.4 Liste der verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	17
Tabelle 2.5 Liste der verwendeten Antikörper für den Western Blot .....	17
Tabelle 2.6 Liste der verwendeten Primer für die qPCR .....	18
Tabelle 2.7 Liste der verwendeten Enzyme .....	18
Tabelle 2.8 Liste der verwendeten Medikamente .....	18
Tabelle 2.9 Liste der hergestellten Medien und Puffer .....	19
Tabelle 2.10 Liste der eingesetzten Zelllinien und Bakterienstämme .....	22
Tabelle 2.11 Liste der verwendeten Kits.....	22
Tabelle 2.12 Liste der eingesetzten Software.....	23
Tabelle 2.13 Antikörper für die FACS-Analyse der Leukozyten von BALF und Lunge .....	30
Tabelle 2.14 Primär- und Sekundärantikörper mit Verdünnungen und Konzentrationen für den Western Blot für Tie2, pTie2 und Actin.....	40
Tabelle 2.15 Primär- und Sekundärantikörper mit Verdünnungen und Konzentrationen für den Western Blot für p38, pp38 und Actin .....	41
Tabelle 2.16 Versuchsgruppen zur Bestimmung der pulmonalen Permeabilität .....	42
Tabelle 2.17 Versuchsgruppen für die histopathologische Analyse .....	43
Tabelle 2.18 Kontrollgruppen .....	43
Tabelle 3.1 Klinisches Monitoring im Verlauf der 6 h Beatmung.....	48
Tabelle 3.2 Histologische Beurteilung der Pneumonie 30 h p.i.....	79
Tabelle 3.3 Histologische Beurteilung des beatmungsassoziierten Lungenschadens 30 h p.i.	81
Tabelle 3.4 Histologische Beurteilung des Multiorganversagens 30 h p.i.....	86

## Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i>
A. dest.	<i>Aqua destillata</i>
AECC	American European Consensus Conference on ARDS
AKI	Acute kidney injury
ALI	Acute lung injury
ALT	Alaninaminotransferase
Ang-1	Angiopoietin-1
Ang-2	Angiopoietin-2
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
AST	Aspartataminotransferase
BAL(F)	Bronchoalveoläre Lavage (Flüssigkeit)
BGA	Blutgasanalyse
BSA	Bovines Serum Albumin
BUN	Blood-Urea-Nitrogen
B2M	Beta-2-Mikrotubulin
CAP	Community acquired pneumonia
CFU	Colony forming units
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CRP	C-reaktives Protein
Ct	Cycle Threshold
DL	Detektionslimit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fc-Region	Fragment crystallizable Region
FCS	Fetal calf serum
FiO <sub>2</sub>	Fraction of inspired oxygen
FOXO1	Forkhead transcription factor
GM-CSF	Granulocytes-Monocytes Colony stimulating factor
h	hour, Stunde
HF	Herzfrequenz

HRP	Horseradish Peroxidase
HSA	Humanes Serumalbumin
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
huPMVEC	Humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPD	Invasive pneumococcal disease
IQR	Interquartile Range
i.v.	intravenös
KC	Keratinocyte Chemoattractant
KG	Körpergewicht
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
LM	Lösungsmittel
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MIP	Makrophage inflammatory protein
MODS	Multi organ dysfunction syndrome
MOF / MOV	Multiple organ failure / Multiorganversagen
MV	Mechanical ventilation
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaVO <sub>3</sub>	Natriummetavanadat
n.d.	Nicht detektierbar
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NP-40	Nonoxinol 40
OD	Optische Dichte
pAK	Primärantikörper
PBS	Phosphate buffered saline
PCT	Procalcitonin
PEEP	Positive endexpiratory pressure
PEG	Polyethylenglykol
Pen / Strep	Penicillin / Streptomycin

PFA	Paraformaldehyd
p.i.	Post infectionem
PIP	Positive inspiratory pressure
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RBC	Red Blood Cell Lysis Buffer
RIPA	Radio immunoprecipitation assay
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RQ	Relative Quantification
RT	Raumtemperatur
sAK	Sekundärantikörper
SaO <sub>2</sub>	Sauerstoffsättigung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOFA	Sepsis-related organ failure assessment
<i>S. pn.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TEM	Tie2 expressing Makrophages
TEMED	Tetramethylethylendiamid
THY	Todd-Hewitt Boullion
TMB	Tetramethylbenzidin
t.n.	transnasal
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
Tris	Tris-aminomethan
Tris-HCl	Tris-hydrochlorid
TV	Tidalvolumen
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VILI	Ventilator-induced lung injury
VT	Vasculotide
WHO	World Health Organisation

## Zusammenfassung

Die ambulant erworbene Pneumonie (community, acquired pneumonia, CAP), vorwiegend verursacht durch *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn.*), ist weltweit eine häufige Todesursache. Trotz adäquater antibiotischer Therapie kann die Pneumokokkenpneumonie zu pulmonaler endothelialer Hyperpermeabilität führen und somit ein potentiell tödliches Lungenödem und ein akutes Lungenversagen (Acute respiratory distress syndrome, ARDS) auslösen. Dieses Krankheitsbild erfordert häufig eine maschinelle Beatmung (mechanical, ventilation, MV), welche die Lunge zusätzlich schädigt (Ventilator-induced lung injury, VILI). Die Angiotensin-1-vermittelte Tie2-Rezeptor Aktivierung stabilisiert das Endothel und reduziert die vaskuläre Hyperpermeabilität, ebenso wie der PEGylierte (Polyethylenglycol) Tie2-Agonist Vasculotide (VT). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass VT die pulmonale Hyperpermeabilität in der murinen Pneumokokkenpneumonie reduziert. Das Ziel dieser Arbeit war festzustellen, ob VT den Lungenschaden in *S. pn.* infizierten und maschinell ventilierten Mäusen reduzieren kann. Die Mäuse wurden transnasal entweder mit *S. pn.* infiziert oder erhielten das gleiche Volumen Phosphat gepufferter Salzlösung. Nach 22 h wurden sie mit Ampicillin und VT oder jeweils den Kontrolllösungen behandelt. 24 h post infectionem (p.i.) begann eine 6-stündige Beatmungsphase mit einer 2. Dosis VT 28,5 h p.i. Anschließend wurden die pulmonale Hyperpermeabilität, Immunantwort und bakterielle Last quantifiziert. Zusätzlich erfolgte eine histologische Untersuchung bezüglich Lungenveränderungen sowie Multiorganversagen (MOV) durch Pneumonie und VILI. Das MOV wurde außerdem anhand der Plasmakonzentrationen von Markern des Organversagens beurteilt. Zuletzt wurden sowohl die Tie2-Genexpression als auch die Phosphorylierung von Tie2 und p38 evaluiert.

Ampicillin reduzierte die systemischen Zytokinkonzentrationen und die Bakteriämie, ohne die endotheliale Permeabilität in ventilierten, *S. pn.* infizierten Mäusen zu beeinflussen. VT veränderte weder die Immunantwort noch die bakterielle Last, jedoch konnte die Kombinationstherapie aus VT und Ampicillin die pulmonale Hyperpermeabilität, den histologischen Lungenschaden und die Ödembildung signifikant reduzieren. Ein MOV war weder histologisch noch laborchemisch zu detektieren, sodass keine Aussage über die Effekte von VT auf MOV getroffen werden konnte. Die *S. pn.* Infektion und / oder MV verringerten die pulmonale Tie2-Expression, die durch VT Therapie nicht wiederhergestellt wurde. Des Weiteren war die Tie2 und p38 Phosphorylierung in VT-behandelten Mäusen nicht erhöht.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine adjuvante VT-Therapie den beatmungsassoziierten Lungenschaden in der schweren Pneumokokkenpneumonie reduzieren könnte.

## Abstract

Community acquired pneumonia (CAP), commonly caused by *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn.*), is a significant cause of mortality worldwide. Despite adequate antibiotic treatment, pneumococcal pneumonia is able to provoke pulmonary endothelial hyperpermeability leading to potentially lethal lung edema and acute respiratory distress syndrome (ARDS). This condition often requires mechanical ventilation (MV) causing additional damage to the lung (Ventilator-induced lung injury; VILI). Angiotensin-1 mediated Tie2-receptor activation stabilizes the endothelial barrier and reduces vascular hyperpermeability. The PEGylated (polyethyleneglycol) Tie2-agonist Vasculotide (VT) mimics Angiotensin-1 effects. Moreover, it has recently been shown that VT reduces pulmonary hyperpermeability in murine pneumococcal pneumonia. The aim of this study was to investigate whether VT could ameliorate lung injury in *S. pn.* infected and mechanically ventilated mice.

Mice were infected transnasally with *S. pn.* or received an equal amount of phosphate buffered saline. After 22 h they were treated either with or without Ampicillin +/- VT. At 24 h post infection, mice were subjected to six hours of MV with a second dose of VT at 28.5 h post infection. Afterwards pulmonary hyperpermeability, immune cell response and bacterial load were quantified. Additionally, histological analysis was performed to evaluate pathomorphological lung changes as well as multiple organ failure (MOF) due to pneumonia and VILI. MOF was further assessed by measuring plasma levels of markers for organ failure. Finally, Tie2 gene expression as well as Tie2 and p38 phosphorylation were evaluated.

Ampicillin reduced systemic cytokine levels and bacteremia without affecting endothelial permeability in ventilated and *S. pn.* infected mice. VT did not alter local or systemic immune responses or bacterial burden. Interestingly, combination treatment with Ampicillin and VT significantly reduced pulmonary hyperpermeability, histological lung damage and edema formation in *S. pn.* infected and mechanically ventilated mice compared to mere antibiotic therapy. MOF was not detectable in any of the groups, neither histological nor in blood levels of markers for liver or kidney damage, therefore effects of VT therapy on MOF could not be determined. *S. pn.* Infection and / or MV lowered Tie2 gene expression in the lung, which was not restored by VT treatment. Furthermore, Tie2 and p38 phosphorylation was not enhanced in VT treated mice.

These results suggest that adjunctive therapy with VT may reduce ventilator induced lung injury in severe pneumococcal pneumonia.

# 1 Einleitung

## 1.1 Ambulant erworbene Pneumonie

Bei der ambulant erworbenen Pneumonie (community acquired pneumonia, CAP) handelt es sich um eine der weltweit häufigsten Infektionen mit potentiell tödlichem Ausgang und erhöhter Morbidität und Mortalität (2, 3). Der häufigste Erreger der bakteriellen CAP ist, noch vor *Haemophilus influenza* und *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumonia* (*S. pn.*) (4), ein Gram-positives, extrazelluläres, in hohem Maße invasives Pathogen (5). Trotz adäquater und frühzeitig begonnener antibiotischer Therapie liegt die kurzfristige Mortalität von hospitalisierten Patienten in Deutschland bei 13 %, kann jedoch bei Patienten, die supportiv mechanische Beatmung benötigen auf bis zu 35 % ansteigen (6). 10 % der Patienten, die mit einer CAP ins Krankenhaus aufgenommen werden, sind im Laufe ihres Aufenthalts auf intensivmedizinische Behandlung angewiesen (7). Verschiedene Komplikationen sind für diese hohen Mortalitätsraten bei einer grundsätzlich gut behandelbaren Krankheit verantwortlich. *S. pn.* hat ein hohes Potential normalerweise sterile Körperregionen zu infiltrieren, wie das Blut oder den Liquor, und dadurch eine pneumogene Sepsis oder eine Meningitis zu verursachen (invasive pneumococcal disease, IPD) (8). Diese IPD verursacht nach Hochrechnungen der World Health Organisation (WHO) aus dem Jahre 2005 bis zu 1,6 Millionen Todesfälle weltweit pro Jahr (9). Des Weiteren ist die CAP eine Ursache für einen akuten Lungenschaden (acute lung injury, ALI), der sich zu einem akuten Lungenversagen (acute respiratory distress syndrome, ARDS) entwickeln kann. Diese Krankheitsentitäten wurden von der American-European Consensus Conference on ARDS (AECC) über den akuten Beginn, den Oxygenierungsindex, eine Röntgenaufnahme des Thorax mit bilateralen Infiltraten und den pulmonalarteriellen Druck definiert (10). Diese Klassifizierung wurde 2012 von der Berlin Definition abgelöst, die den akuten Krankheitsbeginn als binnen einer Woche eingrenzt und den Oxygenierungsindex auch in Abhängigkeit vom verwendeten positiv-endexpiratorischen Druck (positive endexpiratory pressure, PEEP) betrachtet auf dessen Grundlage das ARDS in mild, moderat und schwer eingeteilt wird (11). Außerdem verzichtet sie auf die Messung des pulmonalarteriellen Drucks zum Ausschluss einer kardialen Genese der Infiltrate und empfiehlt weniger invasive Diagnostik wie eine transthorakale Sonografie des Herzens (11).

Die Pneumonie ist als direkte Lungenschädigung und Ursache einer schweren Sepsis pneumogenen Ursprungs der häufigste Grund für einen ALI bzw. ARDS (12-15). Dem liegt zugrunde, dass *S. pn.* neben anderen Pathogenitätsfaktoren durch massive Rekrutierung

neutrophiler Granulozyten und systemische Freisetzung proinflammatorischer Zytokine eine alveolokapilläre Hyperpermeabilität induziert (16). Daraus resultiert zumeist ein alveoläres wie auch interstitielles Lungenödem (17). Diese Schädigung der Lungenbarriere bleibt von der Antibiotikatherapie weitgehend unbeeinflusst, sodass es bis heute keine spezifische Therapie für das ARDS gibt, sondern lediglich supportive Maßnahmen angewendet werden (18, 19). Derart schwere Verläufe der CAP sind seit den 1950er Jahren mit einer unverändert hohen Letalität verbunden (20) und verursachen hohe Kosten für das Gesundheitssystem, so zum Beispiel bis zu 3,5 Millionen US-Dollar pro Jahr in den Vereinigten Staaten von Amerika (21). Abgesehen von den schwerwiegenden Komplikationen, die die kurzfristige Mortalität erhöhen, ist die CAP auch mit vielen Pathologien verbunden, die eine langfristig erhöhte Morbidität und Mortalität bedingen. Dazu gehört in erster Linie ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und Thrombose (22-25). Andere Studien zeigen nach einer überstandenen CAP eine höhere Inzidenz pulmonaler Neoplasien (26) wie auch eine erhöhte Mortalität bei chronischen Komorbiditäten, wie zum Beispiel einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) oder Diabetes mellitus (27). Die Ursache für diese Korrelationen ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Entzündungsparameter auch noch Jahre nach einer CAP auf einem höheren Niveau liegen und sich der Patient so in einem Zustand permanenter subklinischer Inflammation befindet (22, 28). Dieser begünstigt Endothelschäden, hat prothrombotisches Potential und wirkt sich negativ auf chronische Erkrankungen aus, die auch häufig mit einem chronisch-inflammatorischen Zustand einhergehen (23).

### 1.1.1 Inflammation in der Lunge

Die Lunge besitzt ein aus verschiedenen Komponenten bestehendes System zur Abwehr von Pathogenen. Die physikalische Barriere bildet die Blut-Luft-Schranke bestehend aus Epithelzellen, den sogenannten Pneumozyten, dem Kapillarendothel und der verschmolzenen Basallamina beider Zelltypen (29). So entsteht eine minimale Diffusionsstrecke von ca. 0,3  $\mu\text{m}$ , die den Gasaustausch erleichtert und einen begrenzten Schutz vor von außen eindringenden Substanzen bietet (29). Physiologisch sind die oberen Atemwege mit fakultativ pathogenen Keimen kolonisiert, während die unteren Atemwege bei gesunden Menschen weitgehend steril sind (30). Sollten trotzdem Bakterien die Alveolen erreichen, sind die ersten Zellen der pulmonalen Immunität die sogenannten Alveolarmakrophagen, die sich im Alveolarraum befinden (31). Dabei handelt es sich um spezialisierte langlebige Monozyten, die eindringende Pathogene einerseits direkt durch Phagozytose und antimikrobielle Substanzen bekämpfen

(32), andererseits weitere Immunzellen durch die Freisetzung der Zytokine Tumor Nekrose Faktor (TNF) $\alpha$ , Interleukin (IL-)1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und CXCL5 (LIX) rekrutieren (33). Dieses Signal wird durch aktivierte pulmonale Epithel- und Endothelzellen verstärkt, die ebenfalls proinflammatorische Mediatoren freisetzen (34, 35). Die ersten Zellen, die durch dieses Signal in die Atemwege eindringen, sind polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), die im Ruhezustand in den Lungengefäßen patrouillieren (36). Auch PMNs können Bakterien phagozytieren und sie dann durch verschiedenen Mechanismen wie reaktive Sauerstoffspezies (37), antimikrobielle Peptide (38) und Serin Proteasen (39) effizient abtöten.

Unter normalen Umständen folgt auf die Inflammation die Resolution, in der die rekrutierten Immunzellen apoptotisch werden und die Entzündungsreaktion beendet wird (40). Ist diese Resolution gestört, beispielsweise durch ineffektives Abtöten der Pathogene, werden weiterhin PMNs rekrutiert und hyperaktiviert (41). Zwar sind neutrophile Granulozyten essentiell zur Beseitigung von Pathogenen, aber ihre prolongierte Anwesenheit führt unabhängig vom ursprünglichen pathologischen Stimulus zur Schädigung des Lungengewebes (42). Folglich wird das CAP-induzierte ARDS nicht nur durch das Eindringen von Pathogenen verursacht, sondern auch durch die Immunreaktion des Körpers, insbesondere durch die unkontrollierte PMN Aktivität (41).

### 1.1.2 Antibiotische Behandlung der ambulant erworbenen Pneumonie

Vor der Behandlung mit Antibiotika erreichte die Pneumokokkenpneumonie abhängig vom Serotyp hohe Mortalitätsraten (43), was durch die Etablierung der antibiotischen Therapie signifikant reduziert werden konnte (44). Auch heute sind Antibiotika die Mittel der ersten Wahl zur Behandlung der CAP, da sie nach wie vor die einzige kausale Therapieoption bei bakteriellen Infektionen darstellen. Seit der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming im Jahr 1928, welches zu den  $\beta$ -Lactam Antibiotika gehört, wurden viele weitere Substanzklassen von Antibiotika entwickelt, die auf unterschiedlichen Wirkmechanismen beruhen. Da *S. pn.* zu den häufigsten Erregern gehört und Streptokokken in Deutschland kaum Resistenzen gegen  $\beta$ -Lactam Antibiotika aufweisen, erfolgt die Erstlinien-Therapie der CAP mit Derivaten des Penicillins, den Aminopenicillinen: Amoxicillin zur oralen Verabreichung oder Ampicillin als intravenöse Variante (45). Erst bei Therapieversagen, vorliegenden Risikofaktoren oder komplizierten septischen Verläufen wird bei einer CAP ein Erregernachweis mit Antibigramm gerechter spezifischer Therapie angestrebt (45).

## 1.2 Maschinelle Beatmung und Pneumonie

Neben der antimikrobiellen Therapie im Falle eines pneumonieinduzierten respiratorischen Versagens stellt die kontrollierte invasive maschinelle Beatmung (mechanical ventilation, MV) eine der wichtigsten intensivmedizinischen Behandlungsmethoden des ARDS dar (46). Auch bei dem durch eine schwere Pneumonie ausgelösten ARDS ist die MV oft die einzige Option, um einen ausreichenden Gasaustausch für den Patienten zu gewährleisten (13). Von den 10 % der hospitalisierten Patienten, die im Verlauf ihres Krankenhausaufenthaltes intensivmedizinische Betreuung benötigen, sind laut einer Studie aus dem Jahr 2012 bis zu 84 % auf MV angewiesen (47). Obgleich es sich um eine lebensrettende Maßnahme handelt, ist sie mit hohen Risiken und zum Teil auch langfristig bestehenden Komplikationen verbunden.

Grundsätzlich stehen bei der invasiven Beatmung eines Patienten zwei Strategien zur Verfügung. Die aktuell in Deutschland am häufigsten angewandte Methode ist die druckkontrollierte Beatmung, bei der das Atemzugvolumen über den inspiratorischen Spitzendruck angepasst wird, mit dem Ziel die erforderlichen Beatmungsdrücke so gering wie möglich zu halten (48). Im Gegensatz dazu wird bei der volumenkontrollierten Beatmung das erwünschte Atemzugvolumen definiert und die Beatmungsmaschine erzeugt den dafür erforderlichen inspiratorischen Druck, wobei der Spitzendruck begrenzt wird, sodass keine unkontrollierte Drucksteigerung möglich ist (48). Die aktuelle Studienlage liefert bisher nicht ausreichend Evidenz, um eine Strategie der anderen vorzuziehen (48), obgleich beim ARDS im klinischen Alltag der druckkontrollierten Beatmung eine Überlegenheit zugeschrieben wird. Maßgeblich für die Vermeidung eines Beatmungsschadens ist allerdings weniger der Modus, über den die Beatmung kontrolliert wird, sondern vielmehr die im Folgenden beschriebene protektive Einstellung der unterschiedlichen Beatmungsparameter.

### 1.2.1 Beatmungsassoziierte Lungenschädigung

Durch die unphysiologische Überdruckbeatmung wird das Lungengewebe auf verschiedene Arten geschädigt, die unter dem Syndrom beatmungsassoziierter Lungenschaden (Ventilator-induced lung injury, VILI) zusammengefasst werden. Dabei wird zwischen direkter Schädigung durch mechanische Überbeanspruchung des Lungengewebes in Form eines Baro- bzw. Volutraumas und indirekter Schädigung durch Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren unterschieden, welche als Biotrauma bezeichnet wird.

Ursache des Volutraumas ist eine Überdehnung der Lunge, die in erster Linie durch hohe Tidalvolumina (TV) bei geringem PEEP ausgelöst wird (49). Damit einher geht außerdem eine hohe Differenz zwischen PEEP und inspiratorischem Spitzendruck, was zusätzlich eine ausgeprägte Druckbelastung des Lungengewebes verursacht und damit ein Barotrauma auslöst. Dieser Schädigungsmechanismus führt in extremen Fällen zu Pneumothorax, Pneumomediastinum oder subkutanen Emphysemen (50), häufiger jedoch zum pulmonalen Ödem (49, 51). Außerdem wird das Lungengewebe durch zyklisches Öffnen und Kollabieren der Alveolen zusätzlich geschädigt, was ebenfalls auf hohe TV bei zu geringem PEEP zurückzuführen ist und als Atelektrauma bezeichnet wird (52, 53). Häufig resultiert das Atelektrauma zusätzlich in einer Surfactant Dysfunktion, welche die Lungenschädigung weiter vorantreibt (54). Auch inhomogene Beatmung der Lunge, wie sie bei der Pneumonie nicht vermieden werden kann, da sich die Entzündung nicht gleichermaßen in allen Lungenlappen ausbreitet, trägt zur Ausbildung eines VILI bei (55). Diese Erkenntnis ist unter dem Begriff „baby lung concept“ bekannt geworden (56). Bei Pathologien wie z. B. beim ARDS sind die belüfteten Regionen der Lunge einer um ein vielfaches höheren Belastung ausgesetzt als lange Zeit angenommen, da das Lungenvolumen durch partiellen Kollaps und Infiltrate eher dem eines Säuglings entspricht (56, 57). Somit sind die angestrebten TV, die sich über das am Idealgewicht orientierte angenommene Lungenvolumen errechnen, zu hoch für das in der Realität durch Krankheit drastisch reduzierte funktionelle Lungenvolumen.

Die oben beschriebenen physikalischen Kräfte induzieren ebenfalls die Freisetzung von intrazellulären Mediatoren, einerseits direkt durch Zerstörung der zellulären Integrität, andererseits indirekt durch Transduktion des physikalischen Stresssignals in die Aktivierung verschiedener proinflammatorischer Signalwege in den betroffenen Zellen (Mechanotransduktion) (58, 59). Bei den freigesetzten Zytokinen handelt es sich vor allem um IL-8 (oder die murinen Varianten macrophage inflammatory protein MIP-2 und Keratinocyte Chemoattractant KC (60)), IL-6 und TNF $\alpha$  (61). Diese Botenstoffe können die Lunge auf vielfältige Weise schädigen, zum Beispiel durch Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, die weitere Zytokine freisetzen oder durch Stimulation der epithelial-mesenchymalen Transition, die zur Fibrose des Lungengewebes führt (62). Sie können zudem, ebenso wie Bakterien oder Lipopolysaccharide (LPS) in die systemische Zirkulation freigesetzt werden und dadurch einen septischen Verlauf vorantreiben oder auch andere Organsysteme beeinträchtigen (63-65).

Ein VILI und die damit einhergehende Morbidität und Mortalität kann maßgeblich durch Verringerung der verwendeten TV und Erhöhung des PEEP beeinflusst werden. So hat eine

wegweisende Studie aus dem Jahr 2000 gezeigt, dass die Mortalität bei einem TV von 6 ml/kg KG und einem inspiratorischen Spitzendruck von maximal 30 cmH<sub>2</sub>O signifikant geringer ist als bei den bis dahin üblichen 12 ml/kg KG (66). In einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2012 ergaben sich für die lungenprotektive Beatmung ein TV von 6-8 ml/kg KG, ein PEEP von 5-8 cmH<sub>2</sub>O und möglichst niedrige inspiratorische Spitzendrücke, woran sich heutzutage auch die Beatmungsstrategien im klinischen Alltag orientieren (67). Trotzdem ist auch diese protektive Ventilationsstrategie nicht ohne Nebenwirkungen und kann vor allem in vorgeschädigten Lungen auch zum VILI führen (68, 69). Aus diesem Grund ist es wichtig, neben dem Einsatz eines protektiven Beatmungsregimes mit entsprechenden Parametern, zusätzliche Behandlungsstrategien zu entwickeln, die den Beatmungsschaden eingrenzen können.

### 1.2.2 Multiorganversagen

Wie oben bereits erwähnt, kann die systemische Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren nicht nur lokal das Lungengewebe schädigen, sondern auch die Funktionsweise anderer Organe kompromittieren. Eine häufige Ursache für die hohe Mortalität beim ARDS ist demnach nicht der direkte Lungenschaden, sondern der daraus entstehende extrapulmonale Endorganschaden (70). Dieser kann im schlechtesten Fall im Multiorganversagen (MOV, Multi Organ Dysfunction Syndrome MODS, Multi Organ Failure MOF) münden, welches im SOFA-Score (Sepsis-related Organ Failure Assessment) über klinische und laborchemische Hinweise auf die Beeinträchtigung von Leber, Niere, Herz, Lunge, zentralem Nervensystem und Blutgerinnung in unterschiedliche Schweregrade eingeteilt wird (71). In einer Studie aus dem Jahr 2003 konnten Imai et al. im Tierexperiment nachweisen, dass die maschinelle Beatmung zur Epithelzellapoptose in der Niere und im Gastrointestinaltrakt führt (63). Außerdem scheint die Aktivierung von Endothelzellen beim beatmungsinduzierten MOV eine wichtige Rolle zu spielen (72). Aus diesen Erkenntnissen könnten sich interessante Ansatzpunkte unabhängig von der Beatmungsstrategie und der Sanierung der pulmonalen Ursache zur Behandlung der VILI-assoziierten Organschädigung ergeben.

### 1.3 Das Angiopietin-Tie2 System

Die Rezeptor Tyrosin Kinase Tie2 (TEK) wurde erstmals in der Intima von Blutgefäßen im Jahr 1992 nachgewiesen (73). In Versuchen mit Tie2-Knock-out Mäusen stellte sich heraus, dass der Rezeptor essentiell für die Entwicklung des kardiovaskulären Systems ist, da die Tie2-defizienten Tiere noch *in utero* mit einem unterentwickelten Gefäßsystem verstarben (74).

Kurze Zeit später wurden auch die Liganden des Tie2-Rezeptors, die Angiopoietine 1 und 2 (Ang-1, Ang-2) und ihre Bedeutung für die Gefäßentwicklung nachgewiesen (75, 76). Ang-1 wird konstitutiv von perivaskulären Zellen und Thrombozyten produziert und wirkt agonistisch am Tie2-Rezeptor, wodurch dieser im Ruhezustand tonisch phosphoryliert ist (75). Ang-2 wirkt als funktioneller und kontext-abhängiger kompetitiver Antagonist, da die Bindung eine schwächere Phosphorylierung des Rezeptors bewirkt (76). Anders als Ang-1 wird Ang-2 von Endothelzellen produziert und zusammen mit von-Willebrand-Faktor in sogenannten Weibel-Palade Bodies gespeichert. Als Reaktion auf bestimmte Stimuli, beispielsweise Thrombin, werden diese Mediatoren aus den Weibel-Palade Bodies freigesetzt (77). Tie2 wird nicht nur auf Endothelzellen exprimiert, sondern unter anderem auch auf Tie2 positiven Makrophagen (TEM) und hämatopoetischen Stammzellen (78). Für die Aktivierung des Tie2-Rezeptors ist eine Dimerisierung von zwei Tie2 Molekülen durch die Bindung von Ang-1 Molekülen erforderlich, wobei eine suffiziente Aktivierung erst durch höhermolekulare Strukturen in Form von Ang-1 Multimeren (mindestens Tetrameren) erreicht wird (79).

### 1.3.1 Die nachgeschalteten Signalkaskaden des Tie2-Rezeptors

Ebenso wie viele andere Wachstumsfaktoren aktiviert Ang-1 über Tie2 zahlreiche nachgeschaltete Signalkaskaden mit unterschiedlichen Auswirkungen. Die Bindung von Ang-1 aktiviert einerseits den antiapoptotischen Weg der Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) (80, 81) und hat eine antiinflammatorische Wirkung, durch die Interaktion mit Inhibitoren von NF $\kappa$ B (82). Außerdem wird die Expression von Ang-2 infolge der Inaktivierung des forkhead transcription factors (FOXO1) verhindert (83), ein Effekt, der bei Bindung von Ang-2 entfällt und so die eigene Produktion begünstigt (84, 85). Andererseits initiiert eine Ang-1 induzierte Tie2-Aktivierung auch den proapoptotischen Weg der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) (86). Im inaktiven Endothel überwiegt das antiapoptotische Signal (86), doch die Datenlage impliziert, dass die gleichzeitige Wirkung von Ang-2 und dem vascular endothelial growth factor (VEGF) das Gleichgewicht in Richtung der proapoptotischen Signalkaskade verlagern kann (87). Des Weiteren legen Ergebnisse aus Zellkulturversuchen nahe, dass insbesondere die MAPK p38 an der intrazellulären Signaltransduktion der Tie2-Aktivierung beteiligt ist. In glomerulären Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass durch Vorbehandlung mit Ang-1 Angiotensin-II induzierter Stress auf das endoplasmatische Retikulum (ER) vermindert wurde, was auf eine verstärkte Phosphorylierung von p38 zurückgeführt wurde (88). Auch das rekombinante COMP-Ang-1 konnte in einem Stimulationsversuch mit aus dem Knochenmark von Ratten gewonnenen mesenchymalen Stammzellen über die Aktivierung von

Tie2 und der nachgeschalteten Phosphorylierung von p38 eine Proliferation und Differenzierung bewirken (89).

### 1.3.2 Die Rolle des Angiotensin-Tie2 Systems bei Inflammation

Abgesehen von der Modulation der Angiogenese im Embryo und im Erwachsenen, wurde in den letzten Jahren die Bedeutung des Angiotensin-Tie2 Systems auch im Kontext verschiedener Erkrankungen untersucht, woraus sich vielfältige weitere Funktionen ergeben. Von großer Bedeutung ist hierbei die stabilisierende Wirkung auf das Endothel, da vor allem inflammatorische Zustände mit einer erhöhten vaskulären Permeabilität und daraus resultierender Schädigung der betroffenen Organe einhergehen. Ang-1 verbessert die endotheliale Integrität, indem es die Verbindungen zwischen den Endothelzellen über direkte Interaktion der aktivierten Tie2-Rezeptoren miteinander (90) und über Stabilisierung des für Adhärenzkontakte wichtigen Proteins VE-Cadherin festigt (91). Außerdem trägt es zur Verankerung der Endothelzellen in der extrazellulären Matrix (92) und zur Stabilisierung des kortikalen Aktin-Myosin Zytoskeletts bei (93). Im Gegensatz dazu kann Ang-2 über  $\beta$ 1-Integrin und die Induktion von Stressfasern direkt destabilisierend auf das Endothel wirken (94). Zusätzlich kann durch synergistische Effekte zwischen Ang-2 und proinflammatorischen Molekülen wie VEGF die Integrität des Endothels beeinträchtigt werden (95). Diese Synergie spielt auch eine Rolle in der von TNF $\alpha$  und Ang-2 induzierten Expression der Adhäsionsmoleküle intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), welche die Adhäsion und Extravasation von Leukozyten begünstigen und so eine Entzündungsreaktion vorantreiben (96). Die negativen Effekte einer verminderten Ang-1 Wirkung sind jedoch nicht nur auf den funktionellen Antagonismus von Ang-2 zurückzuführen, sondern auch auf eine geringere Expression des Tie2-Rezeptors bei systemischer Inflammation (1). Demnach entsteht die proinflammatorische Wirkung zum einen durch eine Verschiebung des Bindungsgleichgewichts in Richtung des proinflammatorischen Ang-2, wodurch der Tie2-Rezeptor weniger in der phosphorylierten aktivierten Form vorliegt, zum anderen durch eine insgesamt reduzierte Expression des Rezeptors.

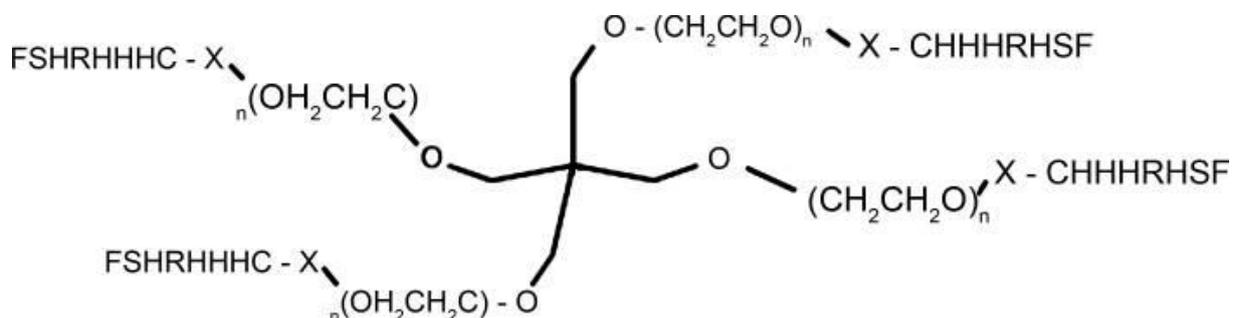
Diese experimentellen Daten konnten bereits durch zahlreiche klinische Studien in ihrer Relevanz für verschiedene Krankheiten unter anderem auch ARDS und Sepsis bestätigt werden. Die Ang-2 Spiegel sind bei Patienten mit einem Sepsis-assoziierten ARDS deutlich erhöht (97) und korrelieren bei schwerer Sepsis sowohl mit den inflammatorischen Surrogatmarkern C-reaktives Protein (CRP), IL-6 und Procalcitonin (PCT) als auch mit dem klinischen Schweregrad, bestimmt über die Scores SOFA und Acute Physiology and Chronic Health

Evaluation (APACHE) II (98). Des Weiteren scheinen hohe Ang-2 Plasmaspiegel ein Prädiktor für einen schweren oder auch tödlichen Krankheitsverlauf zu sein. (99-101). Gleichzeitig sind die Spiegel von Ang-1 vermindert (102), was zu einem ungünstigen Verhältnis von Ang-2 zu Ang-1 führt. Aus diesen Erkenntnissen ergeben sich Ansatzpunkte für therapeutische Optionen, die dazu beitragen könnten das gestörte Gleichgewicht zwischen Ang-1 und Ang-2 wiederherzustellen.

### 1.3.3 Vasculotide

Um therapeutisch bei systemischen Entzündungen auf das Angiotensin-Tie2 System Einfluss zu nehmen, stehen viele verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl, die jedoch alle darauf abzielen, das gestörte Gleichgewicht zwischen phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem Tie2 wiederherzustellen. Eine Möglichkeit das zu erreichen beruht darauf, die agonistische Aktivität von Ang-1 am Tie2-Rezeptor nutzbar zu machen.

Zunächst konnte mit rekombinantem Ang-1 in tierexperimentellen Studien ein positiver Effekt auf die erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität in einem Sepsis- und einem Pneumoniemodell nachgewiesen werden (103, 104). Allerdings machen eine kurze Halbwertszeit und potentiell mitogene Effekte mit pathologischer Neovaskularisation das rekombinante Ang-1 zu einem Arzneistoff mit ungünstiger Pharmakokinetik und schwer vorhersehbaren Nebenwirkungen (105). In einer 2004 durchgeführten Suche nach Bindungsaffinität zum Tie2-Rezeptor wurde das synthetische Peptid HHRHSF entdeckt (106). Van Slyke und Kollegen haben 2009 daraus, durch Konjugation des Peptids mit einem Cystein Rest und einem Polyethylenglycol (PEG), den Tie2 Agonisten Vasculotide (VT) hergestellt (107).



**Abbildung 1.1 Chemische Struktur von Vasculotide (1)**

In ihrer ersten Studie konnten sie die Wirksamkeit dieses neuen synthetischen Tie2 Agonisten bei der topischen Behandlung diabetischer Wunden in einem Mausmodell belegen, wobei sich eine schnellere Wundheilung und eine verbesserte Architektur neugebildeter Blutgefäße zeigten (107). Ähnliche Effekte konnten auch in einem Tiermodell eines durch ionisierende Strahlung induzierten Hautschadens erzielt werden. Eine präventive systemische Behandlung

mit VT reduzierte in diesem Modell den Strahlenschaden und beschleunigte die Heilung (108). Des Weiteren wurde die therapeutische Nutzbarkeit von VT auf Erkrankungen mit gestörter Mikrozirkulation untersucht. Dabei wurde eine protektive Wirkung von VT auf den Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere nachgewiesen. Zum einen konnte in einem Modell des akuten Nierenschadens (Acute Kidney Injury, AKI), bei dem die Schädigung durch Abklemmen der Nierenarterien erzeugt wurde, gezeigt werden, dass die Behandlung mit VT die Perfusion der Niere nach der Ischämiephase verbesserte und den Funktionsverlust gemessen über einen Anstieg des Serumkreatinins abmilderte (109). Zum anderen wurde in einem Nierentransplantationsmodell durch die VT-Therapie die Infiltration des Transplantats mit Leukozyten reduziert und eine geringere Fibrosierung beobachtet (110), was eine antiinflammatorische Wirkung nahelegt. Kürzlich konnte diese Beobachtung auch in einem Schlaganfallmodell gemacht werden, in dem die VT Behandlung nicht nur die funktionelle Beeinträchtigung nach einem Schlaganfall verringerte, sondern auch die Neuroinflammation reduzierte (111). Im Gegensatz dazu beeinflusste VT in Modellen einer Pathogen- oder Endotoxin-induzierten Lungenschädigung das Immunsystem nicht und zeigte hier keine antiinflammatorische Wirkung (1, 112) Trotzdem konnte nachgewiesen werden, dass VT wie Ang-1 die Permeabilität von Blutgefäßen in Modellen von abdomineller Sepsis (113), hämorrhagischem Schock (114), kardiopulmonalem Bypass (115), Influenza (116) und der Pneumokokkenpneumonie (112) vermindert. In den Versuchen zu Influenza und abdomineller Sepsis zeigte sich sogar eine Reduktion der Mortalität in den mit VT behandelten Gruppen (113, 116). Abgesehen davon werden für VT weitere Tie2 unabhängige Effekte vermutet, was eine Studie aus dem Jahr 2015 nahelegt, in der VT Tumorzellextavasation und -metastasierung verzögern konnte, ohne dass eine vermehrte Phosphorylierung von Tie2 nachweisbar war (117). Die nachgeschalteten Signalwege sind jedoch noch Gegenstand aktueller Untersuchungen

#### 1.4 Zielsetzung

Die ambulant erworbene Pneumokokkenpneumonie ist trotz adäquater antibiotischer Therapie noch immer eine der Infektionskrankheiten mit der höchsten Mortalität weltweit. Im Falle eines Pneumonie bedingten respiratorischen Versagens ist die maschinelle Beatmung die einzig verbleibende Therapieoption, die jedoch vor allem eine vorgeschädigte Lunge zusätzlichem Stress aussetzt und die Grunderkrankung weiter vorantreiben kann, bis zum akuten Lungenversagen. Hierfür ist meist eine Hyperpermeabilität der Blut-Luft-Schranke mit Ausbildung eines pulmonalen Ödems und konsekutiv kompromittiertem Gasaustausch die Ursache. Ein Faktor, der die endotheliale Permeabilität entscheidend beeinflussen kann, ist das

Angiopietin-Tie2-System. Ang-1 wirkt agonistisch am Tie2-Rezeptor, dessen Aktivierung eine endotheliale Stabilisierung und demnach eine Verringerung der Permeabilität bewirkt, während Ang-2 als Antagonist fungiert.

Im Rahmen dieser Dissertation soll zum einen untersucht werden, ob das synthetische Angiopietin-1 Mimetikum Vasculotide die Pneumonie- und Beatmungs-assoziierte Hyperpermeabilität der alveolokapillären Barriere in einem klinisch relevanten *in vivo* Modell bei gleichzeitiger Antibiotikatherapie stabilisieren und so die Ausbildung eines Lungenödems verringern kann und ob weitere Auswirkungen, wie der Einfluss auf die Schädigung anderer Organe oder unerwünschte Nebeneffekte, durch die Behandlung beobachtet werden können.

Zum anderen soll mittels *in vitro* Methoden und molekularbiologischer Analysen die Wirkungsweise von Vasculotide charakterisiert werden.

Auf Grundlage dieser Untersuchungen soll Vasculotide als adjunktive Therapie in der schweren Pneumokokkenpneumonie mit maschineller Beatmung evaluiert werden. Bisher gibt es keine kausale Therapie für das Ödem-induzierte respiratorische Versagen, sodass eine wirksame Permeabilität-senkende Behandlung einen deutlichen Effekt auf die Prognose der schweren Pneumonie haben könnte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Liste der verwendeten Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 2.1** Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Sartorius, MC 5(-OCE)	Sartorius AG (Göttingen)
Anästhesiegerät	Tabletop Single Animal Anesthesia System	Harvard Apparatus (Holliston, Massachusetts, USA)
Autoklav	Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec GmbH (Wettenberg)
Beatmungspumpe Maus	miniVent™	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
BGA Messgerät	Radiometer ABL-800 Basic	Radiometer Medical, (Kopenhagen, Dänemark)
Brutschrank	Heraeus Typ BB 6220 O2	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Druckaufnehmer		Hugo-Sachs-Electronics, (March-Hugstetten)
Durchflusszytometer	BD FACSCanto™	BD (Heidelberg)
Filterhauben für Tierkäfige	Filterhauben Typ II-L	EHRET (Emmendingen)
Fluoreszenz-Bildgebungssystem	LI-COR Odyssey	LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA)
Homogenisierer	gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Infusionspumpe	Pump 11 Elite	Harvard Apparatus (Holliston, Massachusetts, USA)
Kaltlichtquelle	Flexilux 600 longlife	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Magnetrührer	Thermo Scientific™ Variomag Mono Direkt	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Mikroskop (Beurteilung Zellkultur)	Hund Wilovert S	Helmut Hund (Wetzlar)
Mikrotiterplattenschüttler	IKA-Schüttler MTS 2	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Multistepper	Multipipette plus	Eppendorf AG (Hamburg)
Orbitalschüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments (Schwabach)
Oximeter	MouseOX Plus	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)

Perfusionspumpe Lunge	IP High Precision Multichannel Pump, Ismatec®	Cole-Parmer GmbH (Wertheim)
Photometer	Multiskan™ Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Photometer	Anthos ht2 Mikroplatten Photometer,	Anthos Mikrosysteme GmbH (Krefeld)
Photometer	Scanning Spectrophotometer, Uvikon XL	BioTek Instruments (Winooski, Vermont, USA)
Pipette (1/10/100/200/1000 µl)	Eppendorf Research® Plus	Eppendorf AG (Hamburg)
Präparationsbesteck		Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Pumpe für gleichmäßige Entleerung von Spritzen	Pump 11 Elite Infusion	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Sicherheitswerkbank	Hera Safe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Spectralphotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Spektralphotometer (ProcartaPlex®)	Bio-Plex® Array Reader	Bio-Rad Laboratories Inc., (Hercules, Kalifornien, USA)
Stereomikroskop	Stemi DV4	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Stromquelle Elektrophorese	PowerPac 200	BioRad Laboratories, Inc., (Hercules, Kalifornien USA)
Thermocycler	Mastercycler personal, 7300 RT PCR System,	Applied Biosystems, (Foster City, Kalifornien, USA)
Thermocycler		Biometra GmbH (Göttingen)
Thermometer	BAT-12 Microprobe Thermometer	Physitemp Instruments, Inc. (Clifton, New Jersey, USA)
Thermometer	TCAT-2AC Controller	Physitemp Instruments, Inc. (Clifton, New Jersey, USA)
Thermorüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
Trachealkanüle für Mäuse		Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Transferkammer (Semi-Dry)	Transferkammer Trans-Blot SD	BioRad Laboratories, Inc., (Hercules, Kalifornien, USA)
Vakuumpumpe	Vacunsafe comfort	Integra Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Vortexer	Vortex-Genie 2® Model G-560E	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, New York, USA)
Waage	Pocket Scale	G & G GmbH (Kaarst)
Wärmematten System	Homeothermic Blanket Systems	Harvard Apparatus (Holliston ,Massachusetts, USA)

Wasserbad	SW23 Schüttelwasserbad	Julabo GmbH (Seelbach)
Western Blot Set (Vorrichtung zum Gel Gießen, Laufkammer mit Deckel, Verbindungskabel)	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad Laboratories, Inc., (Hercules, Kalifornien USA)
Zentrifuge (groß)	Heraeus® Megafuge® 1.0R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Zentrifuge (klein)	Heraeus® Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Zentrifuge (klein)	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg)

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien**

Material	Spezifikation	Hersteller
Agarplatten	Columbia-Agar mit 5 % Schafblut	BD (Heidelberg)
BGA-Spritze	PICO50 Radiometer Arterial Blood Sample 2 ml	Radiometer Medical, (Kopenhagen, Dänemark)
Cell Scraper		Sarstedt (Nümbrecht)
Dispenser-Spitzen (5/10 ml)	Combitips advanced®	Eppendorf AG (Hamburg)
Einbettkassetten	25 cm	Rotilabo, Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Einmal-Injektionskanüle	Luminject	Transcodent GmbH (Kiel)
Einstreu für Tierkäfige	Lignocel ® Hygenic Animal Bedding	J. Rettenmaier & Söhne (Rosenberg)
Filterpapier (Westen Blot)	Whatman ® Gel Blotting Paper	GE Healthcare Life-Sciences (Marlborough, Massachusetts, USA)
Filterpipettenspitzen	SafeSeal Tips Professional	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Handschuhe		B. Braun (Melsungen)
Homogenisier Gefäße	gentleMACS™ M Tubes	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Impfschlingen (1/10 µl)	Einmal-Impfschlingen	Sarstedt (Nümbrecht)
Kanüle 18 G	Sterican® G 18 × ½“	B. Braun (Melsungen)
Kanüle 20 G	Sterican® G 20 × ½“	B. Braun (Melsungen)
Kanüle 26 G	Sterican® G 26 × ½“	B. Braun (Melsungen)
Kanüle 27 G	BD Microlance™ 3	BD (Heidelberg)

Kapillarblutentnahmesystem (mit EDTA)	Microvette® 500 µl	Sarstedt (Nümbrecht)
Kryo-Röhrchen (1 ml)		Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Küvetten	Halb-Mikro-Küvette, PS	Sarstedt (Nümbrecht)
Mikrotiterplatte (96 Well, ELISA)	Mikrotestplatte 96 Well, F	Sarstedt (Nümbrecht)
Mikrotiterplatte (96-Well, qPCR)	Micro Amp Optical 96 Well Reaction	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Nitrocellulosemembran	Amersham Protran 0,45 µm nitrocellulose Western blotting membranes	GE Healthcare Life-Sciences (Marlborough, Massachusetts, USA)
Pelletiertes Spezialfutter	ssniff® Complete Feed for Rats & Mice	ssniff, (Soest)
Probengefäß (15/50 ml)	Falcon® konische Zentrifugenröhrchen	Corning (Corning, New York, USA)
Reagenzgefäß für FACS	Falcon® 5 mL Round Bottom High Clarity PP Test Tube	Corning (Corning, New York, USA)
Serologische Pipetten (2/5/10/25 ml)	Falcon® serologische Einwegpipetten aus Polystyrol	Corning (Corning, New York, USA)
Silikonschläuche	VWR Silicone Peroxide Tubing	VWR (Radnor, Pannsylvania, USA)
Spritzen (2/5/10 ml)	BD Discardit™ II	BD (Heidelberg)
Vakuum Filter System	Filtropur V50 500 ml 0.22 µm	Sarstedt (Nümbrecht)
Venenverweilkanüle	Neoflon 24 G	BD (Heidelberg)
Western Blot Gelplatten	Mini Protean Spacer Plates 1,0 mm Mini Protean Short Plates	BioRad Laboratories, Inc., (Hercules, Kalifornien USA)
Western Blot Kamm	10 Well 1,0 mm	BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien USA)
Western Blot Platzhalter	Mini Protean Buffer Dam	BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien USA)
Zellkulturflasche, 25 cm <sup>2</sup>	TC-Flasche T 25, Standard	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatte (6 Well)	Falcon® Multiwell-Zellkulturplatten	Corning (Corning, New York, USA)
Zellsiebe (40/70/100 µm)	EASYstrainer™ Zellsiebe	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

## 2.1.3 Reagenzien

**Tabelle 2.3 Liste der verwendeten Reagenzien**

Reagenz	Hersteller
Acrylamid 40 %	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
<i>A. dest.</i>	B. Braun (Melsungen)
$\beta$ -Mercaptoethanol 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Chloroform	Fisher Scientific (Loughborough, UK)
cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
CountBright™ Absolute Counting Beads	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (1 × PBS)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Endothelbasalmedium, Antibiotika-freies MCDB 131 Medium	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Ethanol, absolut reinst	Merck (Darmstadt)
FACSFlow™	BD (Heidelberg)
FACS™ Shutdown Solution	BD (Heidelberg)
Formaldehyd-Lösung, gepuffert (4 %)	AppliChem (Darmstadt)
Heparin 25000 I.E., 5 ml	Ratiopharm (Ulm)
Humanes Serumalbumin (20 %), HSA	CSL Behring (King of Prussia, Pennsylvania, USA)
Isopropanol	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
4 x Laemmli Sample Buffer	BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien USA)
Master Mix für qPCR (TaqMan Gene Expression Master Mix)	Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien, USA)
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
NaCl 0,9 %	B. Braun (Melsungen)
Odyssey Blocking Buffer (PBS)	LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA)
Ponceau S	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Proteinmarker Kaleidoskop	BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien USA)
RPMI	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
TEMED	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Thilo Tears Augengel	Alcon Pharma GmbH (Freiburg im Breisgau)
TMB Substrate Solution	Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)

Trizol	Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

## 2.1.4 Antikörper FACS

**Tabelle 2.4 Liste der verwendeten Antikörper für die Durchflusszytometrie**

Spezifität	Klon	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
CD11b	M1/70	PE-Cy7	0,2 mg/ml	BD (Heidelberg)
CD11c	N418	Cy5	1 mg/ml	ATCC (Manassass, Virginia, USA)
CD45	30-F11	FITC	0,5 mg/ml	BD (Heidelberg)
F4/80	BM8	PE	0,2 mg/ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Ly6G	1A8	PerCP-Cy5.5	0,2 mg/ml	BD (Heidelberg)
Siglec F	E50-2440	BV421	0,5 mg/ml	BD (Heidelberg)

## 2.1.5 Antikörper Western Blot

**Tabelle 2.5 Liste der verwendeten Antikörper für den Western Blot**

Spezifität	Herkunft	Konzentration	Hersteller
Tie2	Polyclonal Rabbit	0,1 µg/ml	R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA)
Phospho Tie2	Polyclonal Goat	0,5 µg/ml	R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA)
p38	Polyclonal Rabbit	0,023 µg/ml	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)
Phospho p38	Polyclonal Rabbit	0,033 µg/ml	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA)
Actin	Polyclonal Goat	0,1 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)
Anti-Rabbit IRDye 800	Polyclonal Goat	0,1 µg/ml	Rockland Immunochemicals, Inc. (Limerick, Pennsylvania, USA)
Anti-Rabbit IRDye 700	Polyclonal Goat	0,1 µg/ml	Rockland Immunochemicals, Inc.

			(Limerick, Pennsylvania, USA)
Anti-Goat IRDye 800	Polyclonal Donkey	0,1 µg/ml	Rockland Immunochemicals, Inc. (Limerick, Pennsylvania, USA)
Anti-Goat IRDye 700	Polyclonal Donkey	0,1 µg/ml	Rockland Immunochemicals, Inc. (Limerick, Pennsylvania, USA)

### 2.1.6 Primer qPCR

**Tabelle 2.6 Liste der verwendeten Primer für die qPCR**

Target	Hersteller
Tie2	Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien, USA)
B2M	Metabion (Planegg)

### 2.1.7 Enzyme

**Tabelle 2.7 Liste der verwendeten Enzyme**

Enzym	Hersteller
DNase I	AppliChem (Darmstadt)
Kollagenase II	Biochrom (Berlin)
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

### 2.1.8 Medikamente

**Tabelle 2.8 Liste der verwendeten Medikamente**

Ulmer-Mix für Infektion		
0,9 % NaCl	B. Braun (Melsungen)	3 ml
Ketamin (100 mg/ml)	Bela-pharm (Vechta)	3 ml
Xylazin 2 %	CP-Pharma (Burgdorf)	2,4 ml
Narkose-Mix für Ventilierung		
0,9 % NaCl	B. Braun (Melsungen)	1 ml
Fentanyl (0,5 g/ml)	Ratiopharm (Ulm)	2 ml
Medetomidin (1 mg/ml)	CP-Pharma (Burgdorf)	1 ml
Midazolam (5 mg/ml)	Ratiopharm (Ulm)	2 ml

Isofluran	AbbVie GmbH & Co. KG (Ludwigshafen)	b.B. bis 10 % (inhalativ)
<b>Heparin-Gemisch</b>		
0,9 % NaCl	B. Braun (Melsungen)	2 ml
Heparin (5.000 U/ml)	Ratiopharm (Ulm)	2 ml
<b>Antibiose (Konzentration 2 µg/µl)</b>		
0,9 % NaCl	B. Braun (Melsungen)	490 µl
Ampicillin	Ratiopharm (Ulm)	10 µl (0,5 g/ml)
<b>Vasculotide (Konzentration 500 ng/ 100 µl)</b>		
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (1 × PBS)	Thermo Fisher Scientific (USA)	374 µl
Vasculotide	Zur Verfügung gestellt von Paul Van Slyke (Vasomune Therapeutics, Toronto, Canada) (107)	197 µl (100 µg/ml)
<b>Ang-1 (Konzentration 10 µg/ml)</b>		
Ang-1	R&D Systems (USA)	25 µg
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (1 × PBS)	Thermo Fisher Scientific (USA)	2500 µl
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)	0,1 %

## 2.1.9 Medien und Puffer

**Tabelle 2.9 Liste der hergestellten Medien und Puffer**

<b>FACS Puffer</b>		
	1 × PBS	Thermo Fisher Scientific (USA)
0,2 %	BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
<b>Wachstumsmedium für Bakterien (THY+Yeast)</b>		
0,5 %	Bacto™ Technischer Hefeextrakt	BD (Heidelberg)
3 %	Bacto™ Todd Hewitt Bouillon	BD (Heidelberg)
	H <sub>2</sub> O (destilliert)	B. Braun (Melsungen)
<b>Einfriermedium für Bakterien</b>		
20 %	Glycerin	Merck (Darmstadt)
80 %	THY+Yeast	Eigene Herstellung
<b>Red Blood Cell Lysis buffer</b>		
1000 ml	H <sub>2</sub> O (destilliert)	B. Braun (Melsungen)
1 g	KHCO <sub>3</sub> (10 mM)	Merck (Darmstadt)
8,29 g	NH <sub>4</sub> Cl (0.15 M)	Merck (Darmstadt)

1 %-ige Paraformaldehyd (4 % PFA) Lösung, methanolfrei		
36 ml	1 × PBS	Thermo Fisher Scientific (USA)
1 ml	Formaldehyd, methanolfrei (37 %)	Carl Roth (Karlsruhe)
Endothelzell-Wachstumsmedium		
	Endothelial Cell Growth Medium MV2	PromoCell (Heidelberg)
10 %	FCS, Hitzeinaktiviert	CAPRICORN Scientific (Ebsdorfergrund)
1 %	Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Life Technology (USA)
Für 500 ml MV2	Endothelial Cell Growth Medium MV Supplement Mix	PromoCell (Heidelberg)
VILI Puffer		
487,5 ml	Jonosteril®	Fresenius Kabi (Bad Homburg vor der Höhe)
12,5 ml	Tham Köhler	Köhler Pharma (Alsbach-Hähnlein)
0,25 mg	Fentanyl	Ratiopharm (Ulm)
RIPA-Puffer		
50 mM	Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
150 mM	NaCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
0,5 %	Na-deoxycholate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
5 mM	EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
0,1 %	SDS	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
1 %	NP-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Laufpuffer (10 x)		
0,125 M	Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
0,96 M	Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
0,5 %	SDS	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
	H <sub>2</sub> O (destilliert)	B. Braun (Melsungen)
Laufpuffer (1 x)		
100 ml	Laufpuffer (10 x)	
900 ml	H <sub>2</sub> O (destilliert)	B. Braun (Melsungen)
Transferpuffer (10 x)		

0,125 M	Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
0,96 M	Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
	H <sub>2</sub> O (destilliert)	B. Braun (Melsungen)
<b>Transferpuffer (1 x)</b>		
30 ml	Transferpuffer (10 x)	
60 ml	Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
210 ml	H <sub>2</sub> O (destilliert)	B. Braun (Melsungen)
<b>Stripping-Puffer (pH 2,2)</b>		
15 g	Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
1 g	SDS	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
10 ml	Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
1000 ml	H <sub>2</sub> O (destilliert)	B. Braun (Melsungen)
<b>Ponceaufärbung</b>		
1 g	Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
50 ml	Eisessig	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Auf 1 l	H <sub>2</sub> O (destilliert)	B. Braun (Melsungen)
<b>Sammelgelpuffer (pH 6,8)</b>		
0,5 M	Tris-HCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
<b>Trenngelpuffer (pH 8,8)</b>		
1,5 M	Tris-HCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
<b>Waschpuffer (Western Blot)</b>		
5 l	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (1 × PBS)	Thermo Fisher Scientific (USA)
2,5 ml	Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
<b>Stopp-Solution</b>		
2 M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
<b>Grundpuffer (HSA-ELISA) pH 8,0</b>		
500 mM	Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
1,4 M	NaCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
<b>Waschpuffer (HSA-ELISA)</b>		
50 mM	Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

0,14 M	NaCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
0,05 %	Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Blocking (HSA-ELISA)		
50 mM	Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
0,14 M	NaCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
1 %	BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Sample Buffer (HSA-ELISA)		
50 mM	Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
0,14 M	NaCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
1 %	BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
0,05 %	Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

### 2.1.10 Zelllinien und Bakterienstämme

**Tabelle 2.10** Liste der eingesetzten Zelllinien und Bakterienstämme

Bezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller
Humane mikrovaskuläre pulmonale Endothelzellen (huPMVEC)	Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells (HPMEC)	PromoCell (Heidelberg)
<i>S. pn.</i> , Serotyp 3 (PN36)	NTCC 7978	Zur Verfügung gestellt von Prof. Sven Hammerschmidt, Universität Greifswald

### 2.1.11 Kits

**Tabelle 2.11** Liste der verwendeten Kits

Bezeichnung	Hersteller
DC™ Protein Assay	BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien USA)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien, USA)
Human Albumin ELISA Kit	Bethyl Laboratories (USA)
Mouse LIX DuoSet ELISA	R&D Systems (USA)
Mouse VEGF DuoSet ELISA	R&D Systems (USA)
ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay	Thermo Fisher Scientific (USA)

## 2.1.12 Software

**Tabelle 2.12 Liste der eingesetzten Software**

Bezeichnung	Hersteller
FACS Diva	BD (Heidelberg)
GraphPad Prism, V6	Graphpad Software (San Diego, Kalifornien, USA)
LiCor Image Studio	LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA)
MouseOx Software	STARR Life-Sciences (Oakmont, Pennsylvania, USA)
nanoDrop Operating Software	Thermo Fisher Scientific (USA)
PULMODYN	Hugo Sachs Elektronik -harvard Apparatus GmbH (March)
scil vIP Manager, V2.0	scil animal care company GmbH (Viernheim)
SkanIt, 4.1	Thermo Fisher Scientific (USA)
WinRead Anthos	Anthos Mikrosysteme GmbH (Krefeld)
7300 System SDS	Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien, USA)

## 2.2 Versuchstiere und Haltung

Für die hier beschriebenen Versuche wurden ausschließlich weibliche, 8-10 Wochen alte und zwischen 18 und 20 g schwere Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6N verwendet. Sie werden von der Firma Charles River (Niederlassung Sulzfeld, Deutschland) für wissenschaftliche Zwecke gezüchtet und kommerziell bereitgestellt. Alle Versuche wurden bei der zuständigen Behörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin) beantragt und genehmigt (Antragsnummer: A0050/15).

Die Haltung der Tiere erfolgte in geschlossenen, isoliert ventilierten Käfigen mit Filterhaube (Typ II-L, EHRET), in denen pelletiertes Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung standen. Der Wechsel zwischen Hell- und Dunkelphasen fand alle 12 h statt.

## 2.3 Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie

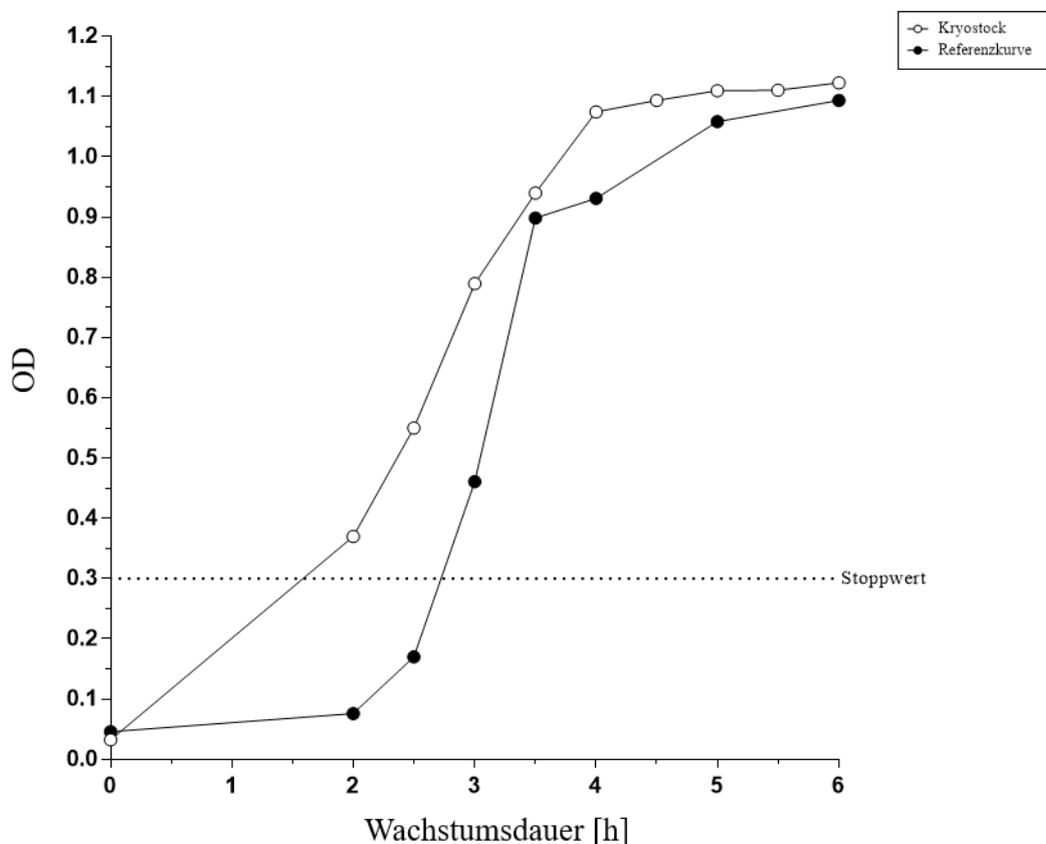
Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte für die im Folgenden beschriebenen Versuche und Methoden den Tabellen 2.1 bis 2.12 zu entnehmen.

Für die Infektion wurde *Streptococcus pneumoniae* Serotyp III (*S. pn.*) verwendet. Der Erreger wurde in einem zuvor hergestellten Kryostock aus Todd-Hewitt-Boullion mit 0,5 % Hefe (Yeast) (Todd-Hewitt-Yeast-Medium, THY) versetzt mit 20 % Glycerol bei -80 °C gelagert.

Für die Herstellung eines neuen Kryostocks wurden zunächst Bakterien eines bereits bestehenden Arbeitsstocks auf 5 Schafsblutagarplatten ausgestrichen. Nach einer Inkubationsphase von 8 -10 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden von jeder Platte 3 - 4 erkennbare, gut gewachsene Einzelkolonien mit einer sterilen Impfschlinge aufgenommen und auf einer neuen Agarplatte ausgestrichen. Darauf folgte eine weitere Wachstumsphase wie oben beschrieben. Anschließend wurden von dem hier verwendeten Einfriermedium aus sterilisiertem THY mit 20 % Glycerol 1,5 ml in ein steriles Kryoröhrchen gegeben und alle erkennbaren Einzelkolonien mit einem sterilen Wattestäbchen in das Kryoröhrchen mit Einfriermedium überführt. Um eine ausreichende Bakterienkonzentration zu erreichen wurden für einen Kryostock die Kolonien von 3 - 4 Agarplatten verwendet.

Für jede Infektion wurde die benötigte Bakteriensuspension neu hergestellt. Dafür wurden am Tag vor der Infektion Bakterien aus dem Kryostock auf 4-5 Schafsblutagarplatten ausgestrichen und für 8-9 h bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert. Nach dieser Wachstumsphase wurden nur erkennbare Einzelkolonien mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen und in Flüssigwachstumsmedium überimpft. Dieses bestand aus 18 ml THY versetzt mit 2 ml fetalem Kälberserum (fetal calve serum, FCS). Die im Medium enthaltene Menge an koloniebildenden Einheiten (Colony forming units, CFU) wurde über die optische Dichte (OD) der Suspension fotometrisch bei 600 nm ermittelt. Dabei entspricht eine OD von 0,1  $1 \times 10^8$  CFU/ml. Für das Wachstum der Pneumokokken in Lösung liegt die optimale OD zu Beginn der Wachstumsphase bei 0,03 - 0,04. Wenn diese erreicht war, wurde die Bakteriensuspension über Nacht in ein Wasserbad mit Eis gestellt, welches über eine Zeitschaltuhr gesteuert wurde, sodass die Bakterien nach einer erneuten Wachstumsphase von ca. 2,5 h bei 37 °C zum gewünschten Zeitpunkt am nächsten Morgen eine OD von 0,3-0,4 erreicht hatten. Diese OD ist optimal für die transnasale (t.n.) Infektion von Mäusen, da sich die Pneumokokken zu diesem Zeitpunkt in der exponentiellen Phase ihres Wachstums befinden (Abbildung 2.1). Wenn die gewünschte OD erreicht war, wurde die Kockensuspension, nach Ermittlung des Volumens, bei 3100 rpm für 10 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, wobei die Zentrifuge anschließend langsam ohne Einschalten der Bremsfunktion abstoppte. Der Überstand wurde von dem so entstandenen Bakterienpellet abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit steriler Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) resuspendiert, um eine Konzentration von  $1 \times 10^9$  CFU/ml zu erreichen, wobei sich das benötigte Volumen über die OD und das Gesamtvolumen der Kockensuspension berechnete. Zunächst wurde die Gesamtzahl der Kokken ermittelt, indem man das Volumen mit der gemessenen Kokkenzahl pro ml multiplizierte. Daraus ließ sich das für eine Verdünnung von  $1 \times 10^8$  CFU/ml erforderliche

Volumen PBS bestimmen, welches für eine Endkonzentration von  $1 \times 10^9$  CFU/ml noch durch 10 dividiert werden musste. Um nun die Infektionsdosis von  $5 \times 10^6$  CFU/Tier zu erreichen wurde die Kokkensuspension erneut 1:2 mit sterilem PBS auf  $5 \times 10^8$  CFU/ml verdünnt. Zur Verbesserung der Suszeptibilität der Tiere für die Pneumokokken wurde diese Lösung im Verhältnis 1:2 mit Hyaluronidase (900 U/100  $\mu$ l) versetzt. Eine Applikation von 10  $\mu$ l dieser Lösung pro Nasenloch, entsprach demnach einer Infektionsdosis von  $5 \times 10^6$  CFU/Tier. Aus vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe und anderen Studien ist bekannt, dass diese Infektionsdosis bei dem verwendeten Mausstamm bei nahezu allen Tieren nach spätestens 48 h eine schwere Pneumonie mit Sepsis verursacht, die meist nach 72 h tödlich endet (17, 118-120).



**Abbildung 2.1** Wachstum des für die Infektion verwendeten Kryostocks von *S. pn.* 8 - 10 h auf Schafsblutagarplatten gewachsene Bakterien wurden bis zu einer OD von 0,03 – 0,04 in Flüssigmedium (THY+ 0,5 % Yeast) überimpft. Die Bakteriensuspension wurde bis zur Verwendung im Eiswasserbad gelagert. Das weitere Wachstum erfolgte bei 37°C im Wasserbad und die OD wurde nach 2 h das erste Mal und danach alle 30 min gemessen, um die Phase des exponentiellen Wachstums zu bestimmen.

Zum Zeitpunkt 0 h erfolgte die t.n. Infektion der Tiere mit  $5 \times 10^6$  CFU/Tier *S. pn.* durch Frau Dr. Birgitt Gutbier. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse mit einer intraperitonealen (i.p.) Injektion Ketamin (80 mg/kg KG) und Xylazin (25 mg/kg KG) in einem Gesamtvolumen von

60 µl narkotisiert und an den vorderen Schneidezähnen senkrecht aufgehängt, um den Infektionsweg besser passierbar zu machen. Die Kontrollgruppen erhielten dasselbe Volumen PBS, ebenfalls im Verhältnis 1:2 mit Hyaluronidase versetzt. Nach der Infektion wurden die Mäuse solange mit Rotlicht warmgehalten, bis sie soweit erwacht waren, dass sie sich wieder selbstständig bewegten.

## 2.4 Vasculotide-Behandlung und VILI-Präparation

In den Vorversuchen der AG Witzenrath hatte sich im Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie ohne zusätzliche Beatmung eine VT-Dosierung von 500 ng/ 100 µl bei intravenöser (i.v.) Applikation als wirkungsvoll erwiesen (112), daher wurde die Dosierung auch in dieser Studie verwendet. Das VT wurde uns im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation freundlicherweise von Paul Van Slyke (Vasomune Therapeutics, Toronto, Canada) zur Verfügung gestellt. VT oder in den Kontrollgruppen das Lösungsmittel (LM) PBS wurde zum Zeitpunkt 22 h post infectionem (p. i.) in eine der lateralen Schwanzvenen appliziert. Zu diesem Zeitpunkt wurde außerdem eine Einzeldosis des Antibiotikums Ampicillin mit einer Konzentration von 0,02 mg/g KG in 200 µl als i.p. Injektion verabreicht. Die Kontrollgruppen erhielten dasselbe Volumen physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %), das Lösungsmittel des Antibiotikums. 24 h p. i. wurde das Tier mit einer Mischung aus Fentanyl (0,08 mg/kg KG), Midazolam (8 mg/kg KG) und Medetomidin (0,8 mg/kg KG) in Narkose gelegt und für die sechsstündige Beatmung präpariert. Diese erste Präparation wurde wegen des hohen technischen Anspruchs und der dafür erforderlichen langjährigen Erfahrung durch Frau Dr. Birgitt Gutbier durchgeführt. Dafür wurde als erstes eine Trachealkanüle für die invasive Beatmung in die Trachea eingebracht. Während des Versuches wurde die Maus mit 12 ml/kg KG TV, einer Atemfrequenz von 120 /min, einem PEEP von 2 cmH<sub>2</sub>O und 50 % Sauerstoff in der Atemluft (fraction of inspired oxygen, FiO<sub>2</sub>) Überdruck beatmet. Diese Beatmungsstrategie war lange Zeit die gängige Therapie bei ARDS, da sonst in vielen Fällen keine ausreichende Oxygenierung erreicht werden konnte.

Im Anschluss an die Kanülierung der Trachea wurde ein Katheter in die linke *Arteria (A.) carotis* gelegt, über den die Maus während der Beatmungsphase kontinuierlich eine Infusion (350 µl/h) aus Vollelektrolytlösung Jonosteril versetzt mit 0,0075 mmol/ml Trometamol und 0,0005 mg/ml Fentanyl (VILI-Puffer) erhielt. Zusätzlich dazu erfolgte alle 45 min eine Applikation von Medetomidin (0,16 mg/kg KG) und Midazolam (1,6 mg/kg KG) über einen peritonealen Katheter, zur Aufrechterhaltung der Narkose. Bei nicht ausreichender

Narkosetiefe bestand außerdem die Möglichkeit über die Trachealkanüle bis zu 5 %ig Isofluran zu verabreichen. Sauerstoffsättigung und Herzfrequenz der Maus wurden über eine Schwanzklemme, die mit einem Pulsoxymeter verbunden war, überwacht. Die kontinuierliche Aufzeichnung des Blutdrucks sowie der verschiedenen Beatmungsparameter erfolgte mit Hilfe der Software Pulmodyn über Druckaufnehmer, die mit dem Carotiskatheter bzw. der Trachealkanüle verbunden waren. Der Urin wurde über einen Blasenkatheter abgelassen und für spätere Analysen asserviert.

Nach 4,5 h Beatmungszeit wurde über den Carotiskatheter eine zweite Dosis VT (bzw. LM) appliziert. Dieser zweite Bolus wurde mit 1 mg Humanem Serumalbumin (HSA) versetzt, das zur Quantifizierung der pulmonalen Schrankenstörung benötigt wurde. Das entsprach 14,3  $\mu$ l der HSA-Lösung mit einer Konzentration von 200 g/l in 200  $\mu$ l VT bzw. LM, bei einer Applikation von 100  $\mu$ l der Mischung. 10 min vor Versuchsende wurde die  $FiO_2$  auf 100 % erhöht und die Narkose mit 50  $\mu$ l der Infusionslösung (Jonosteril mit 0,0075 mmol/ml Trometamol und 0,0005 mg/ml Fentanyl) und 50  $\mu$ l der Midazolam-Medetomidin-Lösung (Medetomidin 0,4 mg/kg KG und Midazolam 4 mg/kg KG) vertieft. Nach weiteren 5 min erfolgte die Gabe von 100  $\mu$ l Heparin mit einer Konzentration von 2500 IE/ml über den Carotiskatheter, um die Koagulation bei der finalen Blutentnahme zu verhindern.

Im Anschluss an die 6 h Beatmung wurde das gesamte Blutvolumen der Maus mit einer 1 ml Spritze, die für die folgende Blutgasanalyse (BGA) mit einem Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Schwämmchen präpariert war, über den Carotiskatheter entnommen. Nach der finalen Blutentnahme, wurden Milz, Leber, Nieren und ein Stück des proximalen Ileums für spätere Analysen entnommen und unmittelbar nach der Entnahme in 1,5 ml Probengefäßen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zum Verwendungszeitpunkt wurden sie bei -80 °C gelagert. Darauf folgten die Entfernung des Zwerchfells und die Eröffnung des Thorax. Zur Beseitigung des Restblutes aus den Lungengefäßen, erfolgte eine Perfusion des Organs mit physiologischer NaCl-Lösung über einen in die *A. pulmonalis* gelegten Katheter (Flussrate von 1 ml/min). Danach wurde der linke Lungenlappen bronchusnah ligiert. Die Trachealkanüle wurde vom Beatmungsgerät diskonnektiert und die rechte Lunge mit 4 x 400  $\mu$ l Proteinaseinhibitor-Cocktail (Complete Mini gelöst in PBS) lavagiert. Die so gewonnenen 4 Proben Lavageflüssigkeit wurden getrennt in 4 Polyethylenröhrchen aufgenommen. Zuletzt wurde die linke Lunge für die Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting, FACS) entnommen und in 1 ml Zellkulturmedium des Roswell Park Memorial Institute (RPMI-Medium) aufgenommen. Die lavagierte rechte Lungenhälfte wurde für spätere Analysen bei

- 80 °C eingefroren. Bei den infizierten Tieren wurden 30 µl von der zurückgewonnenen Spüllösung der ersten bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) zur Bestimmung der bakteriellen Last mittels CFU-Analyse verwendet.

Bei den nicht beatmeten Kontrolltieren entfiel lediglich die sechsstündige Beatmungsphase. Die übrige Behandlung und Präparation entsprachen dem zuvor bei den beatmeten Versuchstieren beschriebenen Vorgehen. Die Narkose und Präparation zum Legen der Trachealkanüle und des Carotiskatheters wurde demnach 30 h p. i. durchgeführt, während die HSA-Applikation mit VT oder LM zur Quantifizierung der pulmonalen Schrankenstörung 1,5 h zuvor als i.v Injektion in eine der lateralen Schwanzvenen erfolgte.

## 2.5 Probenaufbereitung

### 2.5.1 Blut

Mit dem entnommenen heparinisierten Vollblut wurde eine BGA durchgeführt (ABL-800; Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Zudem wurde Vollblut für die Analyse der Leukozyten im Blut mittels Hämozytometer (scil Vet) und im Falle von infizierten Tieren für CFUs verwendet. Das restliche Blut wurde bei 4000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, das Plasma aliquotiert und für den HSA enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sowie weitere Zytokinanalysen in 0,5 ml Probengefäßen bei -80 °C gelagert.

### 2.5.2 ELISA für humanes Serumalbumin

Zur Quantifizierung der pulmonalen Barrierestörung wurde im ELISA die HSA-Konzentration in BALF und Plasma über die OD ermittelt. Die Durchführung des ELISAs erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für alle ventilierten sowie für die infizierten Tiere wurden die BALF-Proben jeweils 1:10, 1:50 und 1:100 mit Sample Buffer verdünnt, während die BALF der nicht ventilierten, nicht infizierten Kontrollen pur, 1:2 und in 1:5 verdünnt aufgetragen wurde. Die Verdünnungen für das Plasma waren bei allen Tieren 1:2000, 1:5000 und 1:10000. In manchen Fällen mussten die Dilutionen nach der ersten Messung angepasst und der ELISA wiederholt werden. Zur Messung der OD bei 450 nm stand ein ELISA-Reader (Anthos ht2 Mikroplatten Photometer) mit zugehöriger Software (WinRead Anthos) zur Verfügung. Aus den Messwerten wurde unter Berücksichtigung der eingesetzten Probenverdünnungen der HSA-BALF/Plasma-Quotient ermittelt, welcher zum Vergleich der Permeabilität der Lungenbarriere herangezogen wurde (HSA-Konzentration BALF / HSA-Konzentration Plasma x 1000).

### 2.5.3 Durchflusszytometrie

FACS-Ansätze wurden von BALF und Lungenhomogenat angefertigt und nach Protokollen gefärbt, die in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Geraldine Nouailles-Kursar etabliert wurden. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahlen wurden die Proben zusätzlich mit Counting Beads (CountBright™ Absolute Counting Beads) versetzt.

Von der BALF wurden bei infizierten Tieren zunächst 30 µl der ersten BAL abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung für die CFU Bestimmung kurzzeitig auf Eis gestellt. Danach wurden die 4 Röhren mit der BALF bei 2200 rct für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, um die Zellen von der restlichen Flüssigkeit zu separieren. Von BAL 1 und 2 wurden je 200 µl des Überstandes abgenommen und für den HSA-ELISA gepoolt. Im Anschluss daran wurden von BAL 1-4 die Überstände soweit abgenommen, dass ca. 50 µl Restvolumen im Röhren verblieben. Diese Überstände wurden für Zytokin Analysen in 0,5 ml Probengefäßen bei -80 °C gelagert, ebenso wie die Proben für den HSA-ELISA. Für die Quantifizierung der Leukozyten wurden nun die Zellpellets in einem Gesamtvolumen von 1 ml FACS-Puffer (PBS + 0,5 % Bovines Serum Albumin (BSA) + 2 mM EDTA) resuspendiert. Zu diesem Zweck wurde jedes Röhren zweimal mit je 125 µl FACS-Puffer gewaschen und die gesamte Flüssigkeit im Röhren der ersten BAL gesammelt. Die Zellsuspension wurde in ein Polystyrenröhren überführt, indem das Polyethylenröhren dreimal mit je 1 ml FACS Puffer gewaschen wurde. Die anschließende Zentrifugation erfolgte mit 1500 rct für 5 min bei 4 °C und der so entstandene Überstand wurde dekantiert.

Um die Leukozyten der Lunge zu analysieren wurde als erstes die in RPMI entnommene linke Lunge mit einer Organschere zerschnitten und daraufhin in insgesamt 6 ml RPMI mit 2 mg DNase und 6 mg Kollagenase für 30 min im Wasserbadrüttler bei 37 °C verdaut. Das verdaute Gewebe wurde mit einem Cell Strainer (Porengröße 100 µm) homogenisiert, für 5 min bei 1500 rct und 4 °C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 2 ml Erythrozyten Lyse Puffer (Red Blood Cell Lysis Buffer, RBC, KHCO<sub>3</sub> 0,01 M, NH<sub>4</sub>Cl 0,155 M, EDTA 0,1 M, PH 7,5) resuspendiert, um noch im Homogenat enthaltene Erythrocyten zu beseitigen. Nach 2 min wurde die Reaktion mit FACS Puffer abgestoppt, sodass die Zellen in insgesamt 20 ml Volumen gelöst waren. Diese Lösung wurde erneut für 5 min bei 1500 rct und 4 °C zentrifugiert und der Überstand danach verworfen. Das Zellpellet wurde in 400 µl FACS Puffer gelöst und 100 µl der Suspension in ein klares Polystyrenröhren überführt.

Die Zellen der Lungen- und BALF-Proben wurden nun zunächst für 2 min auf Eis mit je 10  $\mu$ l 1:10 verdünntem Antikörper gegen die fragment crystallizable (Fc) Region versetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurden sie mit den folgenden Antikörpern gefärbt:

**Tabelle 2.13 Antikörper für die FACS-Analyse der Leukozyten von BALF und Lunge**

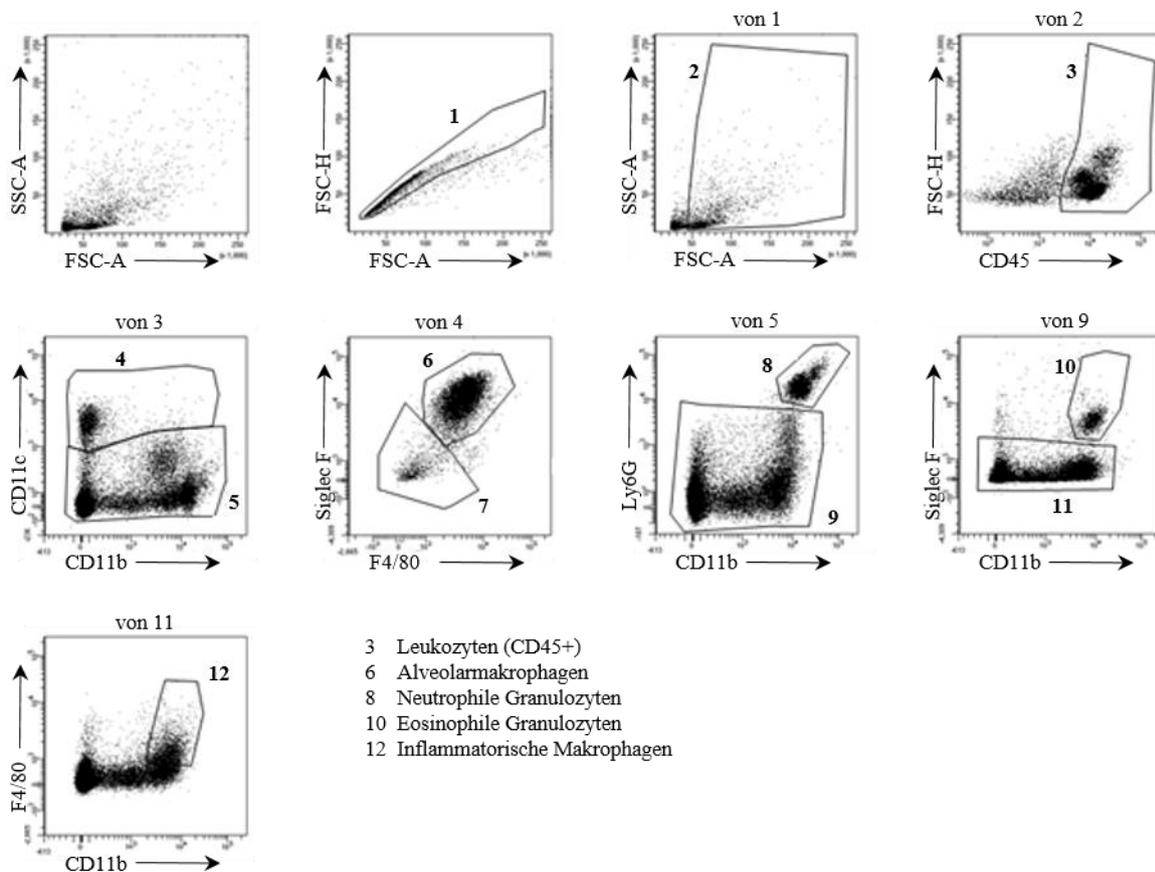
Antikörper	Farbe	Konzentration	$\mu$ l
CD11c	Cy5	1 mg/ml	0,4
CD11b	PE-Cy7	0,2 mg/ml	0,5
F4/80	PE	0,2 mg/ml	0,8
CD45	FITC	0,5 mg/ml	1
Ly6G	PerCP-Cy5.5	0,5 mg/ml	0,8
Siglec F	BV421	0,5 mg/ml	0,8
FACS-Puffer			15,7
Gesamtvolumen			20

Die gefärbten Proben von Lunge und BALF wurden für 30 min im Kühlschrank inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und wie oben bereits beschrieben für 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert war, wurden die Zellpellets vorsichtig aufgeschwemmt und dann mit je 800  $\mu$ l 2 %igem methanolfreiem Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert. Danach wurden sie noch einmal mit PBS gewaschen, wie zuvor zentrifugiert und abschließend mit je 300  $\mu$ l FACS Puffer resuspendiert. Bis zur Messung konnten die Proben im Kühlschrank gelagert werden.

Die Beads zur Ermittlung der absoluten Zellzahlen wurden für die BALF 1:10 und für die Lunge 1:2 mit FACS-Puffer verdünnt und pro Probe 50  $\mu$ l der jeweiligen Dilution eingesetzt. Als Kontrolle wurde bei jeder Messung ein Röhrchen mitgeführt, welches nur Beads der entsprechenden Verdünnung enthielt.

In der Pneumokokkenpneumonie mit einer Infektionsdauer von 30 h ist vor allem die angeborene Immunreaktion von Bedeutung, daher wurden mit der Färbung auch nur die Zellen des innaten Immunsystems detektiert. Entsprechend ihrer Oberflächenmarker wurden so die gesamten Leukozyten (CD45+), die Alveolarmakrophagen (SiglecF+,F4/80+), neutrophile Granulozyten (Ly6G+,CD11bhigh), eosinophile Granulozyten (CD11c-,Ly6G-

,SiglecF+,CD11bhigh) und inflammatorische Makrophagen (CD11c-,Ly6G-,SiglecF-,f4/80+,Cd11b+) differenziert. Abbildung 2.2 zeigt die Gating-Strategie



**Abbildung 2.2 Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Untersuchung der BALF- und Lungenproben** adaptiert nach einer Abbildung von Frau Dr. Geraldine Nouailles-Kursar am Beispiel der Zellpopulationen im Lungenparenchym

Von besonderem Interesse waren hier vor allem die neutrophilen Granulozyten in der BALF als Maß für die Immunzellmigration in den Alveolarraum und für das Ausmaß der inflammatorischen Antwort auf einen pathogenen Stimulus, sowie die Alveolarmakrophagen und die inflammatorischen Makrophagen. *In vitro* hatte sich gezeigt, dass Ang-1 die Expression von Adhäsionsmolekülen für die Leukozytenmigration vermindert (121), daher wurde untersucht, ob dieser Effekt auch *in vivo* durch eine VT-Therapie zu finden ist.

#### 2.5.4 Bestimmung der bakteriellen Last

Die Bakterienlast wurde in Blut und BALF bestimmt. Dafür wurden die Proben pur und in den Verdünnungen 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup> und 1:10<sup>5</sup> auf Schafsblutagarplatten aufgetragen, über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, anschließend die Bakterienkolonien jeder Platte

ausgezählt und die Bakterienlast pro  $\mu\text{l}$  errechnet. Dies sollte darüber Auskunft geben, ob VT möglicherweise die Bakterienvermehrung und -ausbreitung beeinflussen kann.

### 2.5.5 Zytokin und Chemokin Analyse mittels Multiplex Immunoassay

Die Bestimmung der Zytokin- bzw. Chemokinkonzentrationen in BALF und Plasma wurde mit einem ProcartaPlex<sup>®</sup> Kit (Invitrogen) durchgeführt. Bei dieser Methode wurde eine Antigen Mischung für die Chemokine MIP-2 und KC, sowie für die Zytokine IL-6, IL-10, IL12p40, TNF- $\alpha$  und Granulozyten-Monozyten-Colony stimulating factor (GM-CSF) bereitgestellt. Die Konzentration wurde durch magnetische Beads quantifiziert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die BALF Proben wurden unverdünnt aufgetragen und als Blank Wert wurde PBS mit 0,05 % entfettetem BSA verwendet. Die Plasma Proben wurden zunächst 1:2 mit dem Universal Assay Buffer verdünnt, welcher dementsprechend auch als Blank Wert diente. Die so präparierten Proben wurden in einem Spektralphotometer (Bio-Plex<sup>®</sup> Array Reader) gemessen.

### 2.5.6 Serum-Marker für ein Multiorganversagen

Zur Beurteilung einer möglichen protektiven Wirkung von VT wurden als Surrogatparameter für eine Organschädigung von dem externen Labor LaboKlin (LaboKlin GmbH & Co. KG, Bad Kissingen) die Konzentrationen der Leberfunktionsparameter Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT) und Bilirubin, sowie der Nierenretentionswerte Harnstoff und Cystatin C ermittelt. Die Untersuchung erfolgte in Plasmaproben der Tiere aller Beatmungsversuche (sowohl BAL-Gruppen als auch Histologie-Gruppen).

## 2.6 Analyse der Auswirkung von VILI und Pneumonie auf die Expression des Tie2-Rezeptor und beteiligter Signalwege

Um die Effekte der Lungenschädigung auf den Tie2-Rezeptor zu evaluieren, wurde zunächst die Expression des Rezeptors im Lungengewebe mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt. Die Beurteilung des Aktivitätszustandes des Rezeptors erfolgte über Western Blot Analysen des Verhältnisses von phosphoryliertem zu nicht phosphoryliertem Tie2 sowie phosphoryliertem zu nicht-phosphoryliertem p38.

### 2.6.1 RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA aus dem Lungengewebe wurde zunächst die Hälfte des linken Lungenflügels in 1 ml Trizol aufgenommen und in einem MACS-Tube mit dem Gentle MACS

homogenisiert. Dieses Homogenat wurde daraufhin für 5 min mit 2200 rpm bei 4 °C zentrifugiert, der so geklärte Überstand abgenommen und mit 200 µl Chloroform versetzt. Die Mischung wurde für 15 s gevortext und dann 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine erneute Zentrifugation für 20 min mit 12000 rpm bei 4 °C. Während dieses Schrittes entstand ein Gradient, der die Probe in drei optisch differenzierbare Phasen auftrennte, von denen nun die obere wässrige Phase abgenommen wurde. Die darin enthaltene RNA wurde mit je 500 µl Isopropanol ausgefällt und extrahiert, indem beide Substanzen gründlich vermischt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut für 20 min mit 12000 rpm bei 4 °C zentrifugiert wurden. Der Überstand von dem so entstandenen Pellet wurde dekantiert und das Pellet mit 75 % unvergälltem Ethanol gewaschen, woraufhin es erneut 5 min bei 9000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Ethanol dekantiert und das Pellet getrocknet. Sobald das gesamte Ethanol verdampft war, wurde die RNA in 30 µl destilliertem Wasser (*Aqua destillata*, *A. dest.*) resuspendiert, in je 15 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

## 2.6.2 Umschreiben von RNA in cDNA

Zunächst wurde die RNA Konzentration pro µl jeder Probe im NanoDrop ermittelt. Mit diesen Werten war es möglich, das benötigte Volumen für eine RNA-Konzentration von 2 ng/ 10 µl im Ansatz für die cDNA zu berechnen, um eine vergleichbare cDNA Konzentration in allen Proben zu erreichen. Für das Umschreiben wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit verwendet. Zunächst wurde der Mastermix für die entsprechende Probenmenge kalkuliert, wobei pro 2 ng cDNA die folgenden Volumina eingesetzt wurden:

10x RT Buffer	2 µl
25x dNTP Mix (100 µM)	0,8 µl
10x RT Random Primers	2 µl
Multi Scribe Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease free H <sub>2</sub> O	4,2 µl

Danach wurden 6 ng RNA in 30 µl *A. dest.* (2 ng/10 µl) pro Probe in ein 0,5 ml Probengefäß eingesetzt und 30 µl Mastermix hinzugefügt. Alle Proben wurden daraufhin in einen Thermocycler überführt, dessen Programm folgendermaßen konfiguriert war:

Schritt 1	25 °C	10 min
Schritt 2	37 °C	120 min
Schritt 3	85 °C	5 min
Schritt 4	4 °C	Pause

Zuletzt wurden die Ansätze mit je 240  $\mu\text{l}$  *A. dest.* pro Probe aufgefüllt und bis zur Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.6.3 qPCR zur Quantifizierung des Tie2-Rezeptors in der Lunge

Für die qPCR wurden zwei Ansätze eines Mastermixes vorbereitet, wobei der eine den Primer des Zielgens Tie2 und der andere den Primer des Housekeeping-Gens Beta-2-Mikrotubulin (B2M) enthält. Für die Analyse wurden in einer 96-Well Platte in dreifacher Bestimmung für jede Probe je 15  $\mu\text{l}$  des Mastermixes vorgelegt. Danach wurden pro Well 5  $\mu\text{l}$  der cDNA hinzugefügt, sodass für jede Probe die Anzahl der Zyklen von Tie2 und B2M bestimmt werden konnte. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und kurz zentrifugiert, um alle Proben zum Grund der Wells zu bringen. Danach erfolgte die Messung im Thermocycler (Mastercycler personal, 7300 RT PCR System) mit der 7300 System SDS Software. Die Zykluslängen waren dabei folgendermaßen definiert:

- (1) Aktivierung:                2 min bei  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$   
     10 min bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$
- (2) Amplifikation:            15 s bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$   
     1 min bei  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$                  $\rightarrow$  bis zu 40 Zyklen
- (3) Kühlung

Mithilfe der Software konnte für jede Probe der Cycle-Threshold (Ct)- Wert ermittelt werden. Dieser Wert beschreibt, in welchem Amplifikationszyklus ein bestimmter Grenzwert für das fotometrisch ermittelte Fluoreszenzsignal erreicht wurde. Somit wird der Wert umso niedriger je mehr cDNA in der Probe vorhanden ist, wodurch auf den ursprünglichen RNA-Gehalt und darüber auf eine gegebenenfalls veränderte Genexpression geschlossen werden kann. Aus der Triplet Messung wurde daraufhin jeweils für das Ziel- und für das Housekeeping-Gen das arithmetische Mittel der Ct-Werte errechnet. Der Mittelwert des Housekeeping-Gens wurde für jede Probe vom Mittelwert des Ziel-Gens subtrahiert, um den Unterschied zwischen den Ct Werten zu ermitteln ( $\Delta\text{Ct}$ ). Von diesen  $\Delta\text{Ct}$ -Werten wurde dann für jede Probe der Versuchsgruppen das arithmetische Mittel der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte der nicht beatmeten, nicht infizierten, unbehandelten Kontrollgruppe abgezogen, um die Werte der Versuchsgruppen in Bezug zur Kontrollgruppe zu setzen ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ). Damit eine Erhöhung der Genexpression auch mit einem positiven Zahlenwert einhergeht, um eine übersichtliche Darstellung der Ergebnisse zu erreichen, wurden die Relative Quantification (RQ) - Werte folgendermaßen errechnet:  $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Demnach entsprach das arithmetische Mittel der Kontrollgruppe einer RQ von 1. Eine

Erhöhung der Genexpression ging mit RQ-Werten  $>1$  einher, während eine Reduktion der Genexpression RQ-Werte  $<1$  zur Folge hatte.

#### 2.6.4 *In vitro* Stimulation von Endothelzellen mit Angiopietin-1 und Vasculotide

Um eine Kontrollgruppe für die Western Blot Analysen zu etablieren, wurden zunächst humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (huPMVEC) angezüchtet und mit Ang-1 und VT stimuliert.

##### 2.6.4.1 Anzucht der humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen

Für die Anzucht der huPMVECs wurden als erstes zwei 6-Well-Platten mit je 2 ml pro Well MVC2-Medium, versetzt mit den dazugehörigen Supplements und 1 % Penicillin-Streptomycin (PenStrep), vorbereitet und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Weitere 11 ml MVC2-Medium (mit Supplements und PenStrep) wurden ebenfalls in einem 15 ml Gefäß für 30 min vorgewärmt. Ein Kryostock von ca. 1 ml der huPMVECs wurde aus der Lagerung in flüssigem Stickstoff entnommen und langsam bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurde der gesamte Inhalt in die vorbereiteten 11 ml des MVC2 Mediums überführt und vorsichtig mit einer Pipette vermischt. Von der Zellsuspension wurde je 1 ml pro Well in die vorbereiteten 6-Well-Platten aufgetragen. Im Anschluss daran wurden die Zellen in den 6-Well-Platten zum Wachstum bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der erste Mediumwechsel fand 24 h nach der Aussaat der Zellen statt. Dafür wurde das alte Medium vorsichtig mit einem Vakuumsauger abgenommen und durch je 3 ml/Well vorgewärmtes MVC2-Medium (mit Supplements und PenStrep) ersetzt. Das weitere Wachstum erfolgte danach wieder im Inkubator bis zu einer Konfluenz der Zellen von 80-90 %, die mikroskopisch evaluiert wurde. Währenddessen wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt.

##### 2.6.4.2 Stimulation der humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen

Am Abend vor der Stimulation wurde das Medium zum letzten Mal entfernt und durch je 2 ml/Well Endothelzellbasalmedium (MCDB 131 Medium) ohne weitere Zusätze ersetzt. Der Stimulationsversuch begann 12 h später. Dafür wurde je 1 ml Medium pro Well entnommen und durch 1 ml der entsprechenden Stimulationslösung ersetzt. Diese bestand aus vorgewärmtem Endothelzellbasalmedium, welches entweder 300 ng/ml Ang-1 oder 300 ng/ml VT enthielt. Diese Konzentrationen wie auch die Stimulationszeiten wurden bereits durch Van Slyke et. al erprobt (107). Das Medium der Kontrollgruppe wurde lediglich mit PBS mit 0,15 %

BSA, dem Lösungsmittel von Ang-1, versetzt. Sobald die Zellen mit der jeweiligen Stimulationslösung behandelt waren, wurden sie für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, jedes Well mit je 2 ml vorgewärmtem PBS gewaschen und auch dieses wieder entfernt. Zur Lösung der Zellen wurde 1 ml kaltes PBS in jedes Well gegeben und die Zellen mit einem Zellscraper vom Boden des Wells mobilisiert. Die so entstandene Zellsuspension wurde für jedes Well in ein separates 2 ml Probengefäß überführt, der Scraper und das Well nochmals mit 500 µl PBS gewaschen und auch diese Flüssigkeit demselben Gefäß hinzugefügt. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 10 min mit 2500 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der so entstandene Überstand abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde mit je 25 µl Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA)-Puffer mit 1 mM Natriummetavanadat (NaVO<sub>3</sub>) und 1 mM Natriumfluorid (NaF) sowie Proteinaseinhibitor Complete Mini resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde die Suspension alle 5 min gründlich gemischt, um das Protein aus den Zellen herauszulösen. Nach der Inkubation wurden die Proben bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Vor der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben aufgetaut und für 30 min mit 13000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das so im Überstand gelöste Protein wurde in ein neues Probengefäß überführt und konnte für die Proteinmessung und den anschließenden Western Blot verwendet werden.

### 2.6.5 Proteinisolation aus Lungengewebe

Für die Isolation von Proteinen aus dem bei -80 °C gelagerten Lungengewebe wurde pro Tier jeweils ein Viertel der lavagierten Lunge in ein Gentle MACS Tube gegeben. Diese wurden mit je 200 µl RIPA-Puffer mit 1 mM NaVO<sub>3</sub> und 1 mM NaF sowie Proteinaseinhibitor Complete Mini durch den Gentle MACS homogenisiert und im Anschluss daran für 5 min mit 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die gesamte von den festen Bestandteilen getrennte Flüssigkeit wurde in ein 1,5 ml Probengefäß überführt und erneut für 10 min mit 13000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit dem geklärten Protein wurde abgenommen und bis zur Verwendung bei -20 °C in einem neuen 1,5 ml Probengefäß gelagert. Ein Teil des Proteins wurde direkt nach der Isolation für die Verwendung im Western Blot aufbereitet und ebenfalls bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.6.6 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte in einer 96-Well-Platte über die Absorption im ELISA-Reader (Multiscan FC, Thermo Fisher Scientific) mithilfe der entsprechenden Software SkanIt 4.1 (Thermo Fisher Scientific). Als erster Standard diente dabei BSA, das in einer

Konzentration von 2 mg/ml in PBS gelöst wurde und bis zum 6. Standard jeweils 1:2 bis zu einer Konzentration von 0,0625 mg/ml verdünnt wurde. Die Proben aus den Zellkulturversuchen wurden in einer Verdünnung mit PBS von 1:5 aufgetragen, während die Messung der aus dem Lungenhomogenat isolierten Proteine in 1:10 und 1:50 Verdünnungen erfolgte. Für die Bestimmung der Konzentration wurde der DC™ Protein Assay (BioRad) verwendet. Zu 1 ml der darin enthaltenen Reagenz A wurden 20 µl der Reagenz S gegeben und gemischt. Von dieser Lösung wurden 25 µl/Well vorgelegt und je 5 µl verdünnte Probe oder Standard dazugegeben. Als Blank-Wert diente PBS. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 200 µl/Well Reagenz B ausgelöst und war nach einer anschließenden 15-minütigen Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur abgeschlossen. Anschließend erfolgte die photometrische Messung bei 750 nm.

### 2.6.7 Vorbereitung der Proteine für den Western Blot

Für die Verwendung im Western Blot wurden die Proben 1:4 mit Lämmli-Puffer, bestehend aus 4-fach Lämmli 1:10 versetzt mit  $\beta$ -Mercaptoethanol, verdünnt. Um vergleichbare Banden zu erzielen, wurden die Proben des Lungenhomogenats zusätzlich dazu auf eine Endkonzentration von 50 µg/10 µl mit RIPA-Puffer verdünnt. Die Proteine der Zellkulturversuche wurden nicht zusätzlich verdünnt, sondern das gesamte Probenvolumen eingesetzt, wodurch eine Konzentration von 25-30 µg/30 µl erreicht werden konnte. Die so präparierten Proben wurden gründlich gemischt und für 10 min bei 99 °C im Thermoschüttler gekocht. Danach waren sie für den Einsatz im Western Blot bereit.

### 2.6.8 Herstellung des Gels für den Western Blot

Die Gele wurden für jeden Western Blot in der folgenden Zusammensetzung neu hergestellt.

	Trenngel:	10 % Gel	Sammelgel:
	<u>8 % Gel</u>	<u>10 % Gel</u>	
H <sub>2</sub> O	8,025 ml	7,275 ml	3,639 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	1,5 ml
Acrylamid 40 %	3 ml	3,7 ml	0,801 ml
SDS 10 %	150 µl	150 µl	60 µl
APS 10 %	75 µl	75 µl	60 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl

Als erstes wurden zwei Glasplatten mit 1 mm Abstand in eine Halterung eingespannt und nach unten hin abgedichtet, sodass das Gel zwischen den beiden Platten gegossen werden konnte.

Für das Trenngel wurden zunächst alle Inhaltsstoffe abgesehen vom TEMED in einem 50 ml Falcon Gefäß vermischt, dann unter dem Abzug das TEMED hinzugegeben und die Lösung noch einmal gründlich gemischt. Mit einer 1000 µl Pipette wurde daraufhin das Trenngel in den Hohlraum zwischen den beiden Glasplatten pipettiert bis ca. 1,5 cm unter den Rand. Um eine glatte Grenzfläche zu erzeugen und Luftblasen zu entfernen, wurde der Rest des Volumens mit Isopropanol aufgefüllt. Nachdem das Trenngel fest geworden war, wurde das Isopropanol entfernt. Im Anschluss daran wurde das Sammelgel angesetzt, wobei das TEMED wieder als letztes unter dem Abzug dazu gegeben wurde. Das Sammelgel wurde ebenfalls mit einer 1000 µl Pipette in den verbleibenden Raum zwischen den beiden Glasplatten gegeben und ein Kamm zur Bildung von 10 Probestaschen eingesetzt solange das Gel noch flüssig war. Sobald sich auch das Sammelgel verfestigt hatte, wurde das Gel mit den Glasplatten aus der Halterung entfernt, zur Lagerung in mit Laufpuffer befeuchtete Tücher eingeschlagen und in einer Plastiktüte luftdicht bei 4 °C für maximal 1 Monat gelagert.

### 2.6.9 Durchführung des Western Blots

Als erstes wurden das vorbereitete Gel auf der einen Seite und ein Platzhalter auf der anderen Seite in die Halterung der Western Blot Kammer eingespannt. In den Raum zwischen Gel und Platzhalter, wie auch in die Kammer entsprechend der Markierungen, wurde einfacher Laufpuffer eingefüllt. Die bereits vorbereiteten Proben wurden auf Eis aufgetaut und vor der Verwendung noch einmal gemischt. Nun wurde der Kamm aus dem Gel entfernt und die Proben in die Taschen aufgetragen. In die erste Tasche wurden dabei immer 3,5 µl des Markers für die Differenzierung der Größe des Zielproteins gegeben (Kaleidoskop, Bio-Rad). Von den Proben aus den Zellkulturversuchen wurden 25 – 30 µl eingesetzt und vom Lungenhomogenat je 50 µg/10 µl. Sobald alle Taschen belegt waren, wurde die Kammer mit dem Deckel verschlossen und mit dem Strom verbunden. Die ersten 30 min des Gel-Laufs erfolgten bei 100 V bis sich der Marker und alle Proben im Sammelgel befanden. Für die restlichen durchschnittlich 90 min wurde auf 120 V erhöht und der Lauf gestoppt, wenn die ersten Proben das Ende des Gels erreichten.

Das Blotten wurde semi-dry mithilfe der Transferkammer Trans-Blot SD (Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) durchgeführt. Dafür wurde als erstes eine Nitrocellulosemembran für 5 min in *A. dest.* aktiviert und danach für weitere 5 min in einfachem Transferpuffer, versetzt mit 20 % Methanol, equilibriert. Zusätzlich wurde auch dickes und dünnes Filterpapier im Transferpuffer inkubiert. Nach dieser Vorbereitung wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst und das Trenngel vom Sammelgel getrennt, wobei letzteres verworfen wurde. In der

Transferkammer wurden die einzelnen Bestandteile luftfrei in der folgenden Reihenfolge aufeinandergeschichtet: dickes Filterpapier – dünnes Filterpapier – Nitrocellulosemembran – Gel – dünnes Filterpapier – dickes Filterpapier. Zuletzt wurde der Aufbau noch einmal mit Transferpuffer befeuchtet und die Transferkammer geschlossen. Das Blotten erfolgte für 1 h bei 0,07 A für ein Gel oder im Falle von zwei Gelen bei 0,15 A.

Als Qualitätskontrolle wurde nach dem Blotten eine Proteinfärbung mit Ponceau durchgeführt. Dazu wurde die Membran in ein mit 5 ml Ponceau-Färbung vorbereitetes lichtundurchlässiges Kästchen überführt und für 5 min bei RT auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Danach wurde die Färbelösung zurück in die Flasche pipettiert und die Membran mehrmals mit *A. dest.* gespült bis sich keine rote Farbe mehr aus ihr lösen ließ. Das Ergebnis wurde zur Dokumentation eingescannt und die Membran dafür zwischen zwei Folien gelegt. Wenn erforderlich konnte die Membran nun geschnitten werden. Danach wurde die Proteinfärbung zunächst mit *A. dest.* für 5 min und dann noch ein- bis zweimal mit PBS mit 0,05 % Tween herausgewaschen, bis keine rote Färbung mehr zu sehen war.

Zur Blockade von unspezifischen Bindungen wurde die Membran mit 5 ml Odyssey Buffer, 1:2 mit PBS verdünnt, für 1 h bei RT auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit verworfen und der Primärantikörper (pAK) in entsprechender Verdünnung mit Odyssey Buffer in einem Gesamtvolumen von 5 ml aufgetragen. Für die ersten 15 min der Inkubation wurde das Kästchen mit der Membran bei RT auf dem Orbitalschüttler geschwenkt. Die restliche Bindung der Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Nach dieser Inkubation wurde der pAK zurück in seinen Behälter pipettiert, da abhängig vom Antikörper eine mehrfache Verwendung von 3 bis 5 Mal möglich war. Die Membran wurde dreimal mit PBS + 0,05 % Tween für 10 min bei RT auf dem Orbitalschüttler gewaschen. Der fluoreszierende Sekundärantikörper (sAK) wurde entsprechend seiner Farbe und dem Ursprung des pAK ausgewählt und nach Herstellerangaben mit Odyssey Buffer verdünnt. Vom sAK wurde daraufhin ebenfalls ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgetragen und die Membran für 1 h bei RT auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Auch der sAK wurde nach der Verwendung wieder in seinen Behälter zurückpipettiert und konnte bis zu fünfmal wiederverwendet werden. Wie zuvor schon beschrieben, wurde die Membran danach dreimal mit PBS + 0,05 % Tween gewaschen.

Die Entwicklung wurde mit einem Fluoreszenz-Bildgebungssystem (Li-Cor, Odyssey) mit dem Programm Image Studio (LiCor) durchgeführt. Danach wurde die Membran für die weitere Verwendung bei 4 °C in PBS + 0,05 % Tween gelagert.

Um weitere Zielproteine färben zu können wurde die Membran nach dem ersten Färben mit 5 ml Stripping Buffer für 30 min bei RT auf dem Orbitalschüttler gestrippt und so die erfolgten Antikörperbindungen wieder gelöst. Auf das Strippen folgten erneut drei Waschschrte mit PBS + 0,05 % Tween. Danach konnte die Membran entsprechend der zuvor beschriebenen Schritte erneut geblockt und ein neues Zielprotein mit einem anderen pAK markiert werden.

Die Auswertung der Western Blots wurde ebenfalls mit dem Programm Image Studio in Form einer Densitometrie durchgeführt. Als Maß für die eingesetzte Proteinmenge wurde Actin als kaum reguliertes Kontrollprotein verwendet und so das Verhältnis des Zielproteins zum Referenzprotein ermittelt.

### 2.6.9.1 Western Blot Tie2 / phospho Tie2 und Actin

Für die Detektion des Tie2-Rezeptors wurde ein 8 % Trenngel verwendet, da dieses geeigneter ist, um große Proteine aufzutrennen. Der phosphorylierte Tie2-Rezeptor lag bei 125 kDa und die nicht phosphorylierte Form bei 150 kDa. Zur Bestimmung der optimalen Antikörper Konzentrationen wurden zunächst Western Blots mit Proben aus den Zellkulturversuchen durchgeführt. Daraus ergaben sich die in Tabelle 2.14 aufgeführten Verdünnungen. Die Membran wurde oberhalb der 50 kDa Bande geschnitten, sodass gleichzeitig phospho Tie2 (pTie2) bzw. Tie2 und Actin gefärbt werden konnten und die Membran nur einmal gestrippt werden musste. Für die Western Blots mit Lungenhomogenat wurden die in der Zellkultur etablierten Antikörperkonzentrationen verwendet.

**Tabelle 2.14 Primär- und Sekundärantikörper mit Verdünnungen und Konzentrationen für den Western Blot für Tie2, pTie2 und Actin**

pAK		sAK	
	Verdünnung		Verdünnung
pTie2 (Y992) rabbit- anti-mouse	1:400 (0,5 µg / ml)	Goat-anti-rabbit IRDye 800	1:2000 (0,1 µg/ml)
Tie2 goat-anti-mouse	1:1000 (0,2 µg / ml)	Donkey-anti-goat IRDye 700	1:8000 (0,1 µg/ml)
Actin polyclonal-goat- anti-mouse	1:1000 (0,1 µg/ml)	Donkey-anti-goat IRDye 800	1:2000 (0,1 µg/ml)

### 2.6.9.2 Western Blot p38/phospho p38 und Actin

Für die Detektion von p38 wurde ein 10 % Gel verwendet, das besser für die Auftrennung kleinerer Proteine, wie (phospho-)p38 mit 40 kDa geeignet ist. Der Western Blot wurde nur mit Proben des Lungenhomogenats durchgeführt, da bereits ein etabliertes Protokoll existierte. Da Actin mit ca 45 kDa nur geringfügig größer als (p)p38 ist, konnte die Membran nicht geschnitten werden und musste so zweimal gestrippt werden, um alle drei Zielproteine färben zu können. Die eingesetzten Antikörperkonzentrationen sind in Tabelle 2.15 dargestellt.

**Tabelle 2.15 Primär- und Sekundärantikörper mit Verdünnungen und Konzentrationen für den Western Blot für p38, pp38 und Actin**

pAK		sAK	
	Verdünnung		Verdünnung
phospho-p38 (pp38) rabbit-anti-mouse	1:1000 (0,033 µg/ml)	Goat-anti-rabbit IRDye 800	1:2000 (0,1 µg/ml)
p38 rabbit-anti-mouse	1:1000 (0,023 µg/ml)	Goat-anti-rabbit IRDye 700	1:8000 (0,1 µg/ml)
Actin polyclonal-goat- anti-mouse	1:1000 (0,1 µg/ml)	Donkey-anti-goat IRDye 800	1:2000 (0,1 µg/ml)

## 2.7 Histologie Präparation

Die histologischen Analysen wurden auf die infizierten und beatmeten Gruppen beschränkt, die entweder keine Therapie, nur Ampicillin oder Ampicillin mit VT erhielten. Der Versuchsverlauf wich nicht von dem in Kapitel 2.4 beschriebenen Vorgehen ab. Lediglich beim 2. VT/LM-Bolus wurde die Substanz nicht mit HSA, sondern mit 0,9 %iger NaCl-Lösung versetzt, da in diesen Versuchen die Lunge nicht lavagiert wurde und dementsprechend das HSA nicht erforderlich war.

Die finale Blutentnahme erfolgte ebenfalls über den Carotiskatheter. Danach wurde eine neue Ligatur um die Trachea gelegt, um sie nach Beendigung der Beatmung unterhalb der Trachealkanüle abzubinden. So sollte dem Kollaps der Lunge bei Eröffnung des Thorax entgegen gewirkt werden.

Nun wurde zunächst der Thorax eröffnet und der Thymus abpräpariert, danach das Herz basisnah abgesetzt und die Lunge beginnend von der Trachea aus entnommen. Im Anschluss

daran wurden auch die Bauchorgane Leber, Milz, die Nieren und der Darm mit Magen und Pancreas entnommen. Zuletzt wurde das Gehirn aus dem Schädel herausgelöst. Alle Organe wurden in Histologie Kassetten gelegt und in 4 %igem Formaldehyd für 24-48 h fixiert. Zur Analyse wurden die Proben ins Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin geschickt. Dort wurden von Frau Dr. Olivia Kershaw Schnitte der Organe angefertigt, diese HE-gefärbt und auf den pathologischen Schädigungsscore für ARDS und Hinweise auf ein Multiorganversagen hin untersucht.

Von dem entnommenen Blut wurden ebenfalls CFUs ausplattiert und eine Zellzahl Bestimmung mit dem ScilVet durchgeführt. Das Plasma und der im Versuchsverlauf gewonnene Urin wurden für spätere Analysen bei -80 °C gelagert. Die Plasmaproben wurden ebenfalls für die Quantifizierung der Surrogatparameter des MOV vom externen Labor LaboKlin untersucht.

## 2.8 Versuchsgruppen

Für die Versuche zur Analyse der pulmonalen Permeabilität, der lokalen und systemischen Immunantwort, der bakteriellen Last, des MOV, sowie der Expression des Tie2-Rezeptors und der nachgeschalteten Signalwege wurden die Tiere in die folgenden Versuchsgruppen eingeteilt:

**Tabelle 2.16 Versuchsgruppen zur Bestimmung der pulmonalen Permeabilität**

<b>Infektion</b>	<b>i.p. Injektion</b>	<b>i.v. Injektion</b>	<b>Beatmung</b>	<b>Anzahl</b>
<i>S. pn.</i>	NaCl	PBS	MV	N=9
<i>S. pn.</i>	NaCl	VT	MV	N=8
<i>S. pn.</i>	Ampicillin	PBS	MV	N=8
<i>S. pn.</i>	Ampicillin	VT	MV	N=8
PBS	NaCl	PBS	MV	N=8
PBS	NaCl	VT	MV	N=8
PBS	NaCl	PBS	Nicht ventiliert	N=4

Für die histologische Beurteilung wurden zusätzliche Versuche mit den folgenden Gruppen durchgeführt.

**Tabelle 2.17 Versuchsgruppen für die histopathologische Analyse**

<b>Infektion</b>	<b>i.p. Injektion</b>	<b>i.v. Injektion</b>	<b>Beatmung</b>	<b>Anzahl</b>
<i>S. pn.</i>	NaCl	PBS	MV	N=4
<i>S. pn.</i>	Ampicillin	PBS	MV	N=4
<i>S. pn.</i>	Ampicillin	VT	MV	N=4

Als methodische Kontrolle wurden außerdem die folgenden nicht beatmeten Versuchsgruppen mitgeführt.

**Tabelle 2.18 Kontrollgruppen**

<b>Infektion</b>	<b>i.p. Injektion</b>	<b>i.v. Injektion</b>	<b>Beatmung</b>	<b>Anzahl</b>
<i>S. pn.</i>	NaCl	PBS	keine	N=8
<i>S. pn.</i>	NaCl	VT	keine	N=8
<i>S. pn.</i>	Ampicillin	PBS	keine	N=8
<i>S. pn.</i>	Ampicillin	VT	Keine	N=8

## 2.9 Statistik

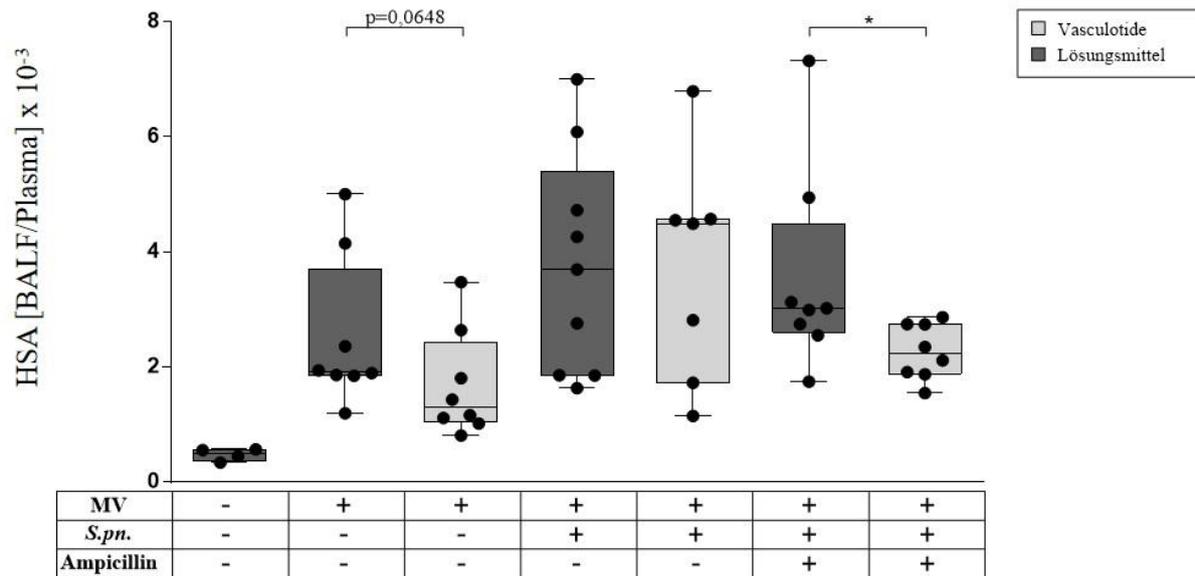
Für die statistische Auswertung und die Gestaltung der Abbildungen wurde die Software GraphPad Prism 6 verwendet. Die Ergebnisse wurden als Median und Interquartilen Abstand (Interquartile Range, IQR) mit den jeweiligen Minimal- und Maximalwerten dargestellt. Zum Vergleich zweier Gruppen erfolgte ein Mann-Whitney-U-Test. Da ausschließlich die direkt miteinander vergleichbaren Versuchsgruppen auf den Effekt der VT Therapie hin getestet werden sollten, handelte es sich um geplante Vergleiche. Aus diesem Grund wurde auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet. Eine diesbezügliche statistische Beratung am Institut für Biometrie der Charité – Universitätsmedizin Berlin wurde in Anspruch genommen. Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert < 0,05 angenommen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vasculotide reduzierte die durch Pneumonie und maschinelle Beatmung induzierte vaskuläre Hyperpermeabilität

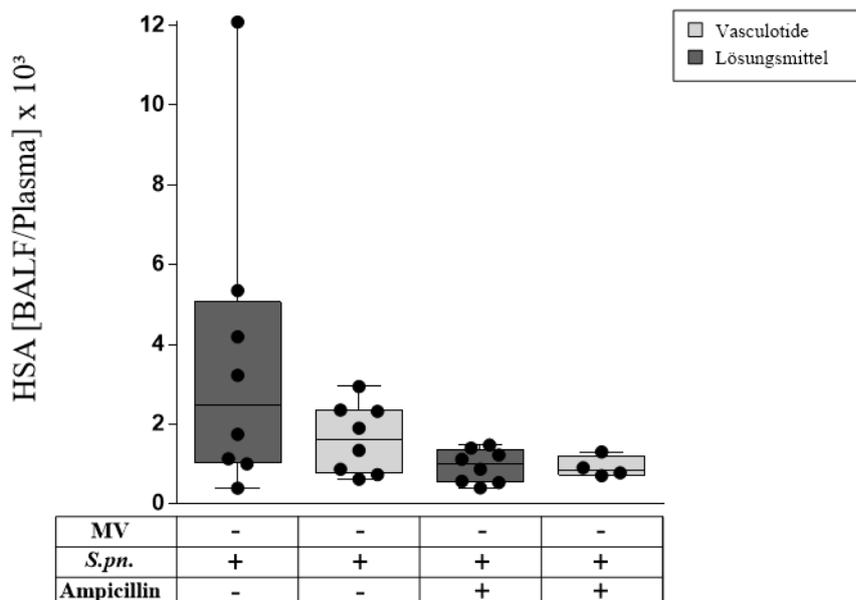
Die Quantifizierung der vaskulären Hyperpermeabilität erfolgte durch den BALF/Plasma Quotienten 30 h p.i., der mit den im HSA-ELISA ermittelten Werten berechnet wurde. Dieser diente als Maßstab für die Permeabilität der alveolokapillären Barriere, die unter physiologischen Bedingungen den Übertritt von Proteinen und Zellen in den Alveolarraum verhindert. Die gemessenen Werte sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Als Referenzbereich wurden die Werte der nicht infizierten, nicht beatmeten Tiere, die auch keine Therapie erhielten, verwendet (im Folgenden als Kontrollgruppe bezeichnet). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die beatmeten nicht infizierten Tiere bereits einen deutlichen Anstieg in der Permeabilität für HSA, was auf eine beatmungsinduzierte Störung der Blut-Luft-Schranke schließen ließ. Die Therapie mit VT zeigte einen Trend zur Reduktion der Hyperpermeabilität, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte.

Die sowohl mit Pneumokokken infizierten als auch 6h beatmeten Tiere wiesen eine höhere vaskuläre Permeabilität und somit eine stärkere Barrierestörung auf als die nur beatmeten Tiere. Die alleinige Therapie mit VT führte hier zu keiner Besserung im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Tieren. In Kombination mit einer antibiotischen Therapie durch Ampicillin konnte für VT eine statistisch signifikante Reduktion der pulmonalen Permeabilität nachgewiesen werden. Als Vergleichsgruppe dienten hier nur mit Ampicillin behandelte Tiere, die keinen Anhalt für eine Minderung der Barrierestörung zeigten.



**Abbildung 3.1 Pulmonale Permeabilität 30 h p.i.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Als Maß für die Permeabilität wurde das BALF/Plasma-Verhältnis für HSA kalkuliert. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restliche Gruppen n=7-9; \*p<0,05, Mann-Whitney-U-Test).

In den nicht beatmeten Kontrollgruppen (Abbildung 3.2), die als methodische Kontrollen mitgeführt wurden, zeigten die unbehandelten infizierten Tiere ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Permeabilität. Sowohl die Therapie mit VT als auch die Therapie mit Ampicillin konnte den Übertritt von HSA fast auf das Niveau der Kontrollgruppe reduzieren. Hier konnte kein zusätzlicher positiver Effekt der Kombinationstherapie festgestellt werden. Die Reduktion der Permeabilität durch die Monotherapie mit VT erreichte aufgrund der hohen Streuung der infizierten Vergleichsgruppe keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 3.2 Pulmonale Permeabilität der nicht-ventilierten Kontrollgruppen 30h p.i.** 30 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann die Präparation. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 28,5 h p.i. in eine der lateralen Schwanzvenen injiziert. Als Maß für die Permeabilität wurde das BALF/Plasma-Verhältnis für HSA kalkuliert. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (n=4-8, Mann-Whitney-U-Test)

### 3.2 Vasculotide hatte keinen Einfluss auf die klinischen Parameter im Modell des Beatmungsassozierten Lungenschadens bei Pneumonie

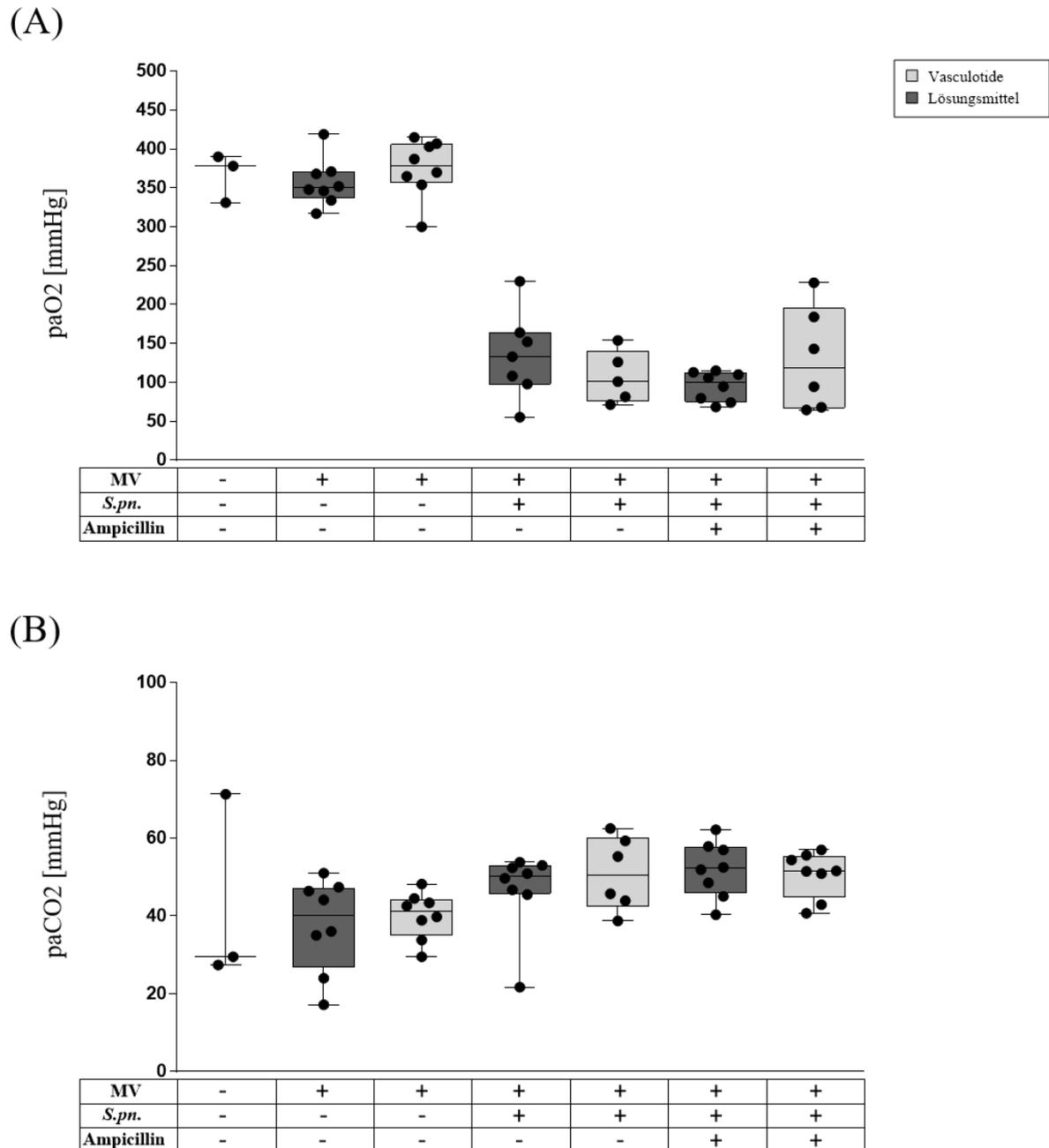
Zur klinischen Überwachung der Tiere wurden Blutdruck, Puls (Herzfrequenz, HF), Sauerstoffsättigung ( $\text{SaO}_2$ ) und der positive inspiratorische Druck (positive inspiratory pressure, PIP) während der Beatmungsphase überwacht und dokumentiert. Diese Parameter sind in Tabelle 3.1 jeweils mit Anfangs- und Endwert der Beatmungsphase aufgeführt. Der PIP entsprach dem Druck, der zum Erreichen des vorgegebenen Tidalvolumens bei der Beatmung aufgewendet werden musste. Je mehr Lungengewebe durch Atelektasen und Infiltrate geschädigt ist, desto höher ist der benötigte inspiratorische Druck und bei steigender Differenz zwischen PIP und PEEP wird der pulmonale Beatmungsschaden größer. Somit kann der PIP indirekt als klinischer Verlaufparameter für einen VILI verwendet werden. In allen Versuchsgruppen ist der PIP im Verlauf der Beatmung angestiegen, bei den infizierten Tieren erwartungsgemäß stärker als bei den scheininfizierten. Ein Effekt von VT konnte nicht nachgewiesen werden. Die Kurvenverläufe ließen auch hier einen möglichen Trend zur Besserung unter VT-Therapie erkennen, dieser erreicht jedoch weder statistische noch klinische Relevanz. Weder Blutdruck, Puls und Sauerstoffsättigung, noch die in der BGA gemessenen Parameter zeigten einen Effekt der VT Therapie, sondern lediglich die bereits bekannten Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten bzw. beatmeten und nicht beatmeten Tieren. Die entsprechenden Daten sind den Abbildungen 3.3 bis 3.7 zu entnehmen.

Tabelle 3.1 Klinisches Monitoring im Verlauf der 6 h Beatmung

	Blutdruck (mmHg)		HF (bpm)		SaO <sub>2</sub> (%)		PIP (cmH <sub>2</sub> O)	
	Start	Ende	Start	Ende	Start	Ende	Start	Ende
MV	71,1	53,1	259	245	98,6	96,0	12,0	21,3
	65,5	51,0	335	195	98,8	97,1	12,6	20,8
	81,6	78,5	272	247	97,6	97,2	11,4	19,4
	80,2	89,3	262	205	98,0	98,2	13,2	20,3
	79,8	84,5	199	209	98,0	96,5	13,8	21,4
	80,7	51,0	264	156	98,9	99,2	11,0	20,5
	86,3	59,5	268	181	96,9	99,1	12,7	22,3
	85,7	65,3	239	181	97,4	99,1	11,5	20,3
<b>Median</b>	<b>80,5</b>	<b>62,4</b>	<b>263</b>	<b>200</b>	<b>98,0</b>	<b>97,7</b>	<b>12,3</b>	<b>20,7</b>
<b>IQR</b>	<b>5,0</b>	<b>27,4</b>	<b>15</b>	<b>37</b>	<b>1,1</b>	<b>2,1</b>	<b>1,4</b>	<b>1,0</b>
MV	71,0	83,2	266	385	98,6	96,4	13,6	20,8
VT Therapie	87,8	83,0	323	253	98,7	96,9	10,3	17,5
	65,0	63,3	310	212	97,7	96,0	13,0	20,1
	94,1	85,1	479	240	98,7	96,9	11,8	20,3
	91,9	87,6	210	191	97,1	96,8	12,4	21,0
	85,0	54,2	266	131	98,1	98,4	13,5	20,3
	88,0	77,9	310	212	97,9	99,0	10,6	19,7
	48,3	44,7	258	179	98,8	98,4	11,4	21,5
<b>Median</b>	<b>86,4</b>	<b>80,5</b>	<b>288</b>	<b>212</b>	<b>98,4</b>	<b>96,9</b>	<b>12,1</b>	<b>20,3</b>
<b>IQR</b>	<b>19,5</b>	<b>22,7</b>	<b>49</b>	<b>55</b>	<b>0,9</b>	<b>1,7</b>	<b>1,9</b>	<b>0,9</b>
MV	97,9	106,3	293	237	95,8	88,5	11,1	18,2
<i>S. pn.</i> Infektion	66,4	35,6	363	367	98,4	93,5	16,3	22,5
	83,2	85,1	222	423	98,6	93,5	14,1	20,8
	79,1	87,4	152	286	97,5	94,4	13,3	20,4
	65,2	63,0	261	262	99,1	97,8	10,7	18,1
	71,0	87,4	181	306	94,3	93,4	13,4	20,3
	72,6	68,3	256	307	95,7	85,7	15,2	24,2
	85,5	92,3	300	218	96,7	92,7	14,3	21,7
	64,5	80,2	299	244	98,2	97,2	11,9	20,7
<b>Median</b>	<b>72,6</b>	<b>85,1</b>	<b>261</b>	<b>286</b>	<b>97,5</b>	<b>93,5</b>	<b>13,4</b>	<b>20,7</b>
<b>IQR</b>	<b>16,8</b>	<b>19,1</b>	<b>77</b>	<b>63</b>	<b>2,6</b>	<b>1,7</b>	<b>2,4</b>	<b>1,4</b>
MV	88,7	35,2	265	248	98,1	81,9	10,4	18,9
<i>S. pn.</i> Infektion	74,1	42,5	228	364	96,9	93,2	11,3	25,7
VT Therapie	58,5	37,2	228	286	98,8	96,2	11,3	18,6
	96,2	69,3	207	319	97,2	94,1	15,0	21,2
	76,6	74,2	251	220	96,8	91,8	13,8	21,0
	72,8	94,1	255	305	99,8	97,5	14,4	21,1

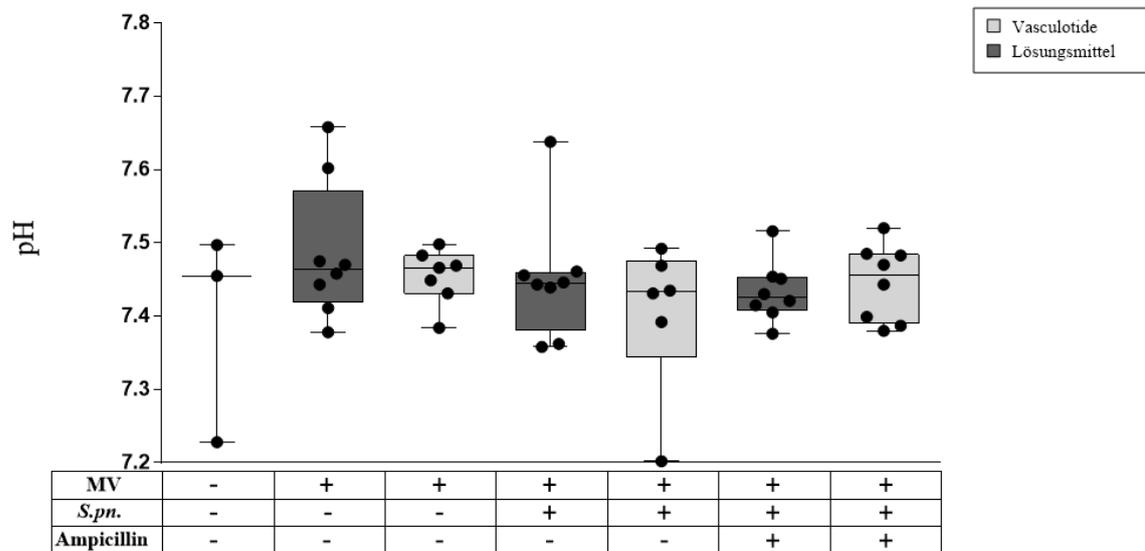
	Blutdruck (mmHg)		HF (bpm)		SaO <sub>2</sub> (%)		PIP (cmH <sub>2</sub> O)	
	Start	Ende	Start	Ende	Start	Ende	Start	Ende
<b>Median</b>	82,4	87,6	214	296	97,3	96,5	12,3	21,0
	94,2	88,5	214	360	98,3	99,2	11,4	18,8
	<b>79,5</b>	<b>71,8</b>	<b>228</b>	<b>301</b>	<b>97,7</b>	<b>95,2</b>	<b>11,9</b>	<b>21,0</b>
	<b>IQR</b>	<b>16,3</b>	<b>46,7</b>	<b>38</b>	<b>53</b>	<b>1,3</b>	<b>3,9</b>	<b>2,7</b>
MV	69,5	63,8	232	167	97,3	96,5	14,6	21,5
<i>S. pn.</i> Infektion	82,7	81,1	283	288	98,6	92,5	9,7	18,7
Ampicillin Therapie	36,8	70,3	210	246	97,8	90,1	14,7	22,5
	82,0	83,9	197	251	99,1	97,9	12,7	22,5
	75,3	94,0	211	218	96,2	96,1	13,8	21,4
	83,0	95,7	336	268	96,8	89,2	11,1	19,4
	72,1	61,1	223	199	97,8	93,4	13,1	22,1
	83,2	55,7	324	209	97,9	87,7	12,7	21,6
<b>Median</b>	<b>78,7</b>	<b>75,7</b>	<b>228</b>	<b>232</b>	<b>97,8</b>	<b>92,9</b>	<b>12,9</b>	<b>21,6</b>
<b>IQR</b>	<b>11,3</b>	<b>23,3</b>	<b>83</b>	<b>49</b>	<b>0,9</b>	<b>6,3</b>	<b>1,7</b>	<b>1,3</b>
MV	75,8	85,2	222	253	95,4	90,3	13,0	22,4
<i>S. pn.</i> Infektion	66,2	76,0	204	244	96,0	88,8	13,4	21,8
Ampicillin Therapie	69,1	114,2	305	258	97,3	97,7	10,6	19,9
VT Therapie	50,0	104,0	172	225	98,2	93,2	13,4	21,1
	84,8	99,5	288	279	98,0	93,2	12,0	21,1
	62,1	79,9	225	254	95,1	86,1	12,5	19,2
	72,9	65,9	279	180	99,4	97,4	11,1	18,9
	50,5	53,9	181	216	95,5	83,6	13,3	22,6
<b>Median</b>	<b>67,7</b>	<b>82,6</b>	<b>224</b>	<b>249</b>	<b>96,7</b>	<b>91,8</b>	<b>12,8</b>	<b>21,1</b>
<b>IQR</b>	<b>14,4</b>	<b>27,2</b>	<b>83</b>	<b>32</b>	<b>2,6</b>	<b>6,1</b>	<b>1,6</b>	<b>2,2</b>

24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Der Blutdruck wurde invasiv über einen Carotiskatheter gemessen, der pulmonale Spitzendruck mithilfe des Beatmungsgerätes über die einliegende Trachealkanüle, Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung wurden pulsoxymetrisch bestimmt. Angegeben sind die Einzewerte in den verschiedenen Gruppen. Median und IQR wurden auf die erste Dezimalstelle hinter dem Komma gerundet. Im Falle der Herzfrequenz wurden nur ganze Zahlen angegeben. Start = Beginn Beatmung, Ende = Ende Beatmung oder letzter messbarer Wert

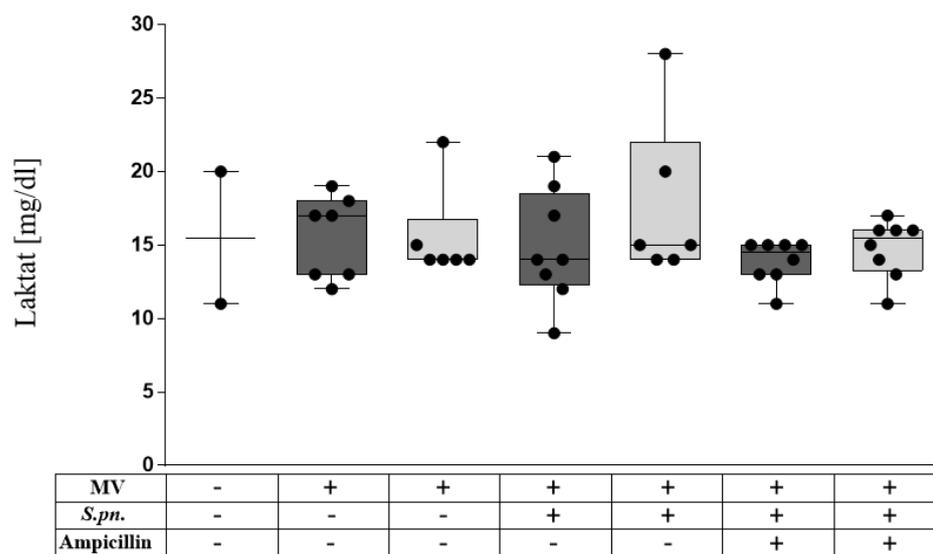


**Abbildung 3.3 Blutgasanalyse 30 h p.i.,  $paO_2$  und  $paCO_2$ .** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die BGA wurde unmittelbar nach der finalen Blutentnahme durchgeführt. (A) Sauerstoffpartialdruck ( $paO_2$ ) im Blut (B) Kohlenstoffdioxidpartialdruck ( $paCO_2$ ) im Blut. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (n=3-8, Mann-Whitney-U-Test)

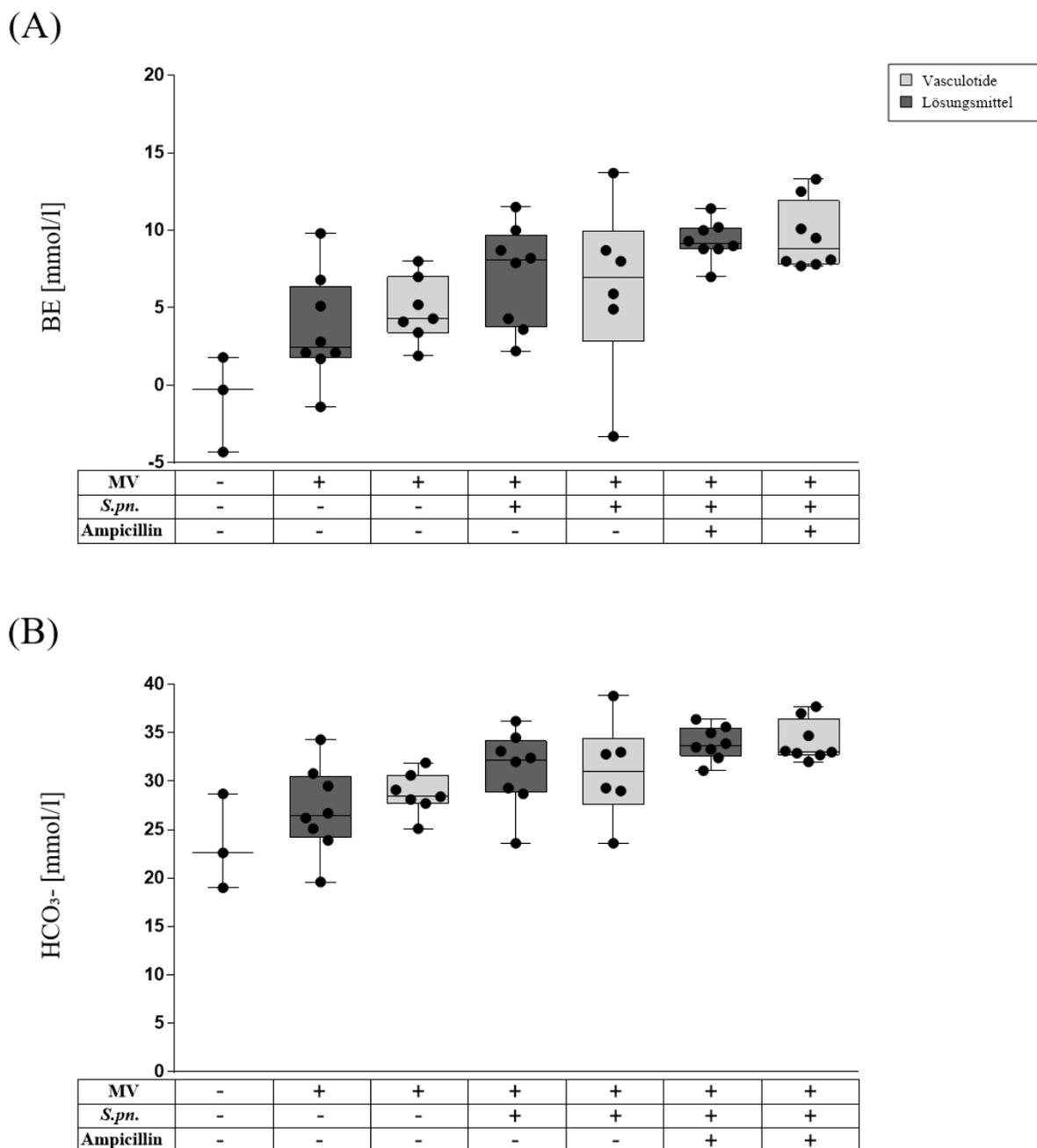
(A)



(B)

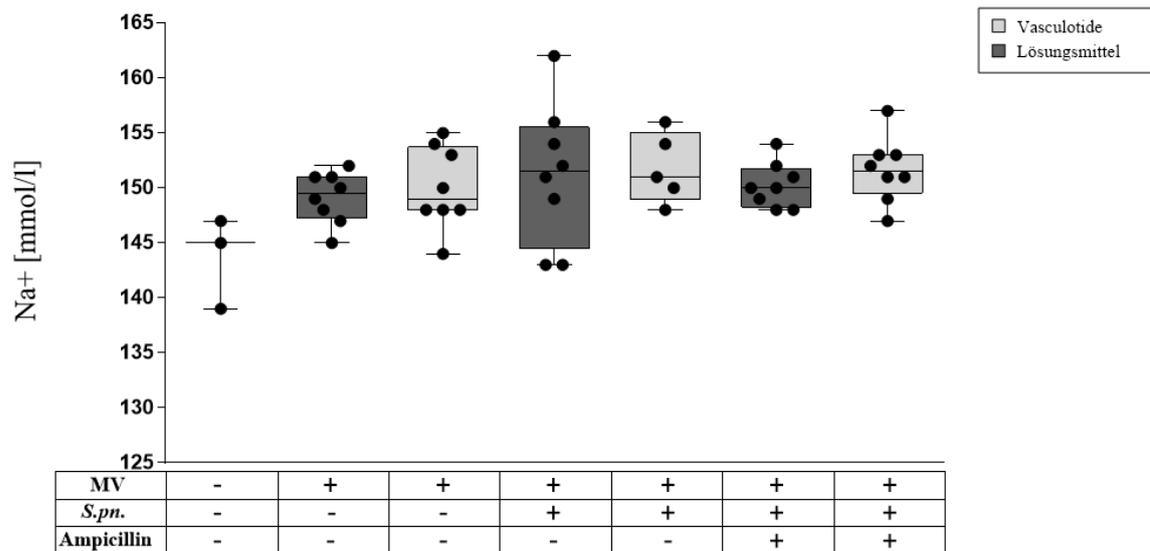


**Abbildung 3.4 Blutgasanalyse 30 h p.i. pH und Laktatkonzentration.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die BGA wurde unmittelbar nach der finalen Blutentnahme durchgeführt. (A) pH Wert im Blut, (B) Laktatkonzentration im Blut. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (n=3-8, Mann-Whitney-U-Test)

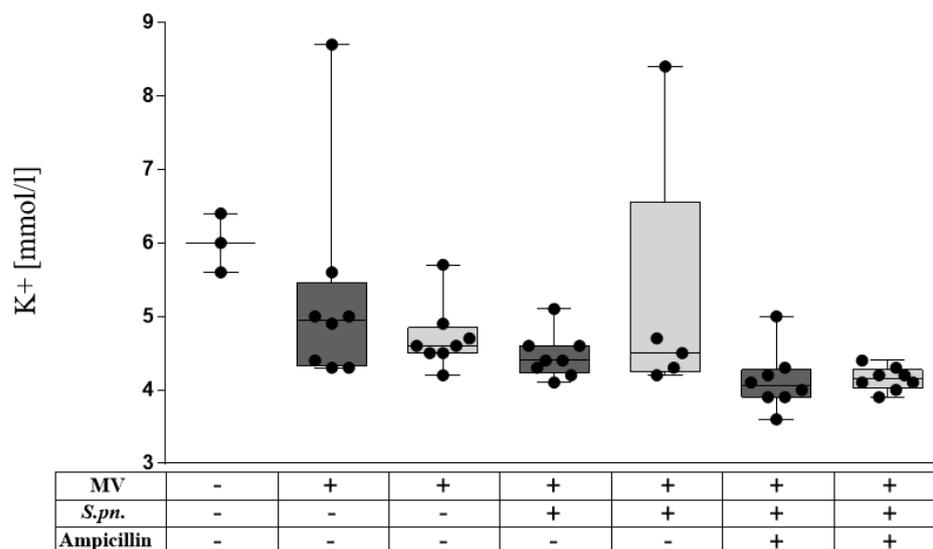


**Abbildung 3.5 Blutgasanalyse 30 h p.i., Base Excess und Standardbicarbonat.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die BGA wurde unmittelbar nach der finalen Blutentnahme durchgeführt. (A) Base Excess (BE) im Blut, (B) Standardbicarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) im Blut. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte ( $n=3-8$ , Mann-Whitney-U-Test)

(A)

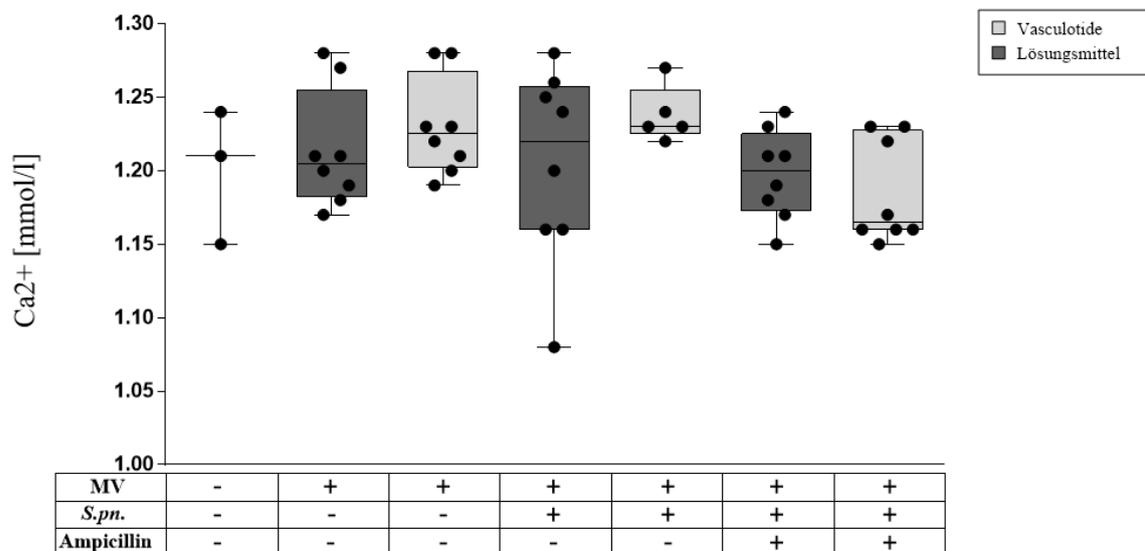


(B)

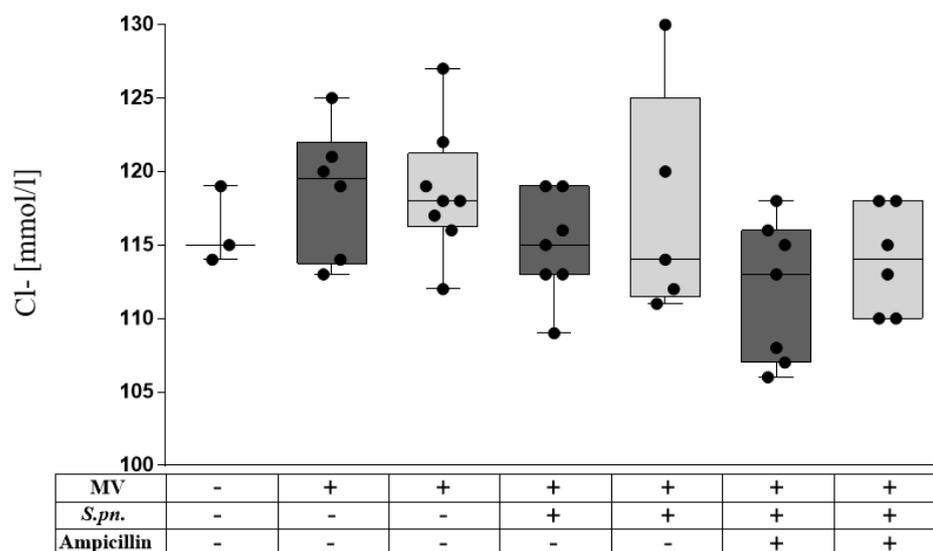


**Abbildung 3.6 Blutgasanalyse 30 h p.i. Natrium- und Kaliumkonzentration.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die BGA wurde unmittelbar nach der finalen Blutentnahme durchgeführt. (A) Natriumkonzentration (Na<sup>+</sup>) im Blut (B) Kaliumkonzentration (K<sup>+</sup>) im Blut. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (n=3-8, Mann-Whitney-U-Test)

(A)



(B)



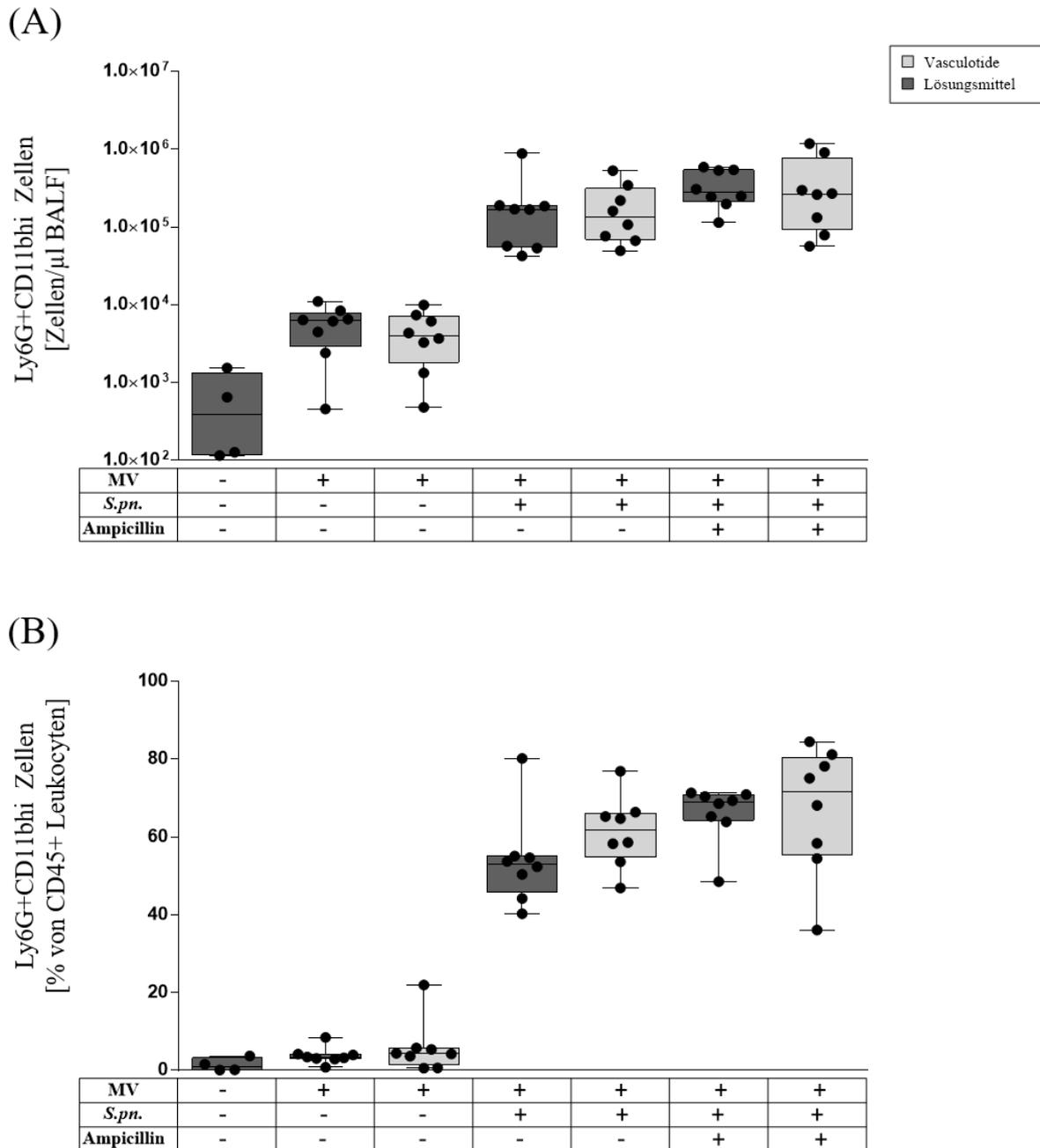
**Abbildung 3.7 Blutgasanalyse 30 h p.i., Kalzium- und Chloridkonzentration.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die BGA wurde unmittelbar nach der finalen Blutentnahme durchgeführt. (A) Kalziumkonzentration (Ca<sup>2+</sup>) im Blut, (B) Chloridkonzentration (Cl<sup>-</sup>) im Blut. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten., Einzelwerte als Punkte (n=3-8, Mann-Whitney-U-Test)

### 3.3 Die zelluläre pulmonale und systemische Immunreaktion wurde durch Vasculotide nicht beeinflusst

Um die lokale und die systemische Immunreaktion zu untersuchen wurden einerseits die Leukozyten in der BALF und der Lunge mittels FACS analysiert, als Maß für die Infiltration des Alveolarraums und Lungenparenchyms mit Entzündungszellen. Andererseits wurden die Leukozyten im Blut mithilfe eines Hämozytometers quantifiziert, um Rückschlüsse auf die systemische Entzündungsreaktion zu ziehen.

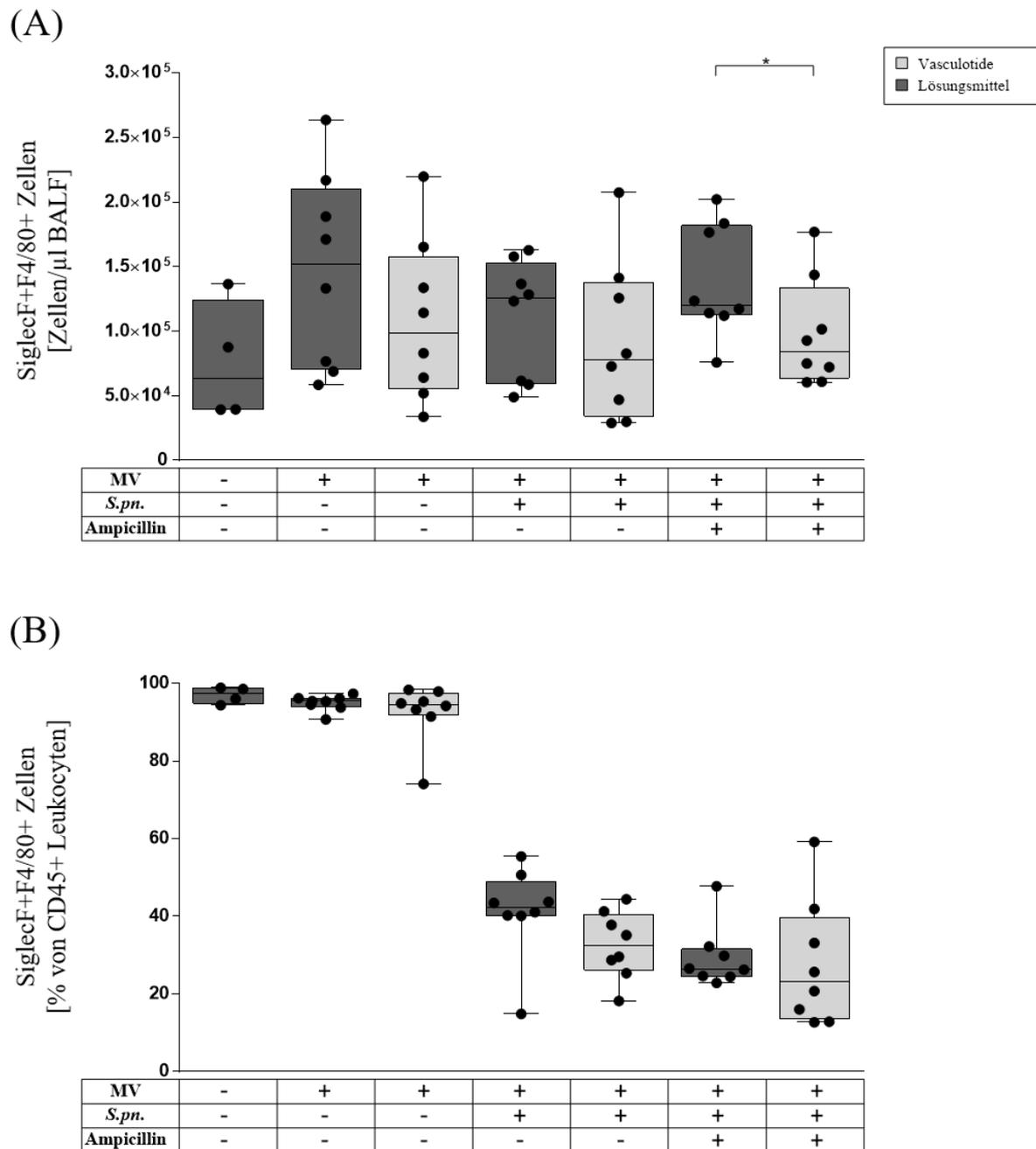
In der BALF (vgl. Abbildungen 3.8 - 3.10) konnte nachgewiesen werden, dass bei den nicht infizierten Tieren die Alveolarmakrophagen die Leukozytenpopulation dominierten. Die sterile Inflammation durch die maschinelle Beatmung führte lokal zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der Lunge, auch wenn die Alveolarmakrophagen weiterhin überwogen. Im Vergleich dazu stieg bei gleichzeitiger Infektion mit *S. pn.* der Anteil an neutrophilen Granulozyten über den der Alveolarmakrophagen, als Ausdruck einer starken Entzündungsreaktion. Diese Rekrutierung neutrophiler Granulozyten blieb von Ampicillin, VT oder der Kombination beider Medikamente unbeeinflusst. Auch die inflammatorischen Makrophagen zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen, sondern machten insgesamt nur einen sehr geringen Anteil an den Gesamtleukozyten aus.

Auch im Lungenparenchym (Abbildung 3.11 - 3.13) konnte kein immunmodulatorischer Effekt der unterschiedlichen Therapiestrategien festgestellt werden. Die Ergebnisse entsprachen demnach weitgehend denen der BALF. Die statistisch signifikante Reduktion im prozentualen Anteil der neutrophilen Granulozyten durch die VT Therapie in den beatmeten, nicht infizierten Gruppen zeigte sich nicht in den absoluten Zellzahlen und ist somit eher von untergeordneter klinischer Relevanz.

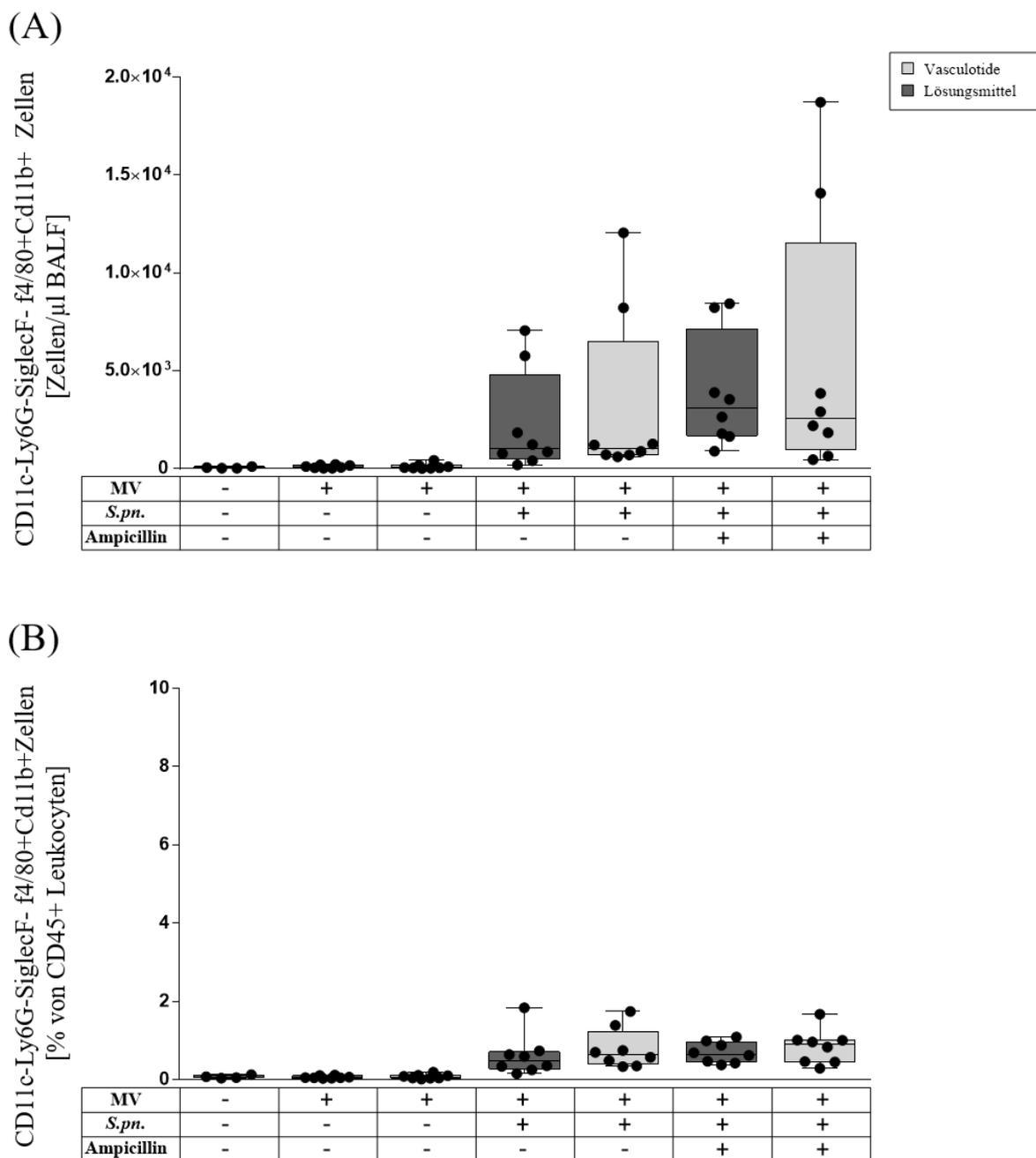


**Abbildung 3.8. Lokale zelluläre Immunantwort in der BALF 30 h p.i. Neutrophile Granulozyten.**

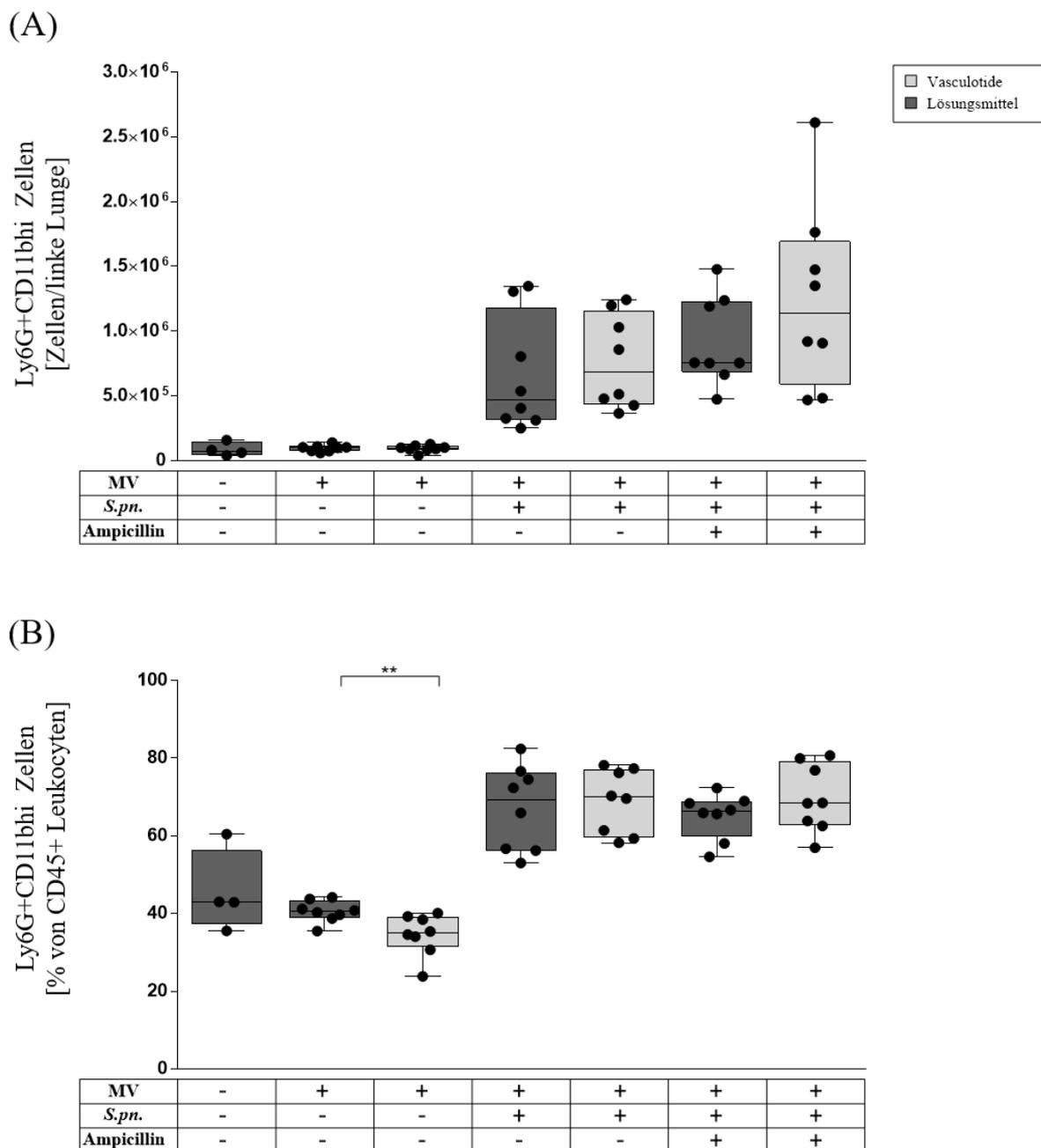
24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Zur Quantifizierung der Zellen im Alveolarraum wurde die Lunge 4x mit 400 µl PBS+Proteinaseinhibitor lavagiert. Die Oberflächenmarker der Leukozyten wurden mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und konnten mittels Durchflusszytometrie differenziert werden. (A) Neutrophile Granulozyten pro µl BALF, (B) Prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtleukozyten Zahl in der BALF. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test).



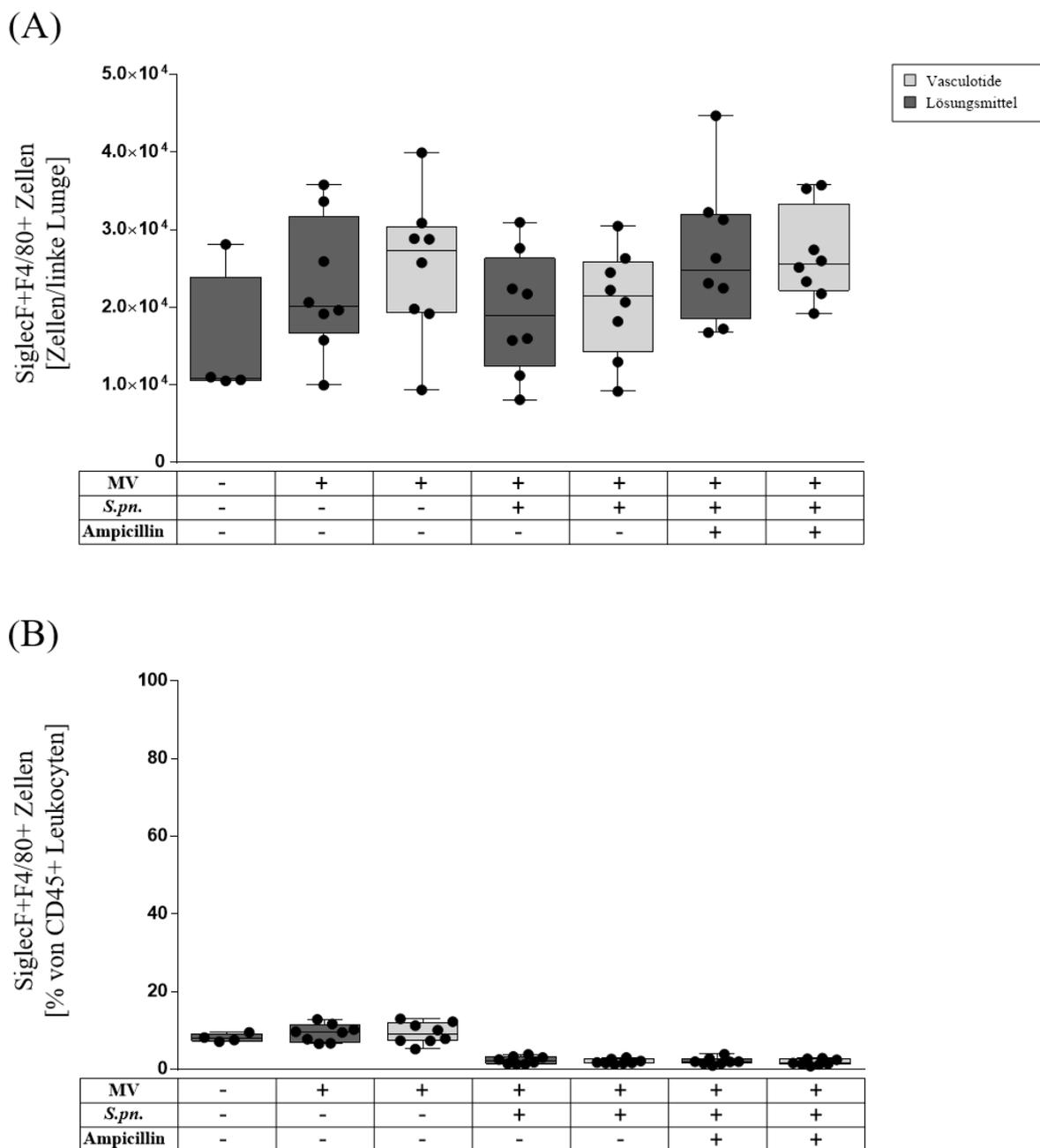
**Abbildung 3.9 Lokale zelluläre Immunantwort in der BALF 30 h p.i., Alveolarmakrophagen 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Zur Quantifizierung der Zellen im Alveolarraum wurde die Lunge 4x mit 400 µl PBS+Proteinaseinhibitor lavagiert. Die Leukozyten wurden über ihre Oberflächenmarker gefärbt und mittels Durchflusszytometrie differenziert. (A) Alveolarmakrophagen pro µl BALF, (B) Prozentualer Anteil der Alveolarmakrophagen an der Gesamtleukozyten Zahl in der BALF. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, \*p<0,05, Mann-Whitney-U-Test).**



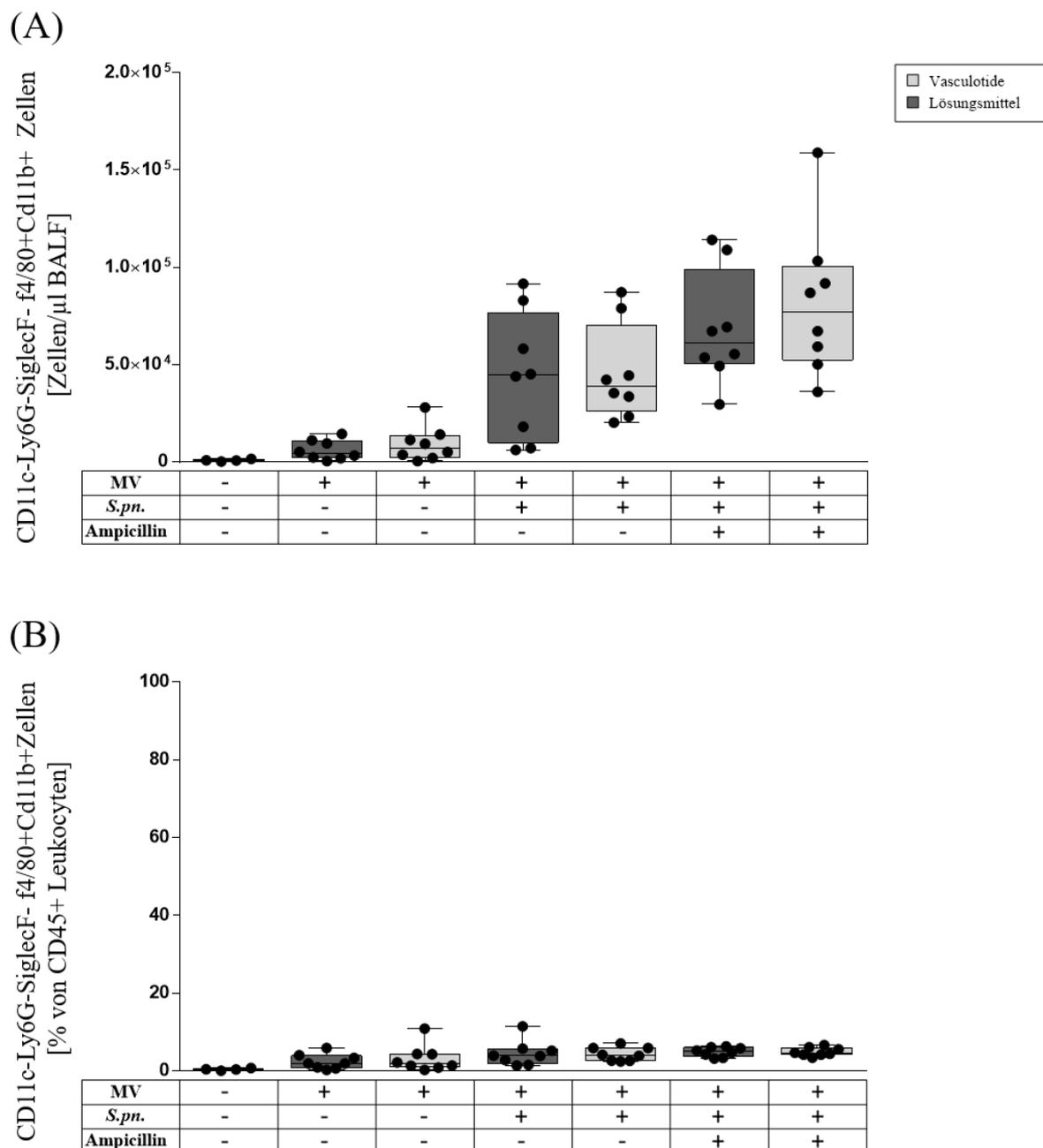
**Abbildung 3.10 Lokale zelluläre Immunantwort in der BALF 30 h p.i., inflammatorische Makrophagen.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Zur Quantifizierung der Zellen im Alveolarraum wurde die Lunge 4x mit 400 µl PBS+Proteinaseinhibitor lavagiert. Die Leukozyten wurden über ihre Oberflächenmarker gefärbt und mittels Durchflusszytometrie differenziert. (A) inflammatorische Makrophagen pro µl BALF, (B) Prozentualer Anteil der inflammatorischen Makrophagen an der Gesamtleukozyten Zahl in der BALF. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test).



**Abbildung 3.11 Lokale zelluläre Immunantwort im Lungenparenchym 30 h p.i., Neutrophile Granulozyten.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Das Lungenparenchym der linken nicht-lavagierten Lunge wurde homogenisiert, die Oberflächenmarker der Leukozyten mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie differenziert. (A) Neutrophile Granulozyten pro linke Lunge, (B) Prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtleukozyten Zahl in der linken Lunge. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, \*\*p<0,01, Mann-Whitney-U-Test).

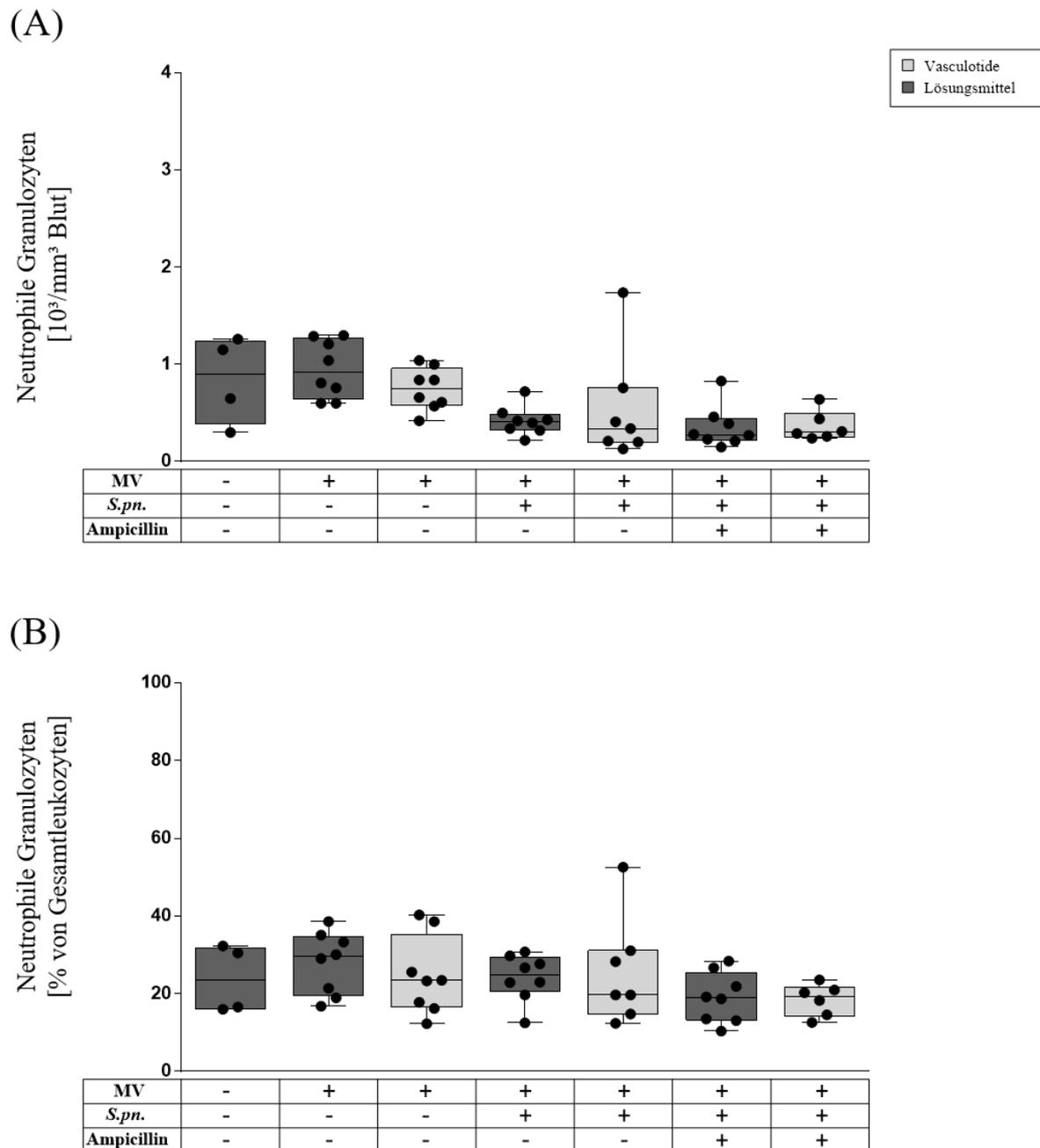


**Abbildung 3.12 Lokale zelluläre Immunantwort im Lungenparenchym 30 h p.i. Alveolarmakrophagen.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Das Lungenparenchym der linken nicht-lavagierten Lunge wurde homogenisiert, die Oberflächenmarker der Leukozyten mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie differenziert. (A) Alveolarmakrophagen pro linke Lunge, (B) Prozentualer Anteil der Alveolarmakrophagen an der Gesamtleukozyten Zahl in der Lunge. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test).



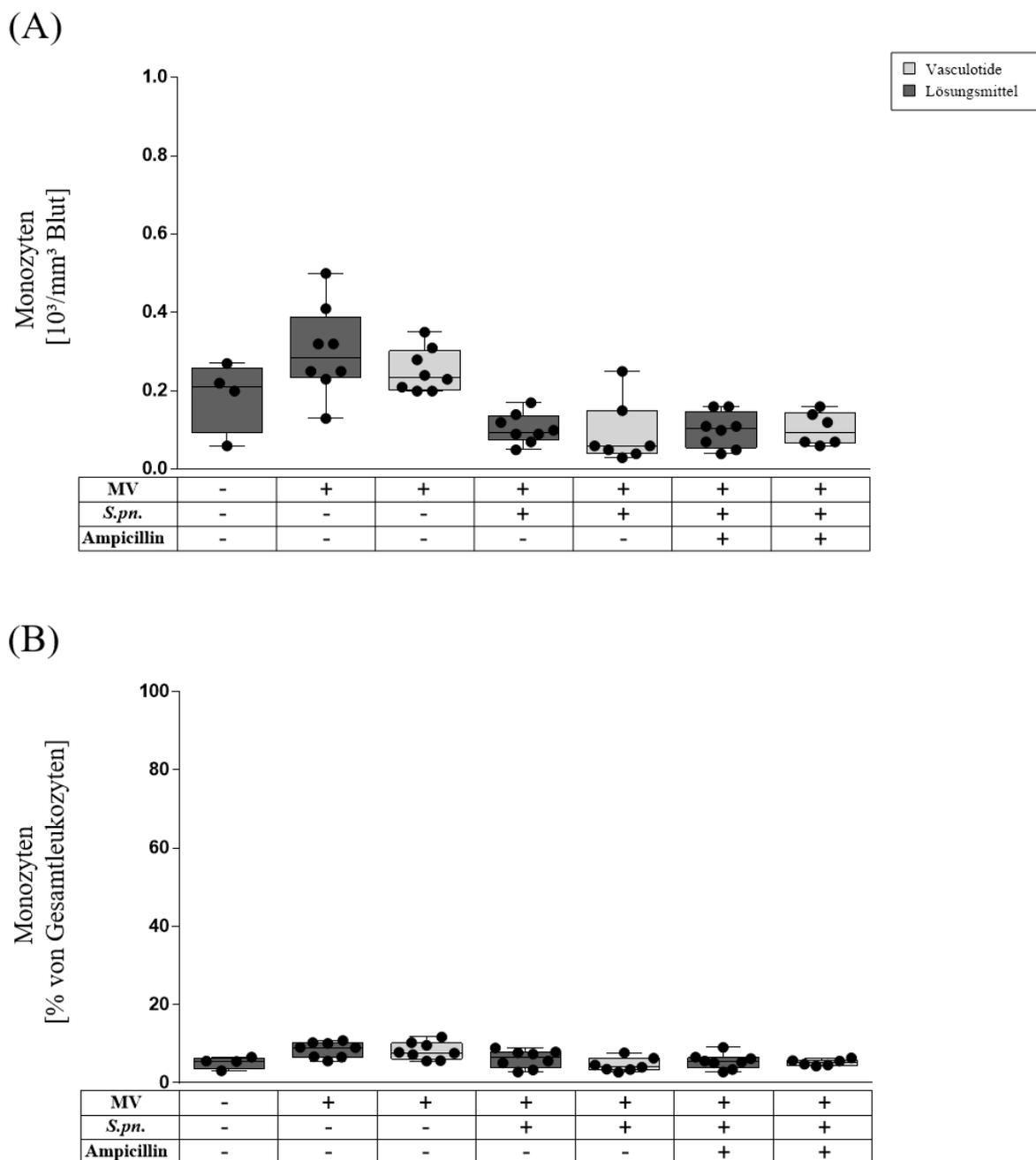
**Abbildung 3.13 Lokale zelluläre Immunantwort im Lungenparenchym 30 h p.i. inflammatorische Makrophagen.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Das Lungenparenchym der linken nicht-lavagierten Lunge wurde homogenisiert, die Oberflächenmarker der Leukozyten mit entsprechenden Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie differenziert. (A) Inflammatorische Makrophagen pro linke Lunge, (B) Prozentualer Anteil der inflammatorischen Makrophagen an der Gesamtleukozyten Zahl in der linken Lunge. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test).

Systemisch überwogen im Blut der gesunden Tiere die neutrophilen Granulozyten, wobei alleinige Beatmung keinen Einfluss auf die Leukozytenpopulationen im Blut zu haben schien. Im Vergleich dazu wiesen die infizierten und beatmeten Tiere eine Leukozytopenie auf, die durch eine absolute Reduktion aller drei untersuchten Zelltypen bedingt war. Dies kann am ehesten als Ausdruck des septischen Krankheitsverlaufs gewertet werden. Weder die einfache Therapie mit entweder VT oder Ampicillin, noch die Kombinationstherapie aus beiden Wirkstoffen, hatte einen Einfluss auf die gemessenen Leukozytenzahlen im Blut. Die Abbildungen 3.14 bis 3.16 visualisieren diese Ergebnisse.



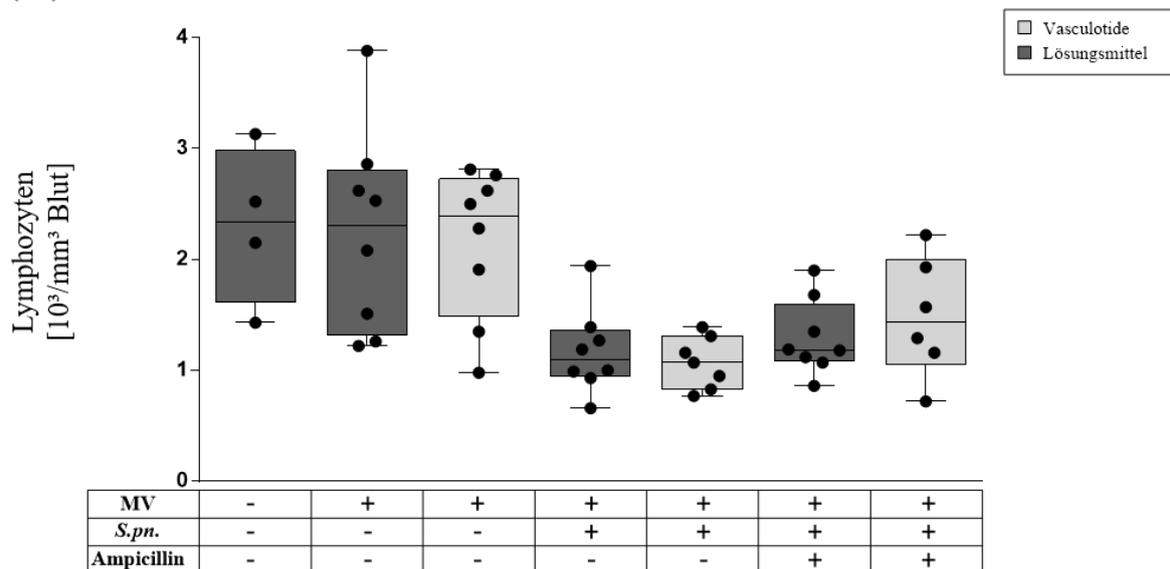
**Abbildung 3.14 Systemische zelluläre Immunantwort im Blut 30 h p.i., Neutrophile Granulozyten.**

24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die Quantifizierung der Blutleukozyten erfolgte mit einem veterinärmedizinischen Hämozytometer aus mit EDTA versetzten Vollblut. (A) Neutrophile Granulozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut, (B) Prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl im Blut. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test).

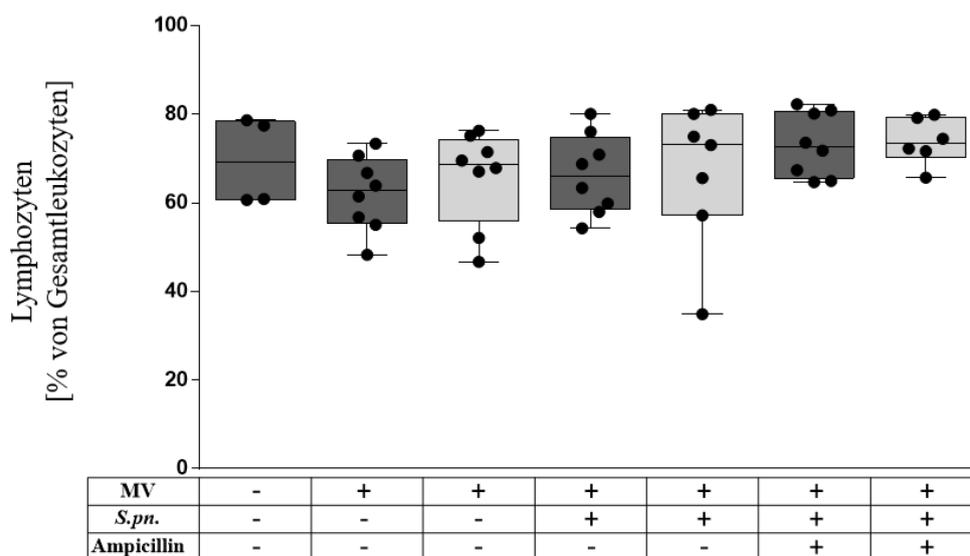


**Abbildung 3.15 Systemische zelluläre Immunantwort im Blut 30 h p.i., Monozyten.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die Quantifizierung der Blutleukozyten erfolgte mit einem veterinärmedizinischen Hämozytometer aus mit EDTA versetzten Vollblut. (A) Monozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut, (B) Prozentualer Anteil der Monozyten an der Gesamtleukozytenzahl im Blut. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test).

(A)



(B)

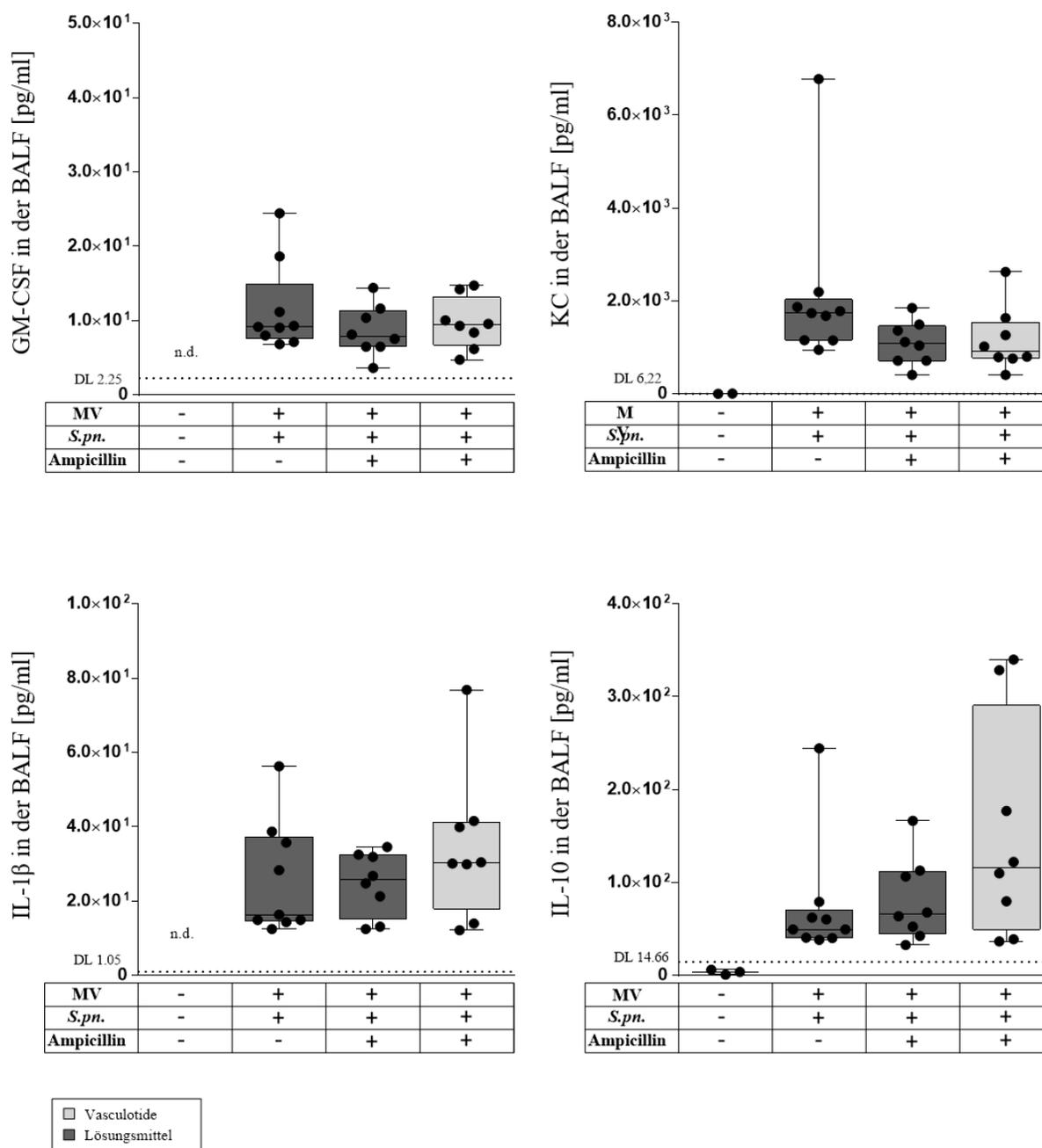


**Abbildung 3.16 Systemische zelluläre Immunantwort im Blut 30 h p.i., Lymphozyten.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die Quantifizierung der Blutleukozyten erfolgte mit einem veterinärmedizinischen Hämozytometer aus mit EDTA versetzten Vollblut. (A) Lymphozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut, (B) Prozentualer Anteil der Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl im Blut. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle  $n=4$ , restl. Gruppen  $n=7-8$ , Mann-Whitney-U-Test).

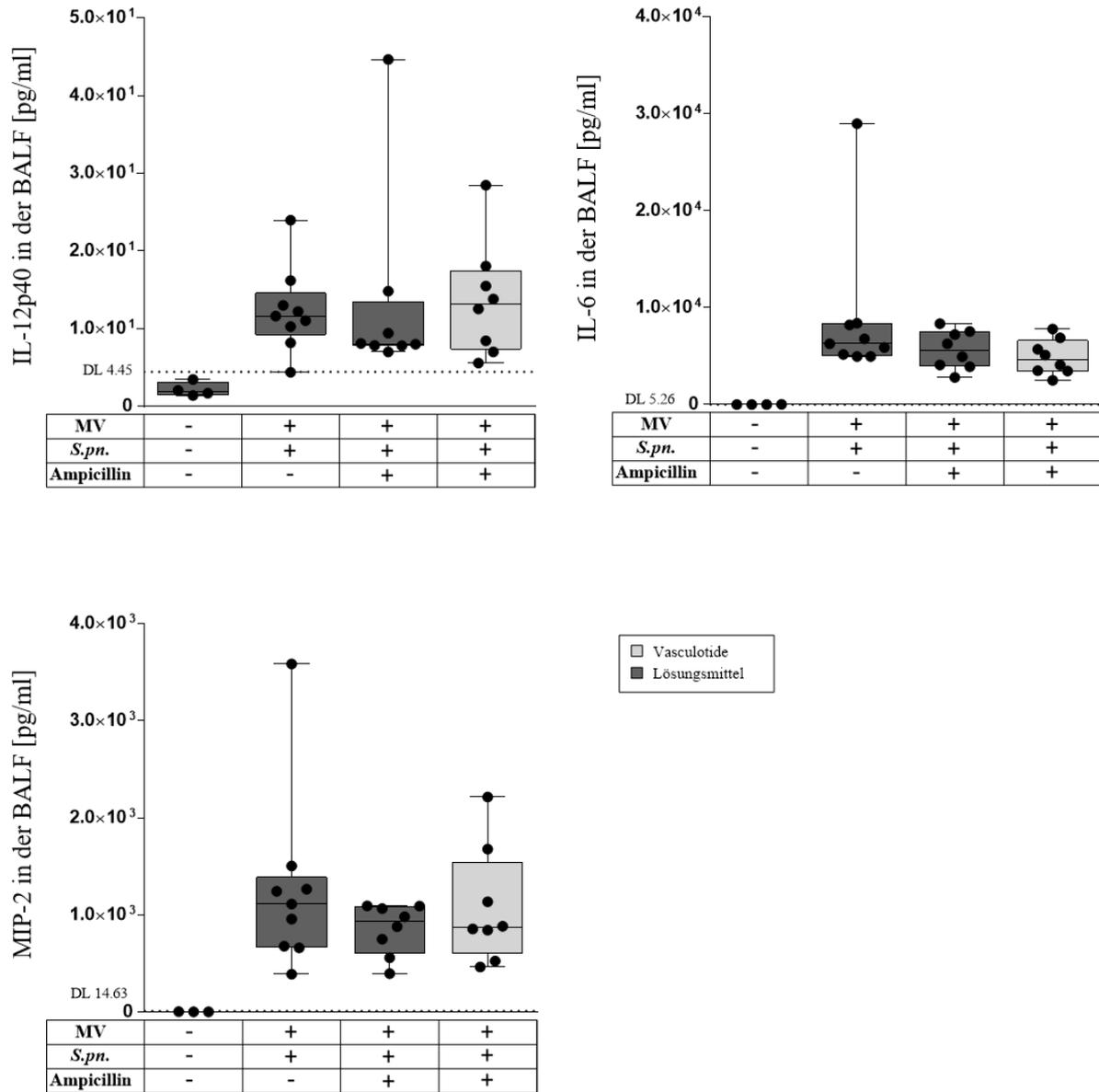
### 3.4 Die Produktion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und Chemokine wurde durch Vasculotide nicht moduliert

Als weitere Parameter für die lokale und systemische Inflammation wurden die Zytokine GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40 und IL-10 sowie die Chemokine KC und MIP-2 mittels Multiplex Zytokin-Assay in BALF und Plasma quantifiziert.

Die lokale Zytokinproduktion, gemessen in der BALF (Abbildungen 3.17 und 3.18), wurde durch die Kombination von Infektion und MV für alle Zytokine gesteigert, während in der Kontrollgruppe nur IL-6 in messbaren Konzentrationen oberhalb des Detektionslimits nachgewiesen wurde. Diese wurde jedoch durch Infektion und MV auch um ein Vielfaches erhöht. Durch die Gabe von Ampicillin konnte die Konzentration von KC und IL-6 gesenkt werden. VT hatte dabei keinen zusätzlichen modulatorischen Effekt. Bei den Zytokinen MIP-2, IL-12p40, GM-CSF und IL-1 $\beta$  zeigte weder die antimikrobielle Therapie noch die Gabe von VT einen Einfluss. Im Falle des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 konnte ein Trend zu höheren Konzentrationen in der BALF der Tiere, die kombiniert mit VT und Ampicillin behandelt wurden, verzeichnet werden. Dieser erreicht jedoch keine statistische Signifikanz.

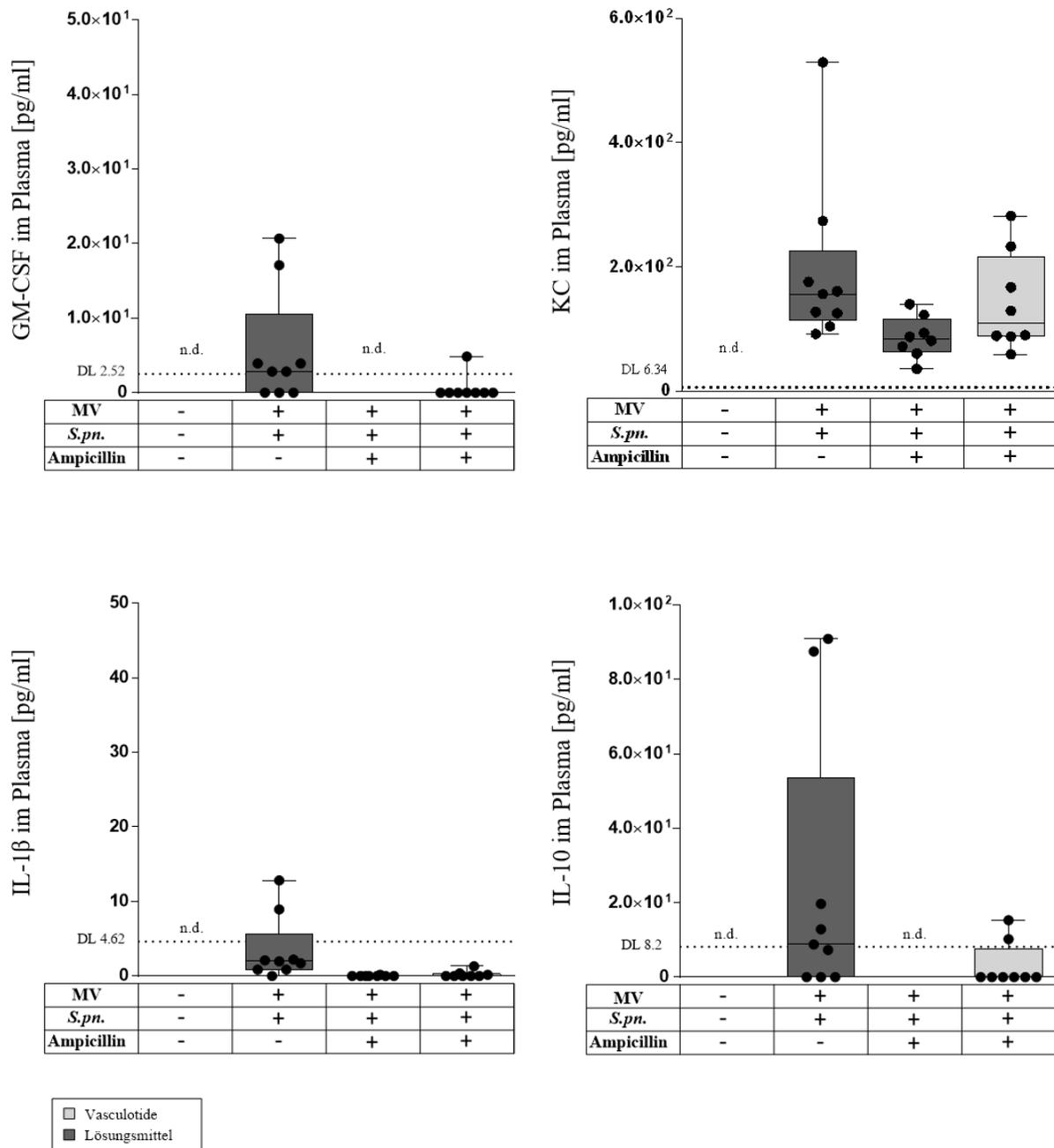


**Abbildung 3.17 Pulmonale Zytokin- und Chemokin-Produktion 30 h p.i. (GM-CSF, KC, IL-1β, IL-10).** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen wurden mithilfe eines Multiplex Zytokin Assay bestimmt. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test). Abkürzungen: DL=Detektionslimit, n.d.= nicht detektierbar

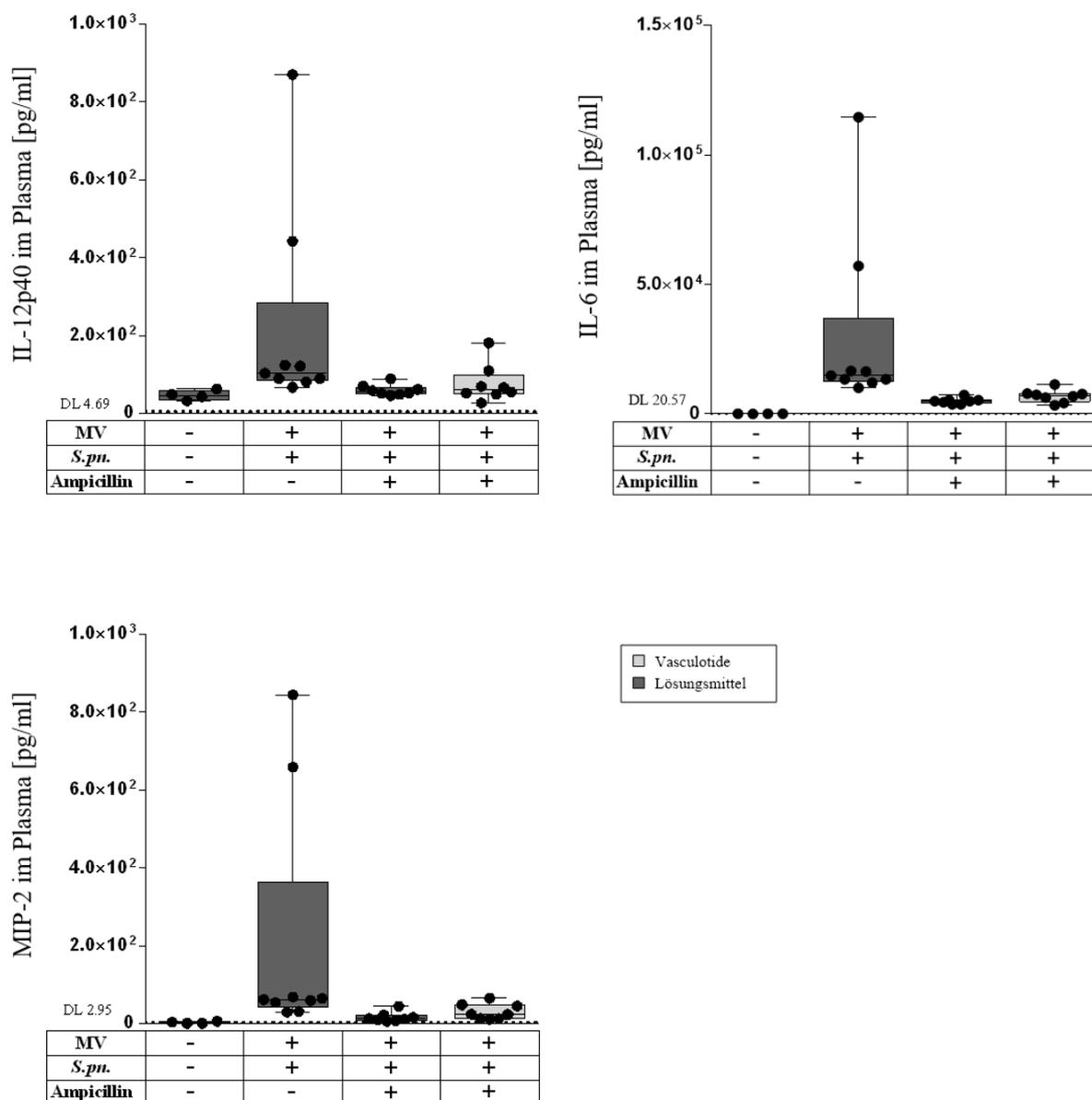


**Abbildung 3.18 Pulmonale Zytokin- und Chemokin-Produktion 30 h p.i. (IL-12p40, IL-6, MIP-2)**  
 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen wurden mithilfe eines Multiplex Zytokin Assay bestimmt. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test).  
 Abkürzungen: DL=Detektionslimit

Die Messung der Zytokine und Chemokine im Plasma (Abbildungen 3.19 und 3.20) ergab, dass in der infizierten und beatmeten Gruppe ohne weitere Therapie auch die systemischen Zytokin- und Chemokinkonzentrationen deutlich erhöht waren mit Ausnahme von IL-1 $\beta$ , welches in allen Gruppen nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden war. Durch Ampicillin konnte eine systemische Freisetzung aller oben genannten Botenstoffe nahezu unterdrückt werden, sodass GM-CSF und IL-10 nicht mehr nachweisbar und die übrigen gemessenen Zytokine nur in deutlich reduzierter Menge vorhanden waren. Signifikante Unterschiede zwischen der einfachen antibiotischen Therapie und der Kombination mit VT konnten nicht festgestellt werden.



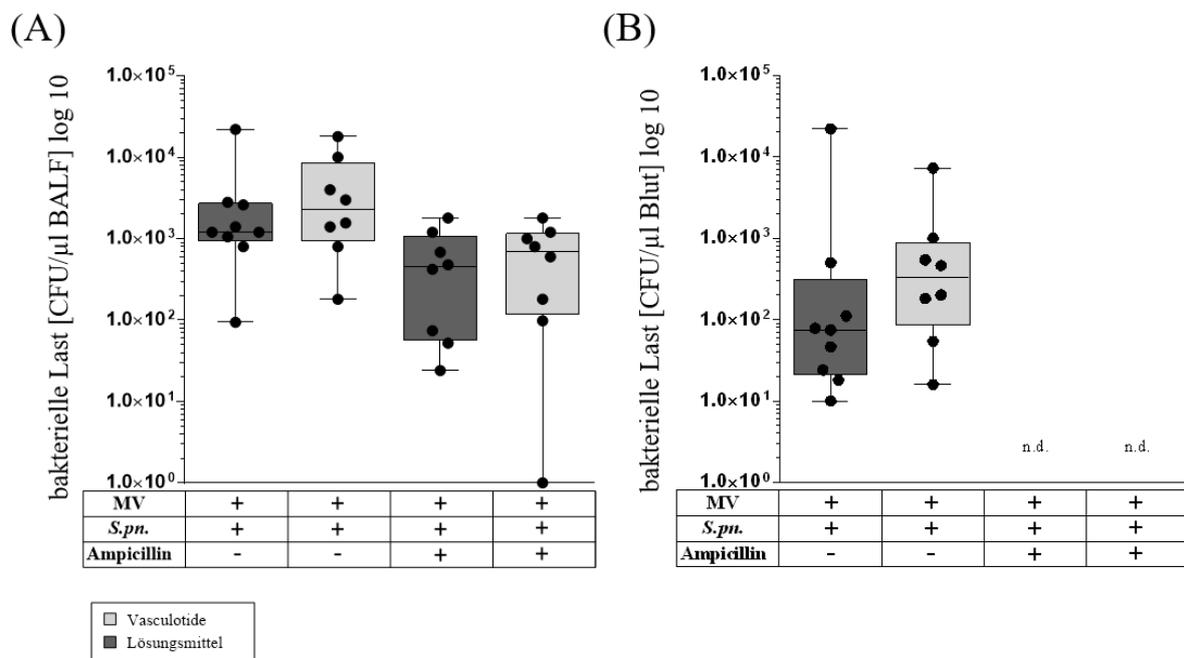
**Abbildung 3.19 Systemische Zytokin- und Chemokin-Produktion 30 h p.i. (GM-CSF, KC, IL-1 $\beta$ , IL-10).** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen wurden mithilfe eines Multiplex Zytokin Assay bestimmt. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test). Abkürzungen: DL=Detektionslimit, n.d.= nicht detektierbar



**Abbildung 3.20 Systemische Zytokin- und Chemokin-Produktion 30 h p.i. (IL-12p40, IL-6, MIP-2).** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen wurden mithilfe eines Multiplex Zytokin Assay bestimmt. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test). Abkürzungen: DL=Detektionslimit

### 3.5 Vasculotide hatte keinen Effekt auf die lokale Elimination und die hämatogene Dissemination von *Streptococcus pneumoniae*

Anhand der CFUs konnte die bakterielle Last im Alveolarraum sowie das Ausmaß der Bakteriämie ermittelt werden (Abbildung 3.21). Hier zeigte sich, dass die Therapie mit VT keinen positiven Effekt auf die Elimination der Pathogene in der BALF hatte und die Tiere auch nicht vor einem septischen Verlauf durch Translokation der Bakterien in die systemische Zirkulation geschützt werden konnten. Der einzige protektive Effekt ließ sich in diesem Fall auf die antibiotische Therapie mit Ampicillin zurückführen, die die bakterielle Last in der BALF deutlich senken konnte. Außerdem wurde eine Bakteriämie verhindert beziehungsweise so effektiv bekämpft, dass zum Zeitpunkt der Analyse 30 h p.i. bei keinem der antibiotisch therapierten Tiere CFUs im Blut nachweisbar waren.

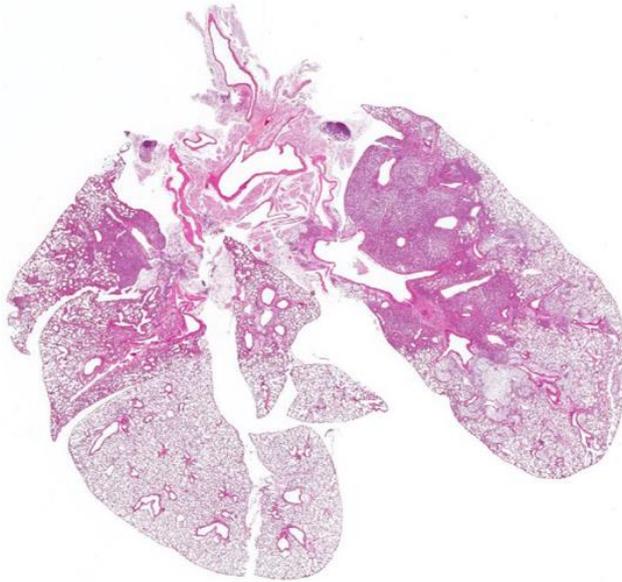
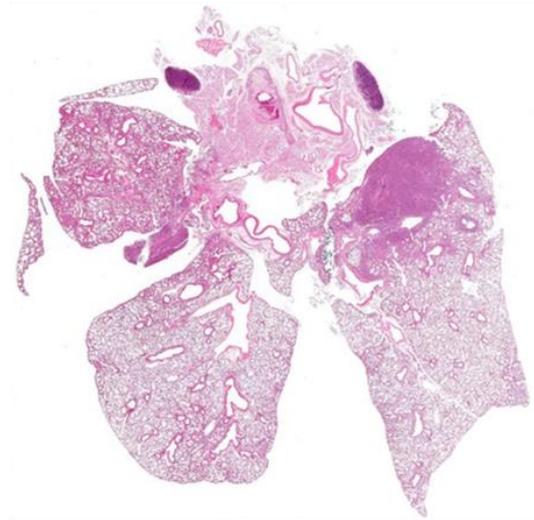
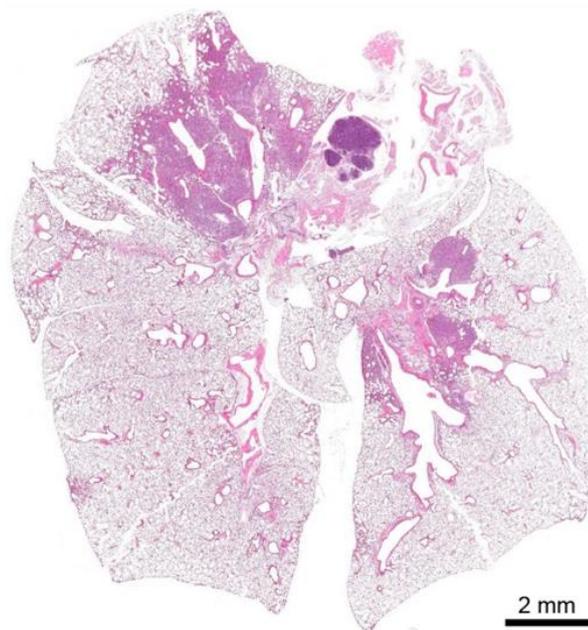


**Abbildung 3.21 Pulmonale und systemische bakterielle Last 30 h p.i.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Sowohl die BALF als auch Vollblut versetzt mit EDTA wurden in absteigender Verdünnung auf Schafsbloodagar ausplattiert und über Nacht inkubiert. Nach Auszählung der CFU wurde die Konzentration pro µl ermittelt. (A) lokale, bakterielle Last in der BALF, (B) systemische, bakterielle Last im Blut. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test) .n.d. = nicht detektierbar

### 3.6 Die Kombinationstherapie von Vasculotide und Ampicillin reduzierte den Lungenschaden in der histologischen Beurteilung

Die Auswertung der für die Histologie präparierten Organe erfolgte im Institut für Tierpathologie der FU Berlin durch Olivia Kershaw. Für die Analyse wurden ausschließlich infizierte, maschinell beatmete Tiere verwendet und in eine unbehandelte, eine mit Ampicillin behandelte und eine mit Ampicillin und VT behandelte Gruppe aufgeteilt.

Schon in der makroskopischen Beurteilung (Abbildung 3.22) konnte festgestellt werden, dass die Lungen der Tiere mit VT und Antibiose ein deutlich höheres Lungenvolumen und weniger konsolidierte Areale aufwiesen als die der Tiere, die nur mit Ampicillin behandelt wurden oder keine Therapie erhielten.

*S.pn.*, MV, keine Therapie*S.pn.*, MV, Ampicillin*S.pn.*, MV, Ampicillin, VT

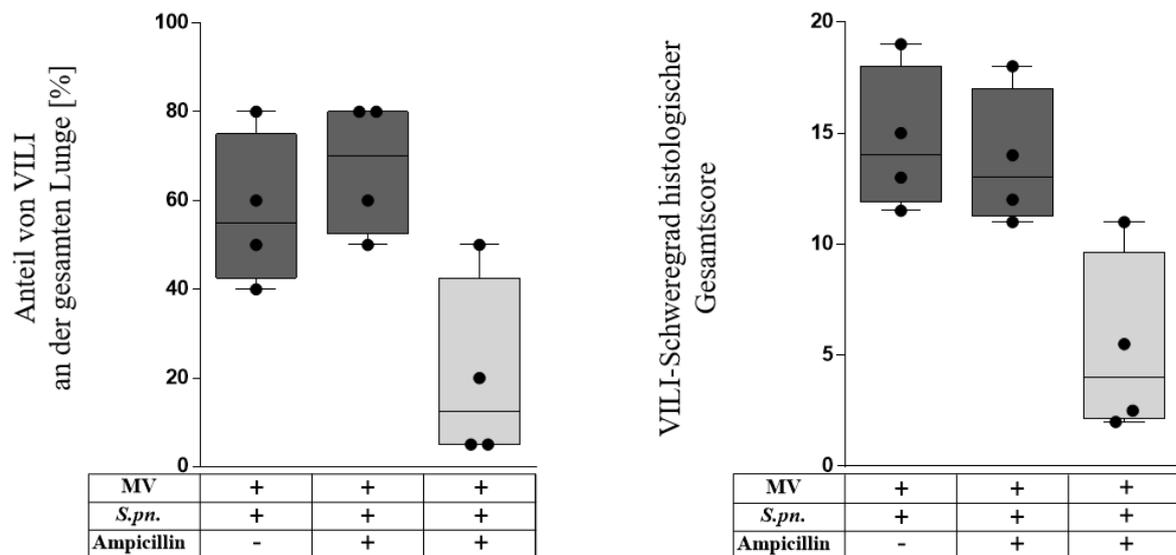
**Abbildung 3.22** Histologische Beurteilung des Gesamtvolumens der Lungen 30 h p.i. 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT versetzt mit 14,3  $\mu$ l 0,9 % NaCl wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Das Gesamtvolumen der Lunge wurde in Schnitten des ganzen Organs in einfacher Vergrößerung beurteilt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen jeweils eines Tieres (n=4)

Zur genaueren Differenzierung wurden Pneumonie und VILI anhand histologischer Scores ausgewertet, die in Abbildung 3.23 grafisch dargestellt sind. Dabei konnte der Beatmungsschaden nur in Arealen analysiert werden, die frei von pneumonischen Infiltraten waren, da diese die beatmungsinduzierten pathologischen Veränderungen überlagerten. Die Analyse zeigte, dass VT in Kombination mit Ampicillin den prozentual von VILI betroffenen Lungenanteil deutlich senken konnte und auch der Schweregrad anhand des Scores wesentlich geringer war. Eine alleinige Therapie mit Ampicillin zeigte im Vergleich zu unbehandelten Tieren im Gegensatz dazu keinen Effekt.

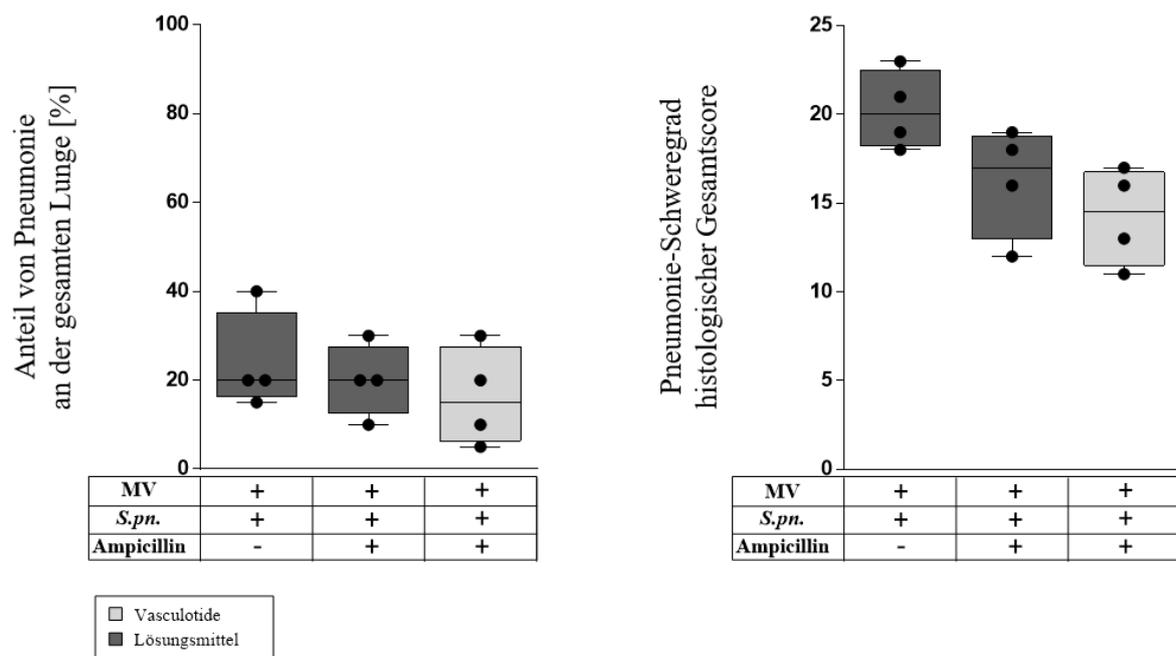
Auf den prozentual von Pneumonie betroffenen Lungenanteil und den Schweregrad der Pneumonie konnte kein offensichtlicher therapeutischer Effekt nachgewiesen werden. Die Therapie mit Ampicillin zeigte einen Trend zur Verbesserung der pathologischen Korrelate der Pneumonie, doch hier schien eine zusätzliche Behandlung mit VT keine davon unabhängige protektive Wirkung zu entfalten.

Die Gesamtscores setzten sich aus der Bewertung mehrerer, einzelner, histopathologischer Korrelate des Beatmungsschadens und der Pneumonie zusammen. Eine Auflistung dieser Einzelscores ist den Tabellen 3.2 und 3.3 zu entnehmen.

(A)



(B)

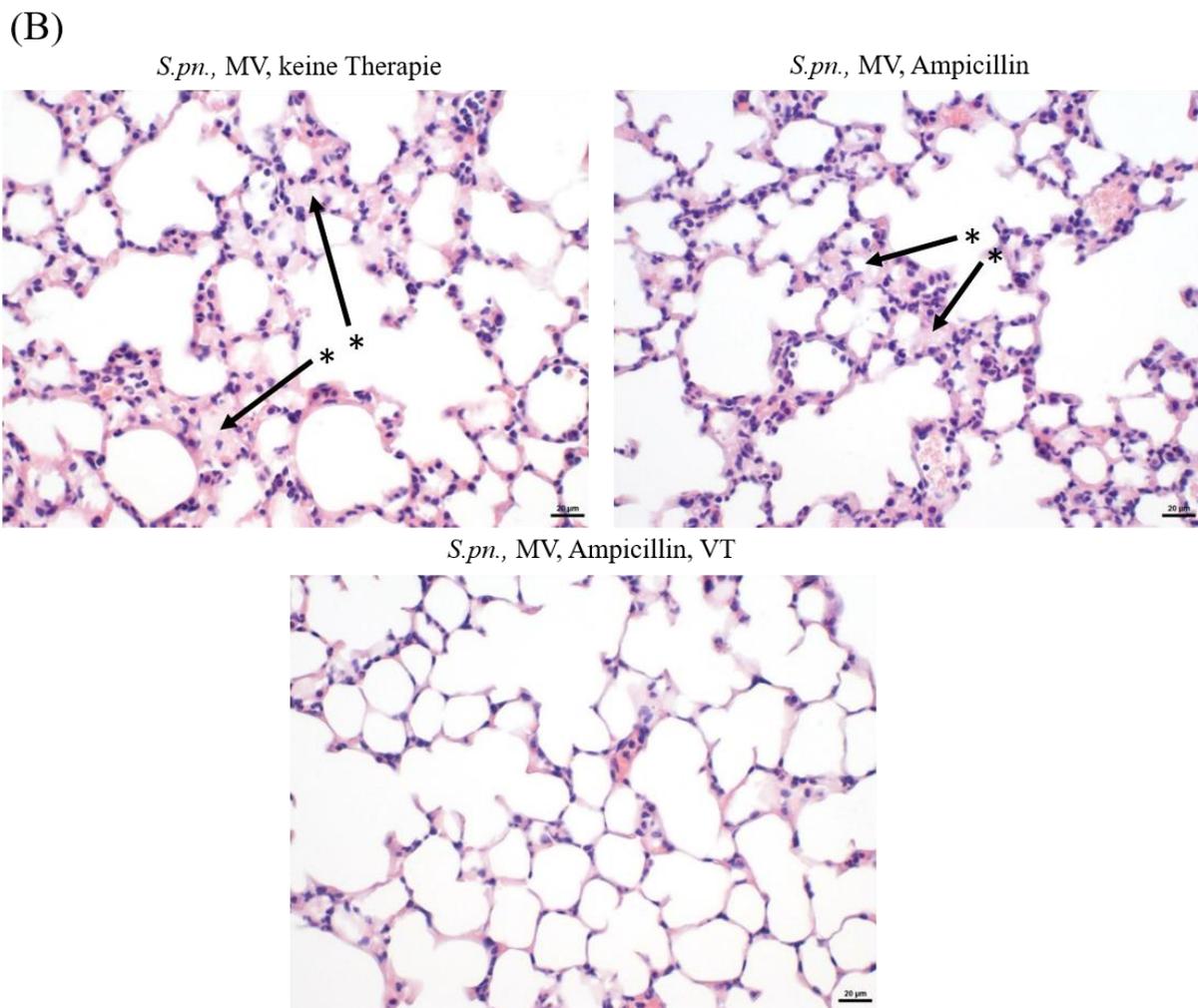
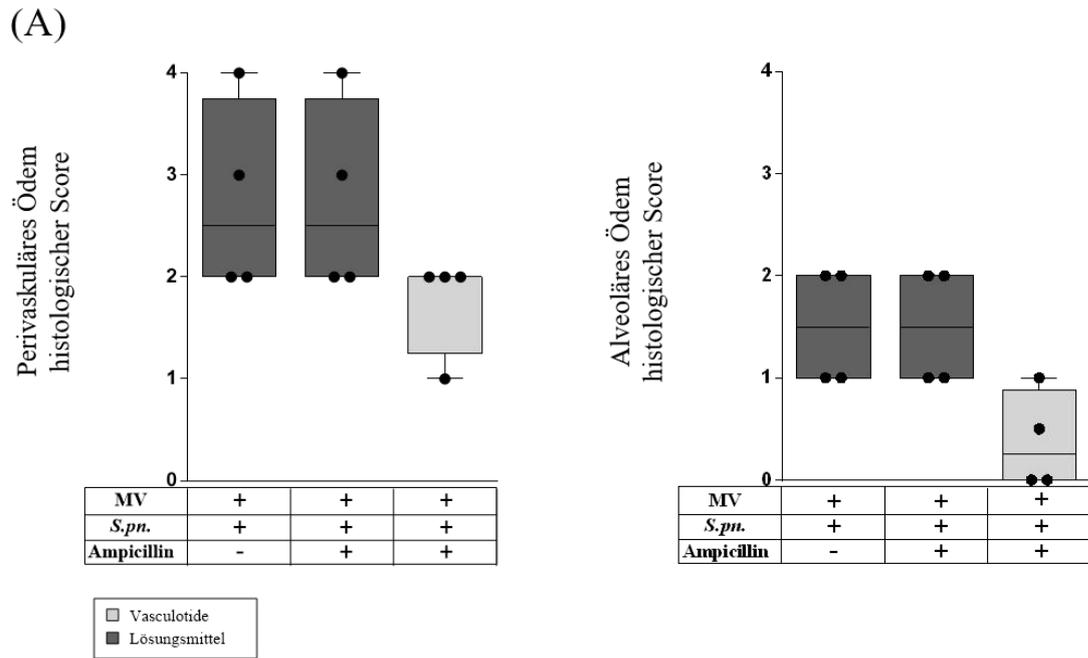


**Abbildung 3.23 Histologische Beurteilung von VILI und Pneumonie 30 h p.i.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT versetzt mit 14,3 µl 0,9 % NaCl wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die histologischen Merkmale der Schädigung durch Pneumonie und VILI wurden in einem Score von 0-4 quantifiziert, der hier zu einem Gesamtscore zusammengefasst wurde. (A) prozentualer Anteil der von VILI betroffenen Lunge und histologisch erfasster Schweregrad, (B)

prozentualer Anteil der von Pneumonie betroffenen Lunge und histologisch erfasster Schweregrad. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (n=4)

Ein deutlicher Effekt konnte vor allem bei der Ausbildung eines interstitiellen sowie alveolären Ödems festgestellt werden (Abbildung 3.24), welches in der mit VT behandelten Gruppe wesentlich geringer ausgeprägt war.

Aufgrund der geringen Stichprobengröße (n=4) erfolgte keine statistische Auswertung der Ergebnisse.



**Abbildung 3.24** Histologische Beurteilung des Lungenödems 30 h p.i. 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h

p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT versetzt mit 14,3 µl 0,9 % NaCl wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Das interstitielle und alveoläre Ödem wurden durch einen Score von 0-4 in 200-facher Vergrößerung bewertet. (A) histologischer Score des alveolären und interstitiellen Ödems, (B) Repräsentative Aufnahmen des Ödems in 200-facher Vergrößerung. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (n=4) \* → = Ödem

**Tabelle 3.2 Histologische Beurteilung der Pneumonie 30 h p.i.**

	MV+S. <i>pn.</i> +LM+ NaCl	MV+S. <i>pn.</i> +LM+ Ampicillin	MV+S. <i>pn.</i> +VT+ Ampicillin
Prozentual betroffener Anteil der Lunge [%]	20	20	10
	15	10	5
	40	20	20
	20	30	30
Pneumonie-Grad	4	4	4
	4	3	4
	4	4	4
	4	4	4
Eitrige Pneumonie	+++	+++	+++
	+++	+++	+++
	+++	+++	+++
	+++	+++	+++
Histiozytäre Pneumonie	+++	+++	+++
	+++	+++	+++
	+++	+++	+++
	+++	+++	+++
Nekrotisierende Pneumonie	++	++	++
	++	++	++
	++	++	++
	++	++	++

	MV+S. <i>pn.</i> +LM+ NaCl	MV+S. <i>pn.</i> +LM+ Ampicillin	MV+S. <i>pn.</i> +VT+ Ampicillin
Katarrhalisch-eitrige Pneumonie	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++	+++ +++ +++ +++
Perivaskuläres Ödem	++ ++ ++++ +++	++ ++ +++ ++++	++ + ++ ++
Perivaskuläre Cuffs	++ ++ ++++ +++	++ ++ +++ ++++	++ + ++ ++
Pleuritis	+++ +++ +++ +++	+ + + ++	+ + ++ ++
Steatitis	+++ +++ +++ +++	+ + + ++	+ + ++ ++
Lymphadenitis	- - + -	++ - + nv	- nv + +

Die Beurteilung erfolgte 30 h nach i.n. Inokulation von *S. pn.* und 24 h p.i. beginnender 6-stündiger Beatmung. Die Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl) erfolgte 22 h p.i., sowie eine weitere Dosis von VT versetzt mit 14,3 µl 0,9 % NaCl 1,5 h vor Versuchsende. Die einzelnen histologischen Merkmale der Pneumonie wurden durch einen Score von 0-4 bewertet ( - = kein Schaden, + = vereinzelt, ++ = gering gradig, +++ = mittelgradig, ++++ = hochgradig, nv = nicht vorhanden). Die Beurteilung erfolgte in 200-facher Vergrößerung, Werte pro Tier aufgeführt

Tabelle 3.3 Histologische Beurteilung des beatmungsassoziierten Lungenschadens 30 h p.i.

	MV+S. pn.+LM+ NaCl	MV+S. pn.+LM+ Ampicillin	MV+S. pn.+VT+ Ampicillin
Prozentual betroffener Anteil der Lunge [%]	60	60	20
	80	50	5
	50	80	5
	40	80	50
Alveoläres Ödem	++	+	±
	++	+	-
	+	++	-
	+	++	+
Perivaskuläres Ödem	++	+	±
	++	+	-
	+	++	-
	+	++	+
Leukozytostase	+	+	+
	+	+	-
	+	+	-
	+	+	+
Alveolarwand- schaden	+++	++	+
	+++	++	+
	++	+++	±
	++	++	++
Hyaline Membranen	++	++	±
	++	+	±
	+	++	±
	++	++	++

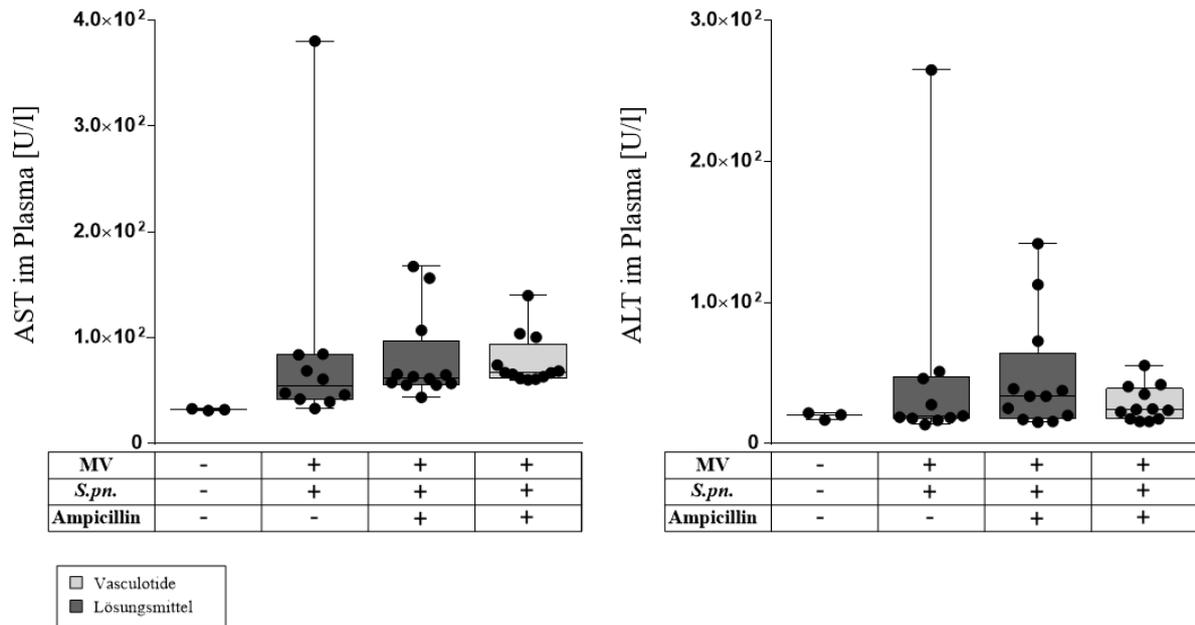
	MV+S. <i>pn.</i> +LM+ NaCl	MV+S. <i>pn.</i> +LM+ Ampicillin	MV+S. <i>pn.</i> +VT+ Ampicillin
Zellen im Alveolarraum	+ ++ + +	+ + ++ +	± - - +
Alveolarhistiozytose	+ ++ + +	+ + ++ +	± - - +
Kollaps	- + ± -	- - + -	- - - -
Dystelektase	++ ++ ++ ++	++ ++ ++ ++	± ± ± +
Emphysem	+ ++ + ++	+ + + +	± ± ± +

Die Beurteilung erfolgte 30 h nach i.n. Inokulation von *S. pn.* und 24 h p.i. beginnender 6-stündiger Beatmung. Die Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl) erfolgte 22 h p.i., sowie eine weitere Dosis von VT versetzt mit 14,3 µl 0,9 % NaCl 1,5 h vor Versuchsende. Die einzelnen histologischen Merkmale des VILI wurden durch einen Score von 0-4 bewertet ( - = kein Schaden, + = vereinzelt, ++ = gering gradig, +++ = mittelgradig, ++++ = hochgradig, nv = nicht vorhanden). Die Beurteilung erfolgte in 200-facher Vergrößerung, Werte pro Tier aufgeführt

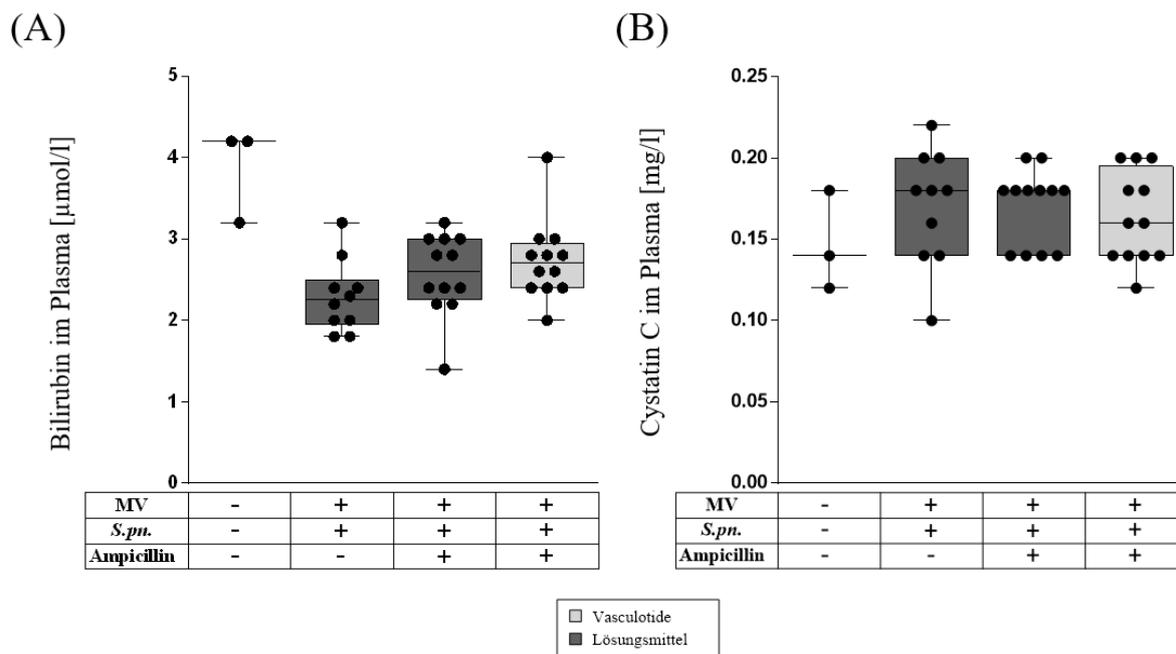
### 3.7 Vasculotide hatte keinen Einfluss auf ein durch Pneumonie und maschinelle Beatmung induziertes Multiorganversagen

Eine Evaluation des Multiorganversagens erfolgte einerseits durch die histologische Beurteilung von Leber, Nieren, Milz, Magen-Darm-Trakt und Gehirn und andererseits durch die Messung von serologischen Markern des Multiorganversagens durch das externe Labor LaboKlin.

Histologisch konnte bei insgesamt eher gering ausgeprägter Schädigung der oben genannten Organe kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden (Tabelle 3.4). Bei allenfalls moderat erhöhten Transaminasen (Abbildung 3.25) und keinem Anstieg der Retentionsparameter oder des Bilirubins (Abbildung 3.26) ließen sich auch serologisch lediglich Hinweise für ein möglicherweise beginnendes MOV finden. Somit konnte auch der Einfluss von VT auf das Pneumonie und VILI bedingte MOV in diesem Modell nicht abschließend beurteilt werden. In den hier erhobenen Daten zeigte VT keinen therapeutischen Nutzen.



**Abbildung 3.25 Transaminasen im Plasma 30 h p.i.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die Messung der Parameter des Multiorganversagens im Plasma wurde durch das externe Labor LaboKlin durchgeführt. Es wurden sowohl die Proben der Permeabilitätsversuche als auch der Versuche für die histologischen Untersuchungen verwendet. Die Werte sind aufgeführt als Median  $\pm$  IQR (Kontrolle  $n=3$ , restliche Gruppen  $n=10-12$ , Mann-Whitney-U-Test).



**Abbildung 3.26 Bilirubin und Cystatin C im Plasma 30 h p.i.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Die Messung der Parameter des Multiorganversagens wurde durch das externe Labor LaboKlin im Plasma durchgeführt. Es wurden sowohl die Proben der Permeabilitätsversuche als auch der Versuche für die histologischen Untersuchungen verwendet. (A) Bilirubin im Plasma, (B) Cystatin C im Plasma. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test).

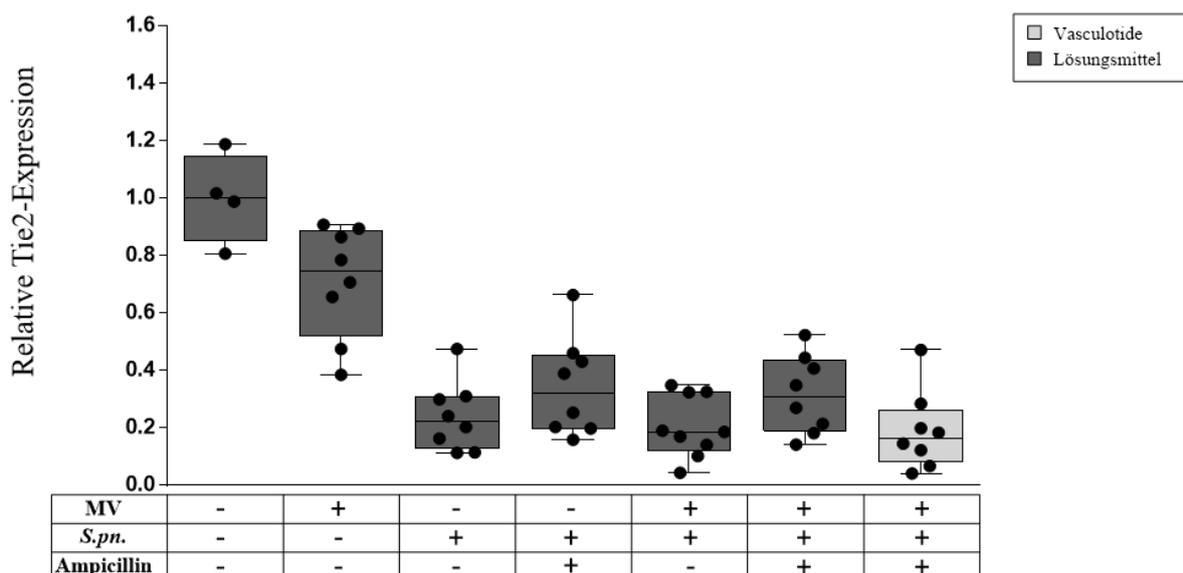
**Tabelle 3.4 Histologische Beurteilung des Multiorganversagens 30 h p.i.**

	MV+S. <i>pn.</i> +LM+NaCl	MV+S. <i>pn.</i> +LM+ Ampicillin	MV+S. <i>pn.</i> +VT+ Ampicillin
Niere	- - - -	- - - -	- - - -
Leber	- - - -	+ - - -	- - - -
Milz	- - - -	- - - -	- - - -
Herz	- - - -	- - - -	- - - -

Die Beurteilung erfolgte 30 h nach i.n. Inokulation von *S. pn.* und 24 h p.i. beginnender 6-stündiger Beatmung. Die Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl) erfolgte 22 h p.i. sowie eine weitere Dosis von VT versetzt mit 14,3 µl 0,9 % NaCl 1,5 h vor Versuchsende. Die einzelnen histologischen Merkmale des Organschadens wurden durch einen Score von 0-4 bewertet ( - = kein Schaden, + = vereinzelt, ++ = gering gradig, +++ = mittelgradig, ++++ = hochgradig, nv = nicht vorhanden). Die Beurteilung erfolgte in 200-facher Vergrößerung, Werte pro Tier aufgeführt

### 3.8 Die Expression des Tie2-Rezeptors wurde durch Vasculotide nicht erhöht

Zur Beurteilung der Expression des Tie2-Rezeptors in der Lunge 30 h p.i. wurde von der Hälfte der lavagierten rechten Lunge die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde mithilfe einer qPCR für Tie2 quantifiziert und in Relation zu dem Expressionslevel der Kontrollgruppe gesetzt. Die so gewonnenen Daten sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Durch MV allein wurde die Expression des Tie2-Rezeptors im Vergleich zur Kontrollgruppe auf das 0,8-fache des Ausgangswertes reduziert. Im Unterschied dazu war die Tie2-Expression in den infizierten Versuchsgruppen auf das 0,2- bis 0,4-fache vermindert. Innerhalb der infizierten Gruppen konnten keine Unterschiede zwischen beatmeten und nicht beatmeten Tieren festgestellt werden. Auch die Ampicillin-Therapie mit oder ohne VT zeigte keine signifikanten Unterschiede zu unbehandelten infizierten Tieren.

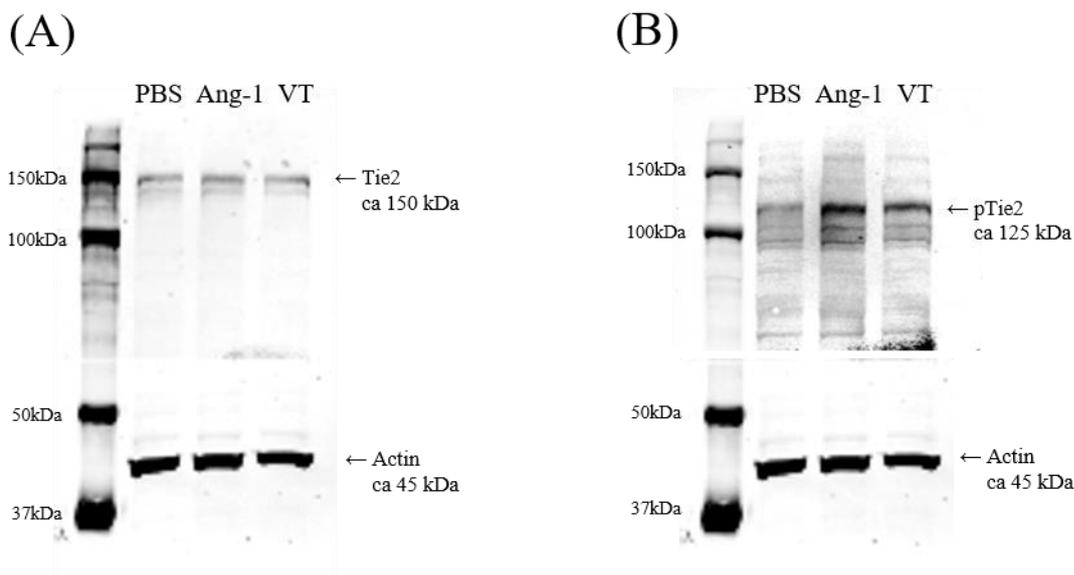


**Abbildung 3.27 Expression des Tie2-Rezeptors 30 h p.i.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Zur Beurteilung der Genexpression des Tie2-Rezeptors wurde eine qPCR mit cDNA Proben durchgeführt, die aus RNA des Lungenhomogenats gewonnen wurde. Die Werte sind aufgeführt als Median  $\pm$  IQR (Kontrolle n=4, restliche Gruppen n=8-9, Mann-Whitney-U-Test)

### 3.9 Eine vermehrte Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors durch Vasculotide konnte im Western Blot nicht nachgewiesen werden

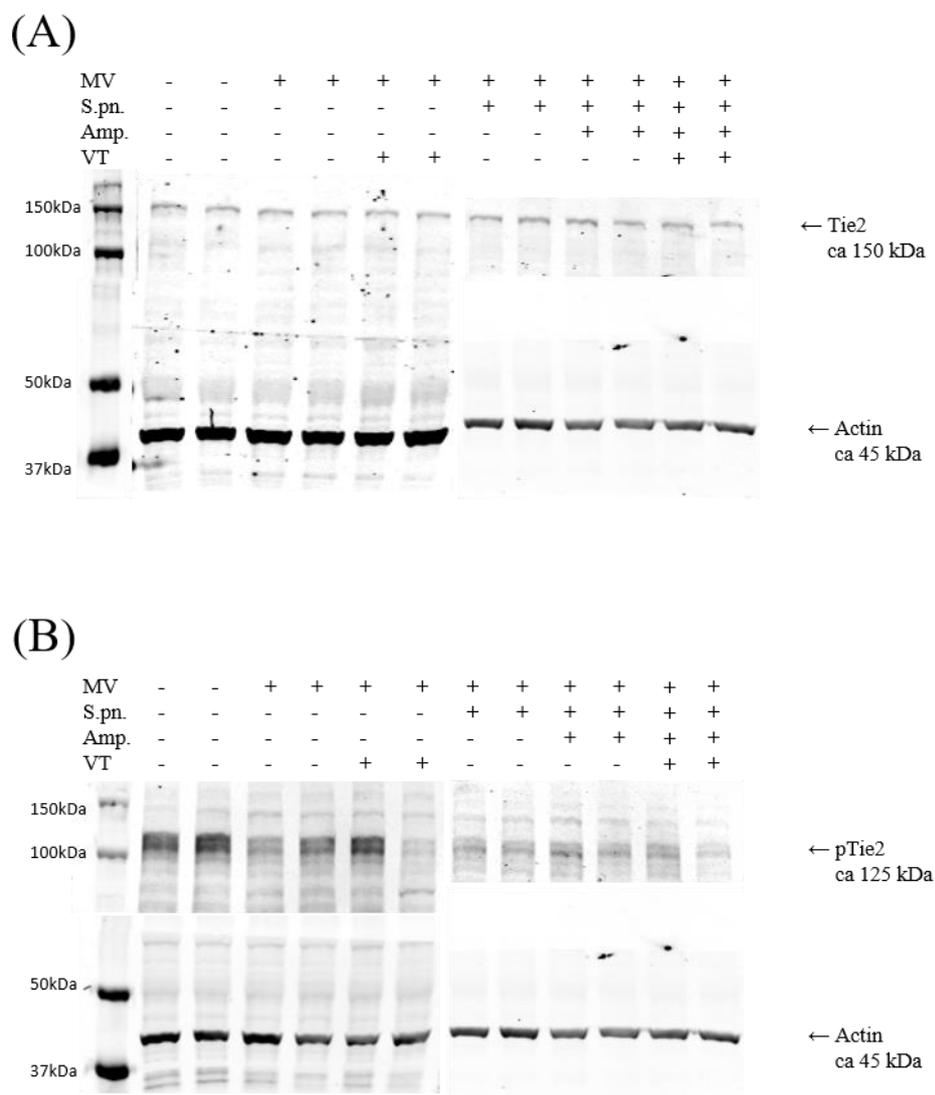
Um die Wirkungsweise von VT als Tie2 Agonist nachzuweisen wurden zunächst Stimulationsversuche mit VT und Ang-1 in einer Zellkultur aus huPMVECs durchgeführt und an dem darin gewonnenen Protein ein Protokoll für einen Western Blot zur Detektion von Tie2 und phosphoTie2 (pTie2) etabliert. Im Anschluss daran wurden Western Blots mit Proteinproben der Lunge aus den Beatmungsversuchen durchgeführt und die Ergebnisse sowohl qualitativ als auch semi-quantitativ mittels Densitometrie ausgewertet (Abbildungen 3.30 und 3.31).

In den Zellkulturversuchen (Abbildung 3.28) konnte qualitativ eine deutliche Aktivierung des Tie2-Rezeptors durch Ang-1 festgestellt werden. VT erzeugte ein vergleichbares Signal für pTie2 in den stimulierten Zellen. In der Negativkontrolle, die lediglich mit PBS stimuliert wurde, zeigte sich erwartungsgemäß keine gesteigerte Phosphorylierung von Tie2.



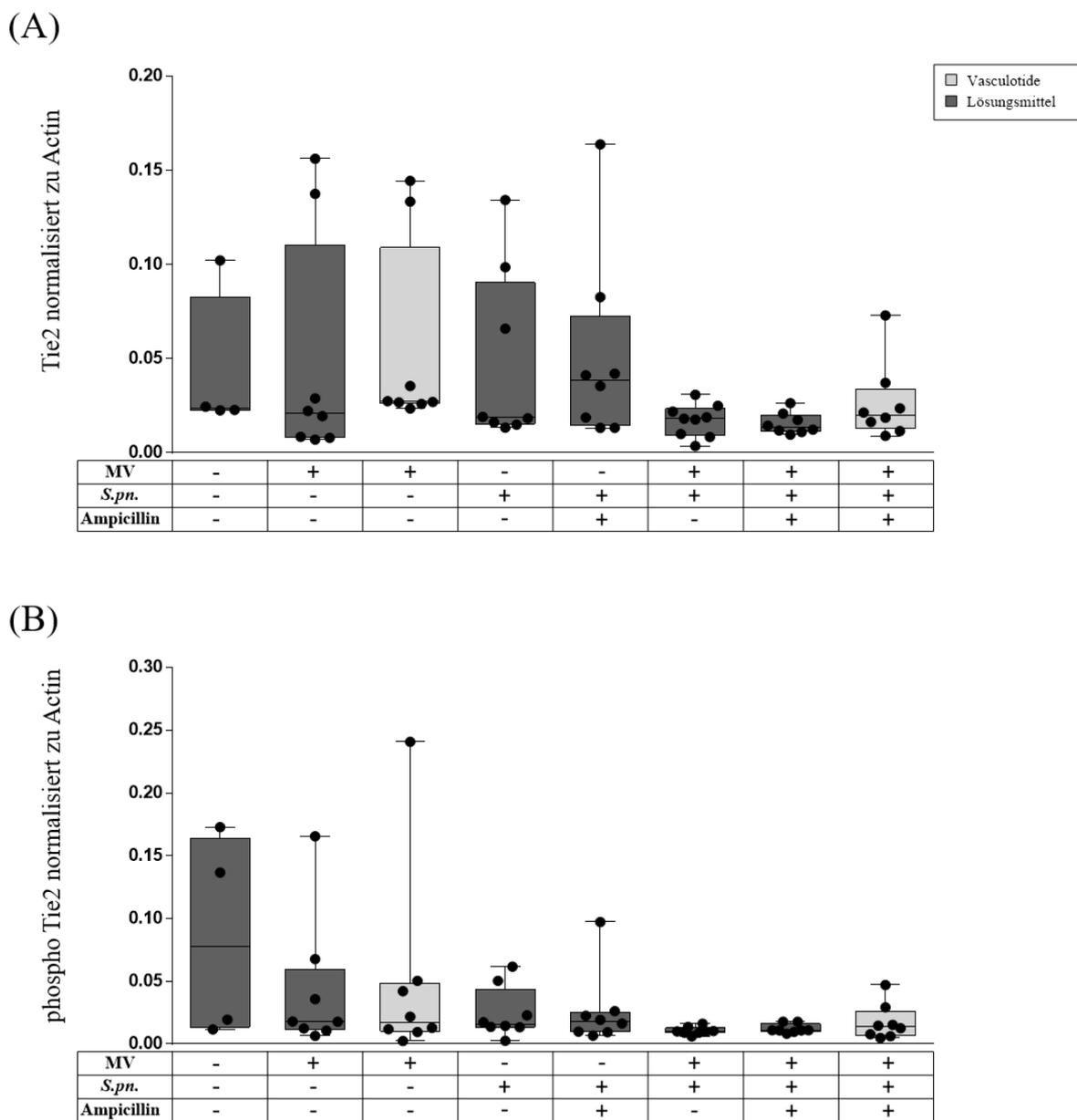
**Abbildung 3.28 Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors in der Zellkultur.** huPMVECs wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90 % in einer 6-Well Platte angezchtet. War eine ausreichende Konfluenz und Qualität erreicht, wurden die Zellen für 15 min jeweils mit Ang-1, VT und als Negativkontrolle mit PBS stimuliert. Danach wurden die Proteine aus den Zellen isoliert und für den Western Blot aufbereitet, der mit einem 8 %igem Gel durchgeführt wurde. Das Blotting erfolgte semi-dry und die Membranen wurden jeweils mit Antikörpern für phospho Tie2, Tie2 und Actin gefärbt und mittels Immunfluoreszenz im Licor entwickelt (n=4, ein repräsentativer Blot wurde für die Abbildung ausgewählt), die erste Bande zeigt den Marker, (A) Tie2, (B) phospho Tie2.

Bei der Analyse des Lungenhomogenats konnte kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors durch die Behandlung mit VT festgestellt werden (Abbildung 3.29). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ging der qualitative Nachweis für pTie2 in den infizierten Gruppen mit oder ohne MV deutlich zurück und auch in den beatmeten Tieren ohne Infektion konnte eine Reduktion der Phosphorylierung festgestellt werden. Es konnte weder qualitativ noch quantitativ eine absolut vermehrte Aktivierung von Tie2 durch die Gabe von VT beobachtet werden (Abbildung 3.30). Auch das Verhältnis von pTie zu Tie2 blieb im Western Blot von der VT Therapie unbeeinflusst (Abbildung 3.31).

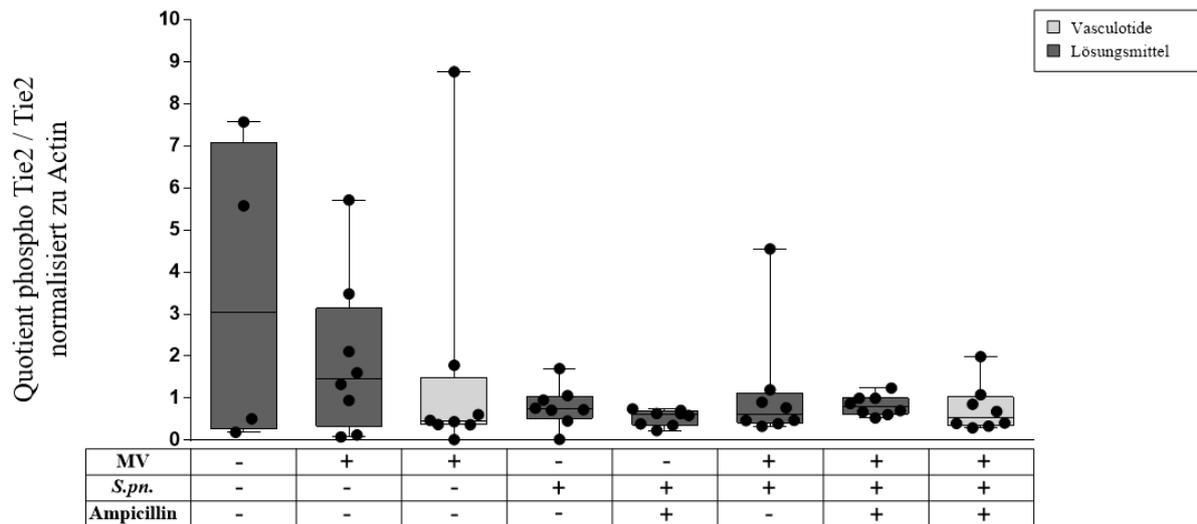


**Abbildung 3.29 Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors 30 h p.i. im Lungenhomogenat.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Zur Beurteilung der Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors wurden die

Proteine aus dem Lungenhomogenat isoliert und für den Western Blot aufbereitet. Der Western Blot wurde mit 8 %igem Gel durchgeführt und das Blotten erfolgte semi-dry. Danach wurde die Membran jeweils mit Antikörpern für phospho Tie2, Tie2 und Actin als Housekeeping Protein inkubiert und mittels Immunfluoreszenz im Licor entwickelt (Kontrolle n=4, restliche Gruppen n=8-9, es wurden pro Gruppe zwei repräsentative Proben für die Abbildung ausgewählt), die erste Bande zeigt den Marker. (A) Tie2, (B) phospho Tie 2.



**Abbildung 3.30 Tie2 und phospho Tie2 30 h p.i. im Lungenhomogenat.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Zur Beurteilung der Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors wurden die Proteine aus dem Lungenhomogenat isoliert und für den Western Blot aufbereitet. Der Western Blot wurde mit 8 %igem Gel durchgeführt und das Blotten erfolgte semi-dry. Danach wurde die Membran jeweils mit Antikörpern für phospho Tie2, Tie2 und Actin als Housekeeping Protein inkubiert, mittels Immunfluoreszenz im Licor entwickelt und densitometrisch ausgewertet. (A) Tie2 normalisiert zu Actin, (B) phospho Tie 2 normalisiert zu Actin Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test).



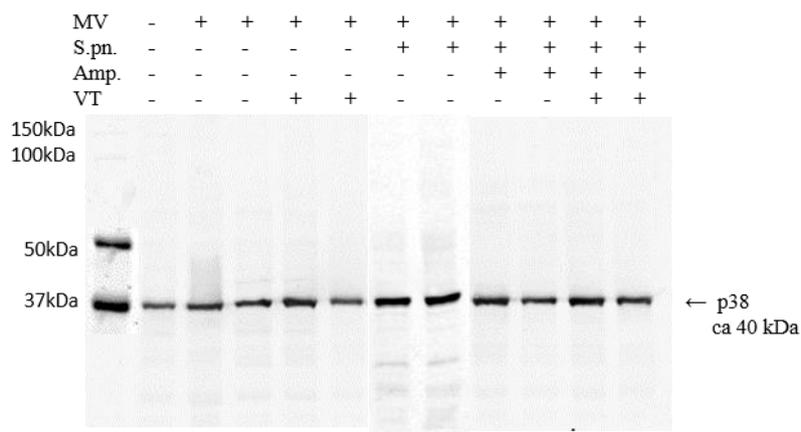
**Abbildung 3.31 Quotient aus phosphoryliertem Tie2 zu Tie2 30 h p.i. im Lungenhomogenat.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Zur Beurteilung der Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors wurden die Proteine aus dem Lungenhomogenat isoliert und für den Western Blot aufbereitet. Der Western Blot wurde mit 8 %igem Gel durchgeführt und das Blot erfolgte semi-dry. Danach wurde die Membran jeweils mit Antikörpern für phospho Tie2, Tie2 und Actin als Housekeeping Protein inkubiert, mittels Immunfluoreszenz im Licor entwickelt und densitometrisch ausgewertet. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test)

### 3.10 Eine vermehrte Phosphorylierung von p38 durch Vasculotide konnte im Western Blot nicht nachgewiesen werden

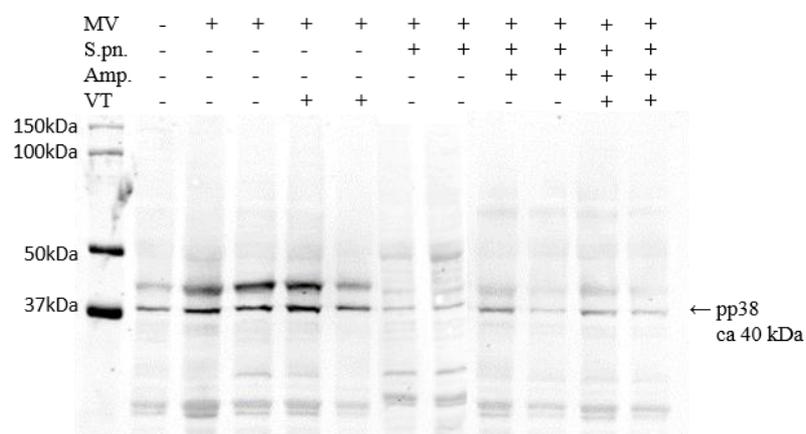
Zur Analyse der Tie2 nachgeschalteten Signalkaskaden wurde die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 in denselben Proteinproben untersucht, die für den Nachweis von pTie2 im Western Blot dienen, und ebenfalls qualitativ sowie semi-quantitativ ausgewertet.

In der qualitativen Beurteilung der Banden für pp38 konnte kein eindeutiger Einfluss von VT im Sinne einer vermehrten Phosphorylierung festgestellt werden (Abbildung 3.32) und auch die quantitative Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede (Abbildungen 3.33 und 3.34). Insgesamt wurde auch die Phosphorylierung von p38 durch Infektion und MV reduziert, allerdings in geringerem Ausmaß als bei Tie2.

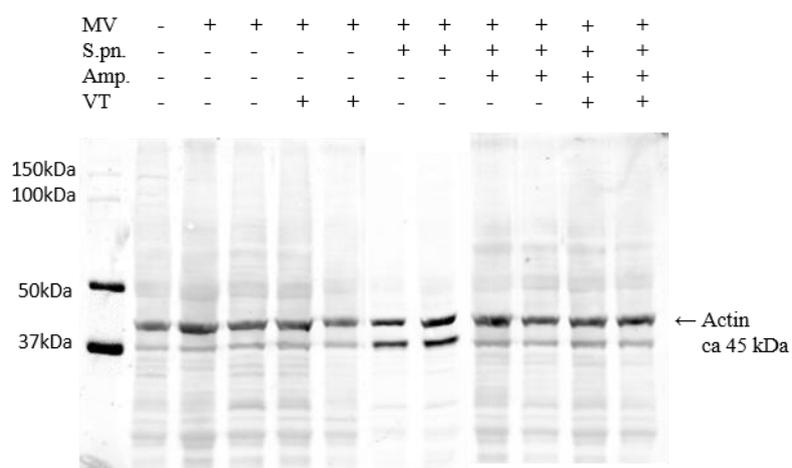
(A)



(B)

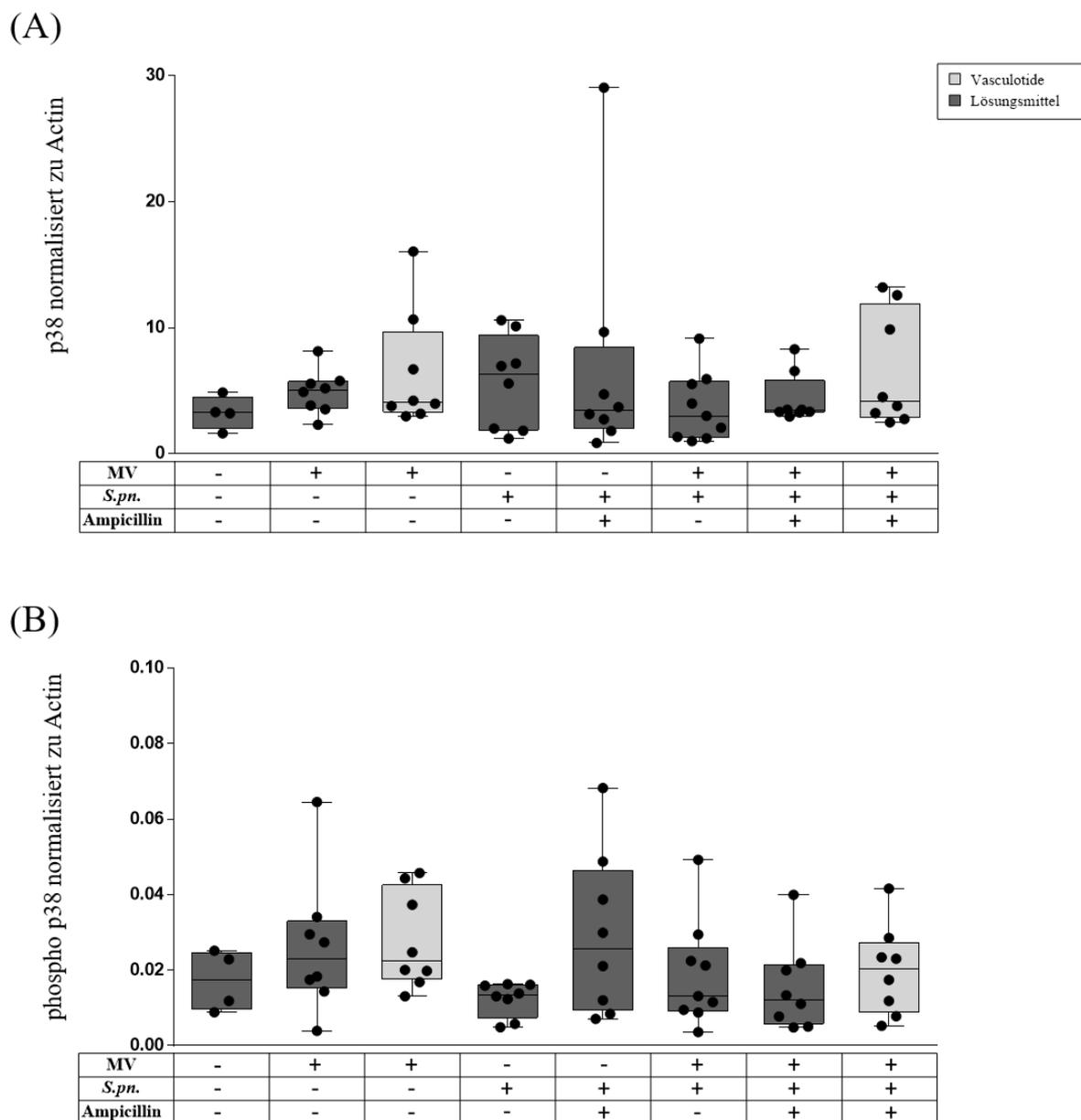


(C)

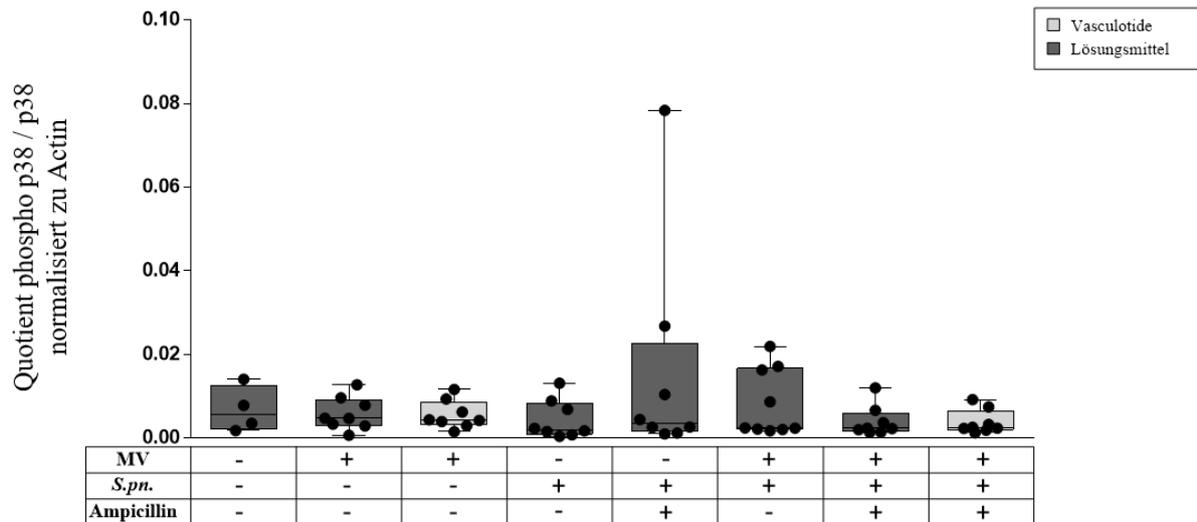


**Abbildung 3.32 Phosphorylierung von p38 30 h p.i. im Lungenhomogenat.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase.

Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Zur Beurteilung der Phosphorylierung von p38 wurden die Proteine aus dem Lungenhomogenat isoliert und für den Western Blot aufbereitet. Der Western Blot wurde mit 10 %igem Gel durchgeführt und das Blotten erfolgte semi-dry. Danach wurde die Membran jeweils mit Antikörpern für phospho p38, p38 und Actin als Housekeeping Protein inkubiert und mittels Immunfluoreszenz im Licor entwickelt (Kontrolle n=4, restliche Gruppen n=8-9, es wurden pro Gruppe zwei repräsentative Proben für die Abbildung ausgewählt), die erste Bande zeigt den Marker, (A) p38, (B) phospho p38, (C) Actin.



**Abbildung 3.33 p38 und phospho p38 30 h p.i. im Lungenhomogenat.** 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Zur Beurteilung der Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors wurden die Proteine aus dem Lungenhomogenat isoliert und für den Western Blot aufbereitet. Der Western Blot wurde mit 10 %igem Gel durchgeführt und das Blotten erfolgte semi-dry. Danach wurde die Membran jeweils mit Antikörpern für phospho p38, p38 und Actin als Housekeeping Protein inkubiert, mittels Immunfluoreszenz im Licor entwickelt und densitometrisch ausgewertet. (A) p38 normalisiert zu Actin, (B) phospho p38 normalisiert zu Actin. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test)



**Abbildung 3.34** Quotient aus phosphoryliertem p38 zu p38 30 h p.i. im Lungenhomogenat. 24 h nach i.n. Applikation von *S. pn.* (Kontrolle PBS + Hyaluronidase) begann eine 6-stündige Beatmungsphase. Zuvor erfolgte 22 h p.i. die intravenöse Gabe von 500 ng VT (Kontrolle PBS) und 0,4 mg Ampicillin (Kontrolle 0,9 % NaCl). Eine weitere Dosis von VT zusammen mit 1 mg HSA wurde 1,5 h vor Versuchsende verabreicht. Zur Beurteilung der Phosphorylierung des Tie2-Rezeptors wurden die Proteine aus dem Lungenhomogenat isoliert und für den Western Blot aufbereitet. Der Western Blot wurde mit 10 %igem Gel durchgeführt und das Blotten erfolgte semi-dry. Danach wurde die Membran jeweils mit Antikörpern für phospho p38, p38 und Actin als Housekeeping Protein inkubiert, mittels Immunfluoreszenz im Licor entwickelt und densitometrisch ausgewertet. Die Werte sind aufgeführt als Median + IQR mit Minimal-/ Maximalwerten, Einzelwerte als Punkte (Kontrolle n=4, restl. Gruppen n=7-8, Mann-Whitney-U-Test)

## 4 Diskussion

### 4.1 Nur die Kombinationstherapie aus Ampicillin und Vasculotide reduzierte die Hyperpermeabilität und die Lungenschädigung bei *Streptococcus pneumoniae* infizierten und maschinell beatmeten Tieren

Die Wirksamkeit von VT bei der Reduktion der pulmonalen Hyperpermeabilität in der schweren murinen Pneumokokkenpneumonie ohne zusätzliche Beatmung wurde bereits nachgewiesen (112) und konnte auch in den nicht beatmeten Kontrollgruppen dieser Arbeit beobachtet werden (vgl. Abbildung 3.2). Auch die positiven Effekte einer frühzeitig begonnenen antibiotischen Therapie auf die Permeabilität wurden schon früher beschrieben (122) und auch in dieser Arbeit in den nicht beatmeten Kontrollgruppen bestätigt (vgl. Abbildung 3.2). Allerdings konnten diese Effekte der jeweiligen Monotherapie im Modell der doppelten Lungenschädigung durch *S. pn.* und maschinelle Beatmung nicht mehr festgestellt werden, während sich die Kombinationstherapie aus VT und Ampicillin wiederum als effektiv erwies. Es ist anzunehmen, dass im Falle von zusätzlicher Beatmung die entzündliche Lungenschädigung so groß ist, dass eine alleinige Therapie mit VT oder Ampicillin keine ausreichende Wirksamkeit mehr entfalten kann. Die Behandlung mit Ampicillin führt in erster Linie zur Eindämmung der systemischen Inflammation und bakteriellen Dissemination, was sich in reduzierten systemischen Zytokinkonzentrationen und geringerer bakterieller Last im Blut widerspiegelt (122). Dieser Effekt zeigte sich auch in den gleichzeitig infizierten und maschinell beatmeten Versuchsgruppen, jedoch ohne in diesem Fall einen positiven Einfluss auf die pulmonale Permeabilität zu haben. Die Wirkung von Ampicillin auf die Hyperpermeabilität lässt sich vermutlich auf die Reduktion der systemischen Inflammation zurückführen. Kennzeichen einer Sepsis ist, neben anderen Merkmalen, vor allem die Organdysfunktion (123), die sowohl durch die beeinträchtigte Hämodynamik, als auch durch die generalisierte vaskuläre Hyperpermeabilität infolge einer Überstimulation der Immunantwort ausgelöst wird (124). Wird nun im Falle einer Pneumokokkenpneumonie der Auslöser einer Sepsis frühzeitig durch Ampicillin bekämpft, sodass die pathologische Überstimulation ausbleibt, wird auch die Hyperpermeabilität eingeschränkt. Im Gegensatz dazu nimmt Ampicillin jedoch keinen Einfluss auf die sterile Inflammation, die durch MV induziert wird, da der schädigende Stimulus kein Pathogen ist, welches durch ein Antibiotikum eliminiert werden könnte. VT wirkt über eine Stabilisierung des Endothels und kann somit sowohl in einer sterilen als auch in einer bakteriellen Entzündung die Permeabilität verringern. Der vollständig

ausbleibende Effekt einer Monotherapie im doppelten Schädigungsmodell spricht dafür, dass sich die unterschiedlichen Schädigungsmechanismen gegenseitig verstärken, sich also nicht bloß addieren, sondern potenzieren. Diese Vermutung wird auch durch eine Untersuchung von Müller-Redetzky *et al.* gestützt, in der nachgewiesen wurde, dass der kombinierte Lungenschaden durch Pneumonie und Beatmung zu einer wesentlich höheren Inflammation (gemessen durch Zytokine und Chemokine) sowie Permeabilität führt, als die reine Addition dieser Werte jeweils für alleinige Infektion bzw. Ventilation (125). Dadurch, dass Ampicillin und VT an unterschiedlichen Systemen im Rahmen der Lungenschädigung angreifen, kann durch eine Kombination beider Medikamente wieder Wirksamkeit erzielt werden.

Diese Interpretation wird auch durch die Ergebnisse der histologischen Untersuchung unterstützt. Vor allem der Beatmungsschaden wurde durch die Therapie mit VT reduziert, während Ampicillin in erster Linie auf die pneumonischen Infiltrate in der Lunge wirkte, aber nur die Kombination beider Therapeutika zeigte eine deutliche Verbesserung des gesamten histologischen Schädigungsgrads. Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass in der einfachen murinen Pneumokokkenpneumonie sowohl VT als auch eine frühzeitige antibiotische Therapie die Ausbildung eines Lungenödems verringern (112, 122). Somit ist auch histopathologisch eine Wirksamkeit beider Monotherapien in der Pneumonie ohne zusätzliche Beatmung nachweisbar, während in der zusätzlichen Schädigung durch MV nur eine Kombinationstherapie aus VT und Ampicillin eine sinnvolle Therapieoption zu sein scheint.

#### 4.2 Vasculotide beeinflusste die Permeabilität unabhängig von der bakteriellen Last und dem innaten Immunsystem

Die Ausbildung eines Lungenödems in der Pneumokokkenpneumonie wird vor allem durch zwei schädigende Einflüsse verursacht: Einerseits durch die Bakterien und ihre Pathogenitätsfaktoren wie Pneumolysin, die die Lungenbarriere direkt schädigen (17). Andererseits durch neutrophile Granulozyten, die durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine weitere Immunzellen anlocken und gleichzeitig die endotheliale Permeabilität vergrößern, um die leukozytäre Diapedese zu erleichtern (126, 127).

In der hier durchgeführten Untersuchung zeigte sich kein Einfluss von VT auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten oder die ausgeschütteten Zytokine. Auch die systemische sowie lokale bakterielle Last wurden von der VT-Therapie nicht reduziert, sondern lediglich durch die Gabe von Ampicillin. Dennoch konnte eine Reduktion der Permeabilität festgestellt werden,

was dafür spricht, dass VT die endotheliale Instabilität über einen von diesen beiden Faktoren unabhängigen Weg vermindern kann. Gleiche Ergebnisse konnten bereits zuvor in der einfachen Pneumokokkenpneumonie mit VT Behandlung erzielt werden (112). Auch in einem Modell der Influenza-Virus Pneumonie wurde eine Verminderung der pulmonalen Hyperpermeabilität durch VT nachgewiesen, jedoch ohne dass VT die Viruslast oder die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beeinflusst hätte (116). Im Gegensatz dazu gibt es allerdings auch Arbeiten, die eine Reduktion der neutrophilen Granulozyten nachweisen konnten. In einem Modell einer peritoneal induzierten Sepsis hatte VT einen signifikanten Effekt auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten sowohl in die Bauchhöhle als auch in die Nieren im Rahmen eines Sepsis-induzierten akuten Nierenversagens (113). Des Weiteren wurden die systemischen und lokalen Zytokinkonzentrationen in diesem Modell reduziert, was ebenfalls in Kontrast zu den in dieser und anderen Arbeiten erhobenen Ergebnissen steht. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede findet sich in der Applikationsart. Im Falle des Peritonitis Modell mit daraus folgender Sepsis wurde VT i.p. und nicht, wie in der hier vorliegenden Arbeit, i.v. verabreicht, sodass es nicht nur systemisch wirken konnte, sondern möglicherweise lokal eine höhere Konzentration erreicht wurde. Vielleicht könnte in den Pneumonie Modellen eine noch bessere Wirksamkeit durch zusätzliche inhalative Gaben von VT erzeugt werden, sofern dies pharmakokinetisch realisierbar wäre. Außerdem wurden die Mäuse im Peritonitis Modell mit VT behandelt, bevor die Peritonitis induziert wurde, während in der Pneumokokken und Influenza Pneumonie die erste Gabe von VT entweder zusammen mit der Infektion erfolgte oder sogar erst mehrere Stunden später. Somit wäre es möglich, dass die präventive Gabe von VT einen höheren Nutzen aufweist als die therapeutische. Dafür spricht, dass das Überleben in den vorbehandelten Gruppen der Mäuse mit Peritonitis besser war, als das einer Gruppe, die VT erst nach der Etablierung einer Peritonitis erhielt. Klinisch sind jedoch mit Sicherheit die Effekte einer therapeutischen Gabe von größerer Relevanz, da eine präventive Gabe von Medikamenten meist besonderen Risikogruppen vorbehalten bleibt und nicht in der breiten Bevölkerung eingesetzt werden kann.

Auch in Modellen einer sterilen Entzündung, wie beim Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere oder der Neuroinflammation nach einem Schlaganfall konnten eine reduzierte Infiltration mit Immunzellen und geringere Zytokin-Level durch die Gabe von VT erreicht werden (109-111). In diesen Versuchen handelte es sich ebenfalls um präventive Gaben, was die Schlussfolgerung nahelegt, dass die möglichen immunmodulatorischen Effekte von VT vom Zeitpunkt der ersten Applikation abhängig sein könnten. Möglicherweise ist auch die Reaktion der Immunzellen auf VT verzögert oder auch schwächer als auf einen inflammatorischen

Stimulus, sodass bei der therapeutischen Gabe kein Effekt beobachtet werden kann, weil dieser von der Entzündungsreaktion überdeckt wird.

Des Weiteren existieren Monozyten, die den Tie2-Rezeptor exprimieren (78), sodass auch eine direkte Beeinflussung von Immunzellen durch VT möglich wäre. Ein solcher Effekt konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden, da beispielsweise *in vitro* Stimulationsversuche mit isolierten Makrophagen keinen Einfluss auf die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen zeigen konnten (113). Dennoch ist bisher die Wirkungsweise von VT noch nicht abschließend geklärt, sodass Effekte auf Immunzellen oder andere Zelltypen nicht ausgeschlossen werden können.

Inwiefern eine antiinflammatorische Wirkung von VT therapeutisch erwünscht ist, hängt vor allem auch von der zugrunde liegenden Erkrankung ab. Im Falle von sterilen Entzündungszuständen, in denen die Leukozyten keine Abwehrfunktion gegen von außen eindringende Pathogene übernehmen müssen und so der durch sie verursachte Schaden den Nutzen überwiegt, könnte sich eine Hemmung der Entzündungsreaktion durchaus positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken. Im Gegensatz dazu ist bei Infektionskrankheiten wie der Pneumonie eine funktionierende Immunabwehr essentiell für die erfolgreiche Bekämpfung der Pathogene und eine Beeinträchtigung der Immunreaktion könnte zu einer weiteren Ausbreitung der Erreger beitragen und im schlimmsten Fall zu einer Sepsis führen beziehungsweise eine bereits bestehende Sepsis vorantreiben. Bei der Sepsis ist wiederum der Nutzen einer Immunsuppression umstritten. Zwar liegt der Sepsis eine Infektion zugrunde, sodass man grundsätzlich von einem negativen Effekt ausgehen müsste, jedoch ist die Sepsis durch eine inadäquate Reaktion des Wirtsorganismus auf die Infektion gekennzeichnet, welche mit einer Hyperinflammation einhergeht (123). Aus diesem Grund wurden Studien zum Nutzen einer moderaten Immunsuppression durchgeführt, die Hinweise auf eine reduzierte Mortalität durch die Nutzung monoklonaler TNF- $\alpha$ -Antikörper gegenüber konventionellen Therapieregimen zeigen konnten (128). Allerdings bieten die vorliegenden Studien noch nicht ausreichende Evidenz für eine generelle Therapieempfehlung (128). Die Immunsuppression in der Sepsis wird bisher nur mit Hydrocortison als Ultima Ratio im therapierefraktären septischen Schock empfohlen (129). Hier könnte eine antiinflammatorische Wirkung des Tie2-Agonismus eine interessante neue Therapieoption darstellen, da VT als Ang-1 Mimetikum weniger bekannte Nebenwirkungen aufweist als Glucocorticoide und so eine schonendere Therapie ermöglichen könnte. Außerdem könnte es dazu beitragen, das in der Sepsis gestörte Gleichgewicht zwischen Ang-1 und Ang-2 wiederherzustellen (102). Für diese Anwendung bedarf es allerdings noch

weiterer Studien und eines besseren Verständnisses der zugrundeliegenden Signalkaskaden. Aus diesem Grund sollte die Wirkung von VT auf das Immunsystem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* noch genauer untersucht werden, um mögliche unerwartete Effekte abschätzen zu können.

#### 4.3 Die Vitalparameter wurden durch die Vasculotide Therapie nicht beeinflusst

In der Überwachung kritisch kranker Patienten spielt vor allem die kontinuierliche Messung der Vitalparameter, die Kontrolle der Beatmungsdrücke bei MV und die Beurteilung der Organsysteme über regelmäßige Blutentnahmen insbesondere durch die BGA eine Rolle. Oftmals erfolgt darüber auch die Beurteilung des Therapieerfolgs. In der hier durchgeführten Arbeit wurden die Tiere über den Beatmungszeitraum ebenfalls kontinuierlich überwacht und am Ende des Versuchs eine BGA durchgeführt. Hier zeigte sich keine Verbesserung der erhobenen Parameter durch die VT-Therapie.

Obgleich die Reduktion des Lungenödems im HSA-ELISA und histopathologisch nachgewiesen werden konnte, gab es keinen signifikanten Unterschied in der gemessenen Sauerstoffsättigung des Bluts. Weder die nichtinvasive pulsoxymetrische Messung über eine Schwanzklemme, noch die BGA im Anschluss an die finale Blutentnahme konnten einen Vorteil der VT-Therapie gegenüber reiner Antibiose aufdecken. Eine Verbesserung der Blutoxygenierung als indirektes Maß für die Funktionalität des Gasaustausches konnte jedoch in dem bereits erwähnten Modell einer Influenzapneumonie nachgewiesen werden (116). Hier zeigte sich außerdem ein signifikant positiver Einfluss der VT-Behandlung auf das Körpergewicht, auf die Körpertemperatur und das Überleben der Mäuse. Ein vergleichbarer Effekt konnte in der Pneumokokkenpneumonie weder in dieser Arbeit noch in der vorangegangenen Studie nachgewiesen werden (112). Da es sich um unterschiedliche Pathogene handelt, könnte die Erklärung für diese Diskrepanz darin begründet sein, dass der Krankheitsverlauf der Pneumokokkenpneumonie gerade in dem hier verwendeten Modell als akut zu bezeichnen ist und ein Großteil der Versuchstiere bereits nach 24 h mit Hypothermie und Gewichtsverlust Zeichen einer Sepsis aufweist. Im Vergleich dazu hat die reine Influenzapneumonie aus der genannten Studie einen milderen Krankheitsverlauf, bei dem sich der Gewichtsverlust und die Hypothermie über mehrere Tage entwickeln. So ist die Wirkung von VT möglicherweise bei einer langsameren Symptomentwicklung besser als bei einer raschen Zustandsverschlechterung. Des Weiteren ist die pulsoxymetrische Messung der Sauerstoffsättigung eine relativ ungenaue Messmethode, bei der die Werte durch einen zu

niedrigen Blutdruck und eine daraus resultierende schlechte periphere Perfusion beeinflusst werden können, sodass die Aussagekraft begrenzt ist. Die in der BGA gemessenen Sauerstoffpartialdrücke sowie die Sauerstoffsättigung sind im Vergleich zur Pulsoxymetrie zuverlässiger. Hier konnte zwar eine deutliche Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks durch maschinelle Beatmung kombiniert mit Infektion gezeigt werden, aber die Gabe von VT führte zu keiner Verbesserung (vgl. Abbildung 3.3). Um ein aussagekräftiges Ergebnis bezüglich der Wirkung von VT auf die Sauerstoffsättigung in der Pneumokokkenpneumonie zu erzielen, wäre ergänzend eine gezielte Untersuchung der Sauerstoffsättigung zu verschiedenen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf nötig. Für die Durchführung von klinischen Studien wäre außerdem auch eine nichtinvasive Möglichkeit zur Beurteilung des Therapieerfolges wünschenswert, wie zum Beispiel die Pulsoxymetrie. Alternativ könnte in der präklinischen Phase auch noch die Option einer Röntgenuntersuchung des Thorax oder eine Lungensonographie zum Monitoring evaluiert werden, um eine nichtinvasive Beurteilung des Lungenödems zu ermöglichen. In einem intensivmedizinischen Bereich wäre auch die Messung des extravaskulären Lungenwassers mittels transpulmonaler Thermodilution in Kombination mit einer Pulsokturanalyse eine Option zum erweiterten Monitoring.

Bei einer endothelwirksamen Therapie muss vor allem auch eine mögliche Beeinflussung des Blutdrucks untersucht werden, da eine hypertensive Wirkung wie auch eine medikamentös induzierte Hypotonie gerade in der Intensivmedizin therapielimitierend sein können. In den hier gemessenen Werten für Blutdruck und Herzfrequenz konnte kein negativer Effekt einer VT Therapie im Sinne einer relevanten unerwünschten Arzneimittelreaktion beobachtet werden. Da die Aktivierung des Tie2-Rezeptors verschiedene Signalkaskaden innerhalb der Endothelzellen anstößt, ist eine kreislaufrelevante Wirkung von VT theoretisch noch nicht ausgeschlossen, auch wenn sich hier keine Anhaltspunkte dafür ergeben haben. Auch zwei weitere Studien zu VT haben Blutdruckmessungen durchgeführt und ebenfalls keine relevante Wirkung der VT-Therapie auf den arteriellen Mitteldruck festgestellt (109, 114). Eine abschließende Beurteilung kann jedoch erst in einer zukünftigen klinischen Studie mit größeren Fallzahlen und auch längeren Therapiezeiträumen erfolgen.

Ein klinisch relevanter Einfluss auf den trachealen Spitzendruck als Hinweis auf einen Beatmungsschaden konnte ebenfalls nicht beobachtet werden, sondern lediglich eine Tendenz zu niedrigeren Drücken bei VT behandelten Tieren. Da bisher keine weitere Literatur zur Anwendung von VT bei maschineller Beatmung existiert, müsste dieser Sachverhalt in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden. Ein Effekt ließe sich wohlmöglich

mit höheren Tidalvolumina oder dem Vergleich unterschiedlicher Beatmungsstrategien besser detektieren und beurteilen.

#### 4.4 Der Einfluss von Vasculotide auf ein Multiorganversagen konnte in den vorliegenden Versuchen nicht beurteilt werden

In einer früheren Arbeit zum Beatmungsschaden bei Pneumokokkenpneumonie konnte ein deutlicher extrapulmonaler Endorganschaden in Leber und Niere festgestellt werden (125). Als Indikatoren für ein Organversagen wurde in der vorliegenden Arbeit einerseits eine histopathologische Beurteilung der entsprechenden Organe durchgeführt, andererseits wurden als Surrogatparameter für die Leberfunktion die Transaminasen AST und ALT sowie für die Nierenfunktion Kreatinin bestimmt. Obgleich in dieser Arbeit mit demselben Beatmungsmodell gearbeitet und für die Infektion derselbe Pneumokokken-Serotyp verwendet wurde, konnte kein signifikanter Endorganschaden im Sinne eines MOV festgestellt werden. Die histopathologischen Veränderungen sowie die Erhöhung der Transaminasen und des sensitiveren Markers für die Nierenfunktion Cycstatin C konnten allenfalls als moderat gewertet werden und lieferten keinen Anhalt für ein Organversagen, bei dem man wesentlich höhere Werte der entsprechenden Parameter erwarten würde. Im Falle dieser milden Schädigung konnte kein protektiver Effekt von VT festgestellt werden. Andere Studien konnten jedoch zeigen, dass VT auch auf andere Organsysteme als die Lunge Einfluss nehmen kann. In einem Modell des akuten Nierenschadens wurde eine signifikante Reduktion von Kreatinin und Blutharnstoff-Stickstoff (Blood-Urea-Nitrogen, BUN) als Maß für eine verbesserte Nierenfunktion durch VT-Therapie beschrieben (109). Auch in der tierexperimentellen abdominalen Sepsis hatte VT einen protektiven Effekt auf die Ausbildung von Nierenschäden sowie auf den akuten Leberschaden (113). Im Gegensatz dazu wurde in einer Arbeit zum hämorrhagischen Schock ebenfalls eine Reduktion der pulmonalen Permeabilität festgestellt, ohne dass ein vergleichbarer Effekt in der Niere detektiert werden konnte (114). Das MOV als Folge eines septischen Krankheitsverlaufs entsteht durch eine Minderperfusion der Organe. Diese wird unter anderem durch eine Fehlverteilung des intravasalen Volumens bei generalisierter Hyperpermeabilität bedingt und könnte in der Theorie demnach durch eine Endothelstabilisierung mit VT behandelt werden. In der Literatur finden sich mehrere Arbeiten, die belegen, dass VT vor allem einen protektiven Effekt auf den akuten Nierenschaden sowie den akuten Lungenschaden hat (1, 109, 110, 112, 116) Für andere Organsysteme existieren lediglich Hinweise (111, 113), aber noch keine ausreichende Evidenz. Dass die Lunge besonders gut auf eine VT Therapie anspricht, könnte darin begründet sein, dass der Tie2-

Rezeptor im pulmonalen Endothel in höherer Dichte lokalisiert ist als in anderen Organen (130) und VT damit in der Lunge eine stärkere Wirkung als in anderen Organen entfalten kann. Die Niere ist durch das physiologisch bereits schlecht durchblutete Mark besonders vulnerabel für eine Minderperfusion, wohingegen die Leber beispielweise sehr gut durchblutet ist und dementsprechend eine höhere Ischämietoleranz aufweist. Somit wäre es aufgrund der Physiologie zu erwarten, dass auch die Niere besonders gut auf eine VT-Therapie anspricht. Da in dieser Arbeit auch ohne jegliche Therapie kein nennenswerter extrapulmonaler Organschaden entstanden ist, kann auch die Wirkung von VT hier nicht abschließend beurteilt werden. Möglicherweise war der Analysezeitpunkt zu früh gewählt, sodass die Schädigung zwar begonnen hatte, wie der Anstieg der Transaminasen impliziert, aber noch nicht von einem Organversagen ausgegangen werden kann. Rübzig *et al.* konnten auch erst mehrere Tage nach dem Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere mittels Abklemmen der Nierenarterien signifikante Unterschiede in den Retentionsparametern detektieren (109). Außerdem konnte die systemische Inflammationsreaktion durch die frühzeitige Antibiotikatherapie in diesem Modell deutlich reduziert werden, sodass auch die Wahrscheinlichkeit für ein septisches Organversagen geringer ist. Insgesamt scheint das hier verwendete Modell nicht geeignet zu sein, um eine Aussage über den Effekt einer VT Behandlung auf das MOV in der Pneumokokkenpneumonie mit gleichzeitiger maschineller Beatmung zu treffen. Außerdem wäre es in zukünftigen Arbeiten auch interessant die Wirkung von VT auf andere Organsysteme als Lunge und Niere gesondert zu betrachten, zum Beispiel ob auch bei einer Hepatitis oder einer Mesenterialischämie eine protektive Wirkung erzielt werden kann.

#### 4.5 Die Expression von Tie2 wurde sowohl durch die Pneumokokkeninfektion als auch durch die Beatmung reduziert

Bereits in den vorangegangenen Arbeiten zum therapeutischen Effekt von VT konnte eine Reduktion der Expression des Tie2-Rezeptors beim akuten Lungenschaden nachgewiesen werden (1). Dieser Verlust des Rezeptors konnte nun auch im beatmungsassoziierten Lungenschaden in der Pneumokokkenpneumonie nachgewiesen werden, wobei sich jedoch kein zusätzlicher Effekt bei der Kombination aus Beatmungsschaden und Pneumonie zeigte. Da bereits durch die Pneumonie die Expression auf das 0,2- bis 0,4-fache ihres Ausgangswertes reduziert wurde, könnte es auch sein, dass die qPCR in diesen geringen Konzentrationen nicht mehr sensitiv genug war, um feinere Unterschiede zu differenzieren. In der beatmeten Gruppe ohne zusätzliche Infektion zeigte sich auch eine Tendenz zur reduzierten Tie2-Expression, wobei der Effekt nicht so ausgeprägt war wie bei der Infektion mit Pneumokokken. Um die

Auswirkung der maschinellen Beatmung auf die Expression des Tie2-Rezeptors differenzierter zu betrachten, wären auch hier zusätzliche Versuche mit unterschiedlichen Beatmungsstrategien sinnvoll. Ein Effekt von VT auf die Tie2-Expression konnte weder in dieser noch in anderen Arbeiten nachgewiesen werden (1), was nahelegt, dass die protektive Wirkung von VT im akuten Lungenschaden nicht auf eine vermehrte Induktion der Expression von Tie2 zurückzuführen ist.

#### 4.6 Die Wirkungsweise von Vasculotide als Tie2-Agonist konnte nur *in vitro* nachgewiesen werden

Da VT aus einem synthetischen Protein generiert wurde, welches speziell wegen seiner Bindungsaffinität zum Tie2-Rezeptor ausgewählt wurde (106), liegt der Schluss nahe, dass es seine Wirkung über eine Aktivierung von Tie2 entfaltet. Nicht nur in dieser, sondern auch in vielen weiteren Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass VT sowohl *in vitro* als auch *in vivo* den Tie2-Rezeptor ebenso wie Ang-1 aktivieren kann, was in einer Zunahme des phosphorylierten Rezeptors resultiert (1, 113, 116). Somit kann von einer Wirkung von VT auf Tie2 ausgegangen werden. *In vitro* konnte auch in dieser Arbeit die Aktivierung von Tie2 durch VT nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war es in dieser Arbeit und in einer Studie zur Tumormetastasierung aus dem Jahr 2015 nicht möglich, *in vivo* eine derartige vermehrte Aktivierung festzustellen (117). Wu *et al.* folgerten daraus, dass es noch weitere Tie2-unabhängige Wirkungsweisen von VT geben müsse (117). Obgleich dies auch eine interessante Hypothese darstellt, muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass der fehlende Nachweis durch methodische Schwierigkeiten bedingt sein könnte. Der phosphorylierte Tie2-Rezeptor wird überwiegend semi-quantitativ im Western Blot untersucht, was verschiedene Fehlerquellen birgt. Einerseits ist es möglich, dass die Phosphorylierung im Verlauf der Lagerung bei -80 °C oder in der Proteinisolation zu einem gewissen Anteil beeinträchtigt wird oder verloren geht. Andererseits wird die Expression des Tie2-Rezeptors durch die Infektion mit Pneumokokken stark dezimiert, sodass der Western Blot möglicherweise nicht mehr sensitiv genug ist und vorhandene Unterschiede nicht entdeckt werden können. Des Weiteren könnte der Analysezeitpunkt 90 min nach der letzten VT Applikation zu spät gewählt sein. In der Zellkultur wurde die maximale Phosphorylierung von Tie2 20 bis 30 min nach der Gabe von VT beobachtet (107), wobei David *et al.* *in vivo* eine 72 bis 96 h anhaltende Phosphorylierung feststellen konnten (1). Zur Klärung dieser Frage könnten immunhistochemische Färbungen der untersuchten Lungen hilfreich sein, in denen Unterschiede möglicherweise deutlicher zu Tage treten würden. Auch Immunpräzipitation oder

die direkte Weiterverarbeitung der Lungenproben für den Western Blot ohne Lagerung bei - 80 °C könnten dazu beitragen, noch genauere Ergebnisse zu erzeugen. Eine weitere Möglichkeit, die gewonnenen Ergebnisse zu validieren, besteht darin, die nachgeschalteten Signalkaskaden der Tie2-Aktivierung zu untersuchen, in denen unter anderem die MAPK p38 eine zentrale Rolle einnimmt. In dieser Arbeit konnte jedoch keine vermehrte Phosphorylierung von p38 durch die VT Therapie nachgewiesen werden. In den bisher vorliegenden tierexperimentellen Daten zur Wirkung von VT wurde p38 noch nicht genauer betrachtet, es gibt lediglich *in vitro* Versuche, die eine vermehrte Aktivierung von p38 als Folge einer COMP-Ang-1 induzierten Phosphorylierung von Tie2 nahelegen (89).

Aktuell liegen noch nicht genug Ergebnisse vor, um die Frage nach der Wirkung von VT auf zellulärer Ebene abschließend zu klären. Die Aktivierung von Tie2 durch VT konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden, aber die dadurch aktivierten Signalkaskaden sowie mögliche Tie2 unabhängige Wirkungsweisen von VT sind noch Gegenstand der aktuellen Forschung.

#### 4.7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass VT in einem Modell der schweren Pneumonie mit MV und Antibiotikatherapie einen protektiven Effekt auf die pulmonale Hyperpermeabilität und somit die Ausbildung eines pulmonalen Ödems hatte. Auf diesen Ergebnissen aufbauend ist geplant, die Wirkung von VT in einem Schweinemodell schwerer Pneumonie mit MV zu untersuchen (Planung und Durchführung durch Bassi *et al.*). In diesem Modell besteht die Möglichkeit, die Beatmung über einen längeren, klinisch relevanteren Zeitraum fortzuführen. Außerdem kann im Großtiermodell ein intensivmedizinisch realistisches erweitertes hämodynamisches Monitoring mit Pulmonalkatheter und transpulmonaler Thermodilution mit Pulskonturanalyse implementiert werden, sodass Unterschiede in der Therapie möglicherweise bereits im Versuchsverlauf detektiert werden können. Außerdem können so mögliche Nebenwirkungen einer längerfristigen VT Therapie genauer untersucht werden, sodass der Weg für klinische Studien gebahnt werden kann.

Darüber hinaus soll die Wirkung von VT auch noch in weiteren Infektionsmodellen mit anderen Erregern der Pneumonie wie *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Legionella pneumophila* untersucht werden. So können noch mehr Erkenntnisse über die klinischen Möglichkeiten der Anwendung sowie über eventuelle Limitationen gewonnen werden.

Die Wirkungsweise von VT auf zellulärer Ebene konnte bisher weder in früheren noch in dieser Studie abschließend beurteilt werden. Aus diesem Grund sollen weitere Untersuchungen erfolgen, in denen die Signalkaskaden vor allem im Hinblick auf die Junctionsproteine der endothelialen Integrität und die Induktoren sowie Hemmer der Apoptose analysiert werden. Damit verbunden ist auch die Exploration der Tie2 Wirkung auf das Epithel, welches als wichtiger Bestandteil der alveolokapillären Barriere zum jetzigen Zeitpunkt im Hinblick auf die Angiopoietinwirkung kaum erforscht ist.

## 5 Literaturverzeichnis

1. David S, Ghosh CC, Kumpers P, Shushakova N, Van Slyke P, Khankin EV, Karumanchi SA, Dumont D, Parikh SM. Effects of a synthetic PEG-ylated Tie-2 agonist peptide on endotoxemic lung injury and mortality. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;300(6):L851-62.
2. Eurich DT, Marrie TJ, Minhas-Sandhu JK, Majumdar SR. Ten-Year Mortality after Community-acquired Pneumonia. A Prospective Cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(5):597-604.
3. Feldman C, Anderson R. Epidemiology, virulence factors and management of the pneumococcus. *F1000Res*. 2016;5:2320.
4. Feldman C, Anderson R. Community-Acquired Pneumonia: Pathogenesis of Acute Cardiac Events and Potential Adjunctive Therapies. *Chest*. 2015;148(2):523-32.
5. Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(7).
6. Ewig S, Birkner N, Strauss R, Schaefer E, Pauletzki J, Bischoff H, Schraeder P, Welte T, Hoeffken G. New perspectives on community-acquired pneumonia in 388 406 patients. Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax*. 2009;64(12):1062-9.
7. Marrie TJ, Shariatzadeh MR. Community-acquired pneumonia requiring admission to an intensive care unit: a descriptive study. *Medicine (Baltimore)*. 2007;86(2):103-11.
8. Song JY, Choi JY, Lee JS, Bae IG, Kim YK, Sohn JW, Jo YM, Choi WS, Lee J, Park KH, Kim WJ, Cheong HJ. Clinical and economic burden of invasive pneumococcal disease in adults: a multicenter hospital-based study. *BMC Infect Dis*. 2013;13:202.
9. WHO. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization--WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2007;82(12):93-104.
10. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149(3 Pt 1):818-24.
11. Force ADT, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012;307(23):2526-33.
12. Arroliga AC, Ghamra ZW, Perez Trepichio A, Perez Trepichio P, Komara JJ, Jr., Smith A, Wiedemann HP. Incidence of ARDS in an adult population of northeast Ohio. *Chest*. 2002;121(6):1972-6.
13. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1685-93.

14. Bersten AD, Edibam C, Hunt T, Moran J, Australian, New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials G. Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(4):443-8.
15. Estenssoro E, Dubin A, Laffaire E, Canales H, Saenz G, Moseinco M, Pozo M, Gomez A, Baredes N, Jannello G, Osatnik J. Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2002;30(11):2450-6.
16. Goodman RB, Pugin J, Lee JS, Matthay MA. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(6):523-35.
17. Witznath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, Mitchell TJ, de los Toyos JR, Rosseau S, Suttrop N, Schutte H. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med.* 2006;34(7):1947-54.
18. Brower RG, Lanken PN, MacIntyre N, Matthay MA, Morris A, Ancukiewicz M, Schoenfeld D, Thompson BT, National Heart L, Blood Institute ACTN. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2004;351(4):327-36.
19. National Heart L, Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome Clinical Trials N, Wiedemann HP, Wheeler AP, Bernard GR, Thompson BT, Hayden D, deBoisblanc B, Connors AF, Jr., Hite RD, Harabin AL. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N Engl J Med.* 2006;354(24):2564-75.
20. Ludwig E, Bonanni P, Rohde G, Sayiner A, Torres A. The remaining challenges of pneumococcal disease in adults. *Eur Respir Rev.* 2012;21(123):57-65.
21. Huang SS, Johnson KM, Ray GT, Wroe P, Lieu TA, Moore MR, Zell ER, Linder JA, Grijalva CG, Metlay JP, Finkelstein JA. Healthcare utilization and cost of pneumococcal disease in the United States. *Vaccine.* 2011;29(18):3398-412.
22. Yende S, D'Angelo G, Kellum JA, Weissfeld L, Fine J, Welch RD, Kong L, Carter M, Angus DC, Gen IMSI. Inflammatory markers at hospital discharge predict subsequent mortality after pneumonia and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(11):1242-7.
23. Emsley HC, Hopkins SJ. Acute ischaemic stroke and infection: recent and emerging concepts. *Lancet Neurol.* 2008;7(4):341-53.
24. Smeeth L, Cook C, Thomas S, Hall AJ, Hubbard R, Vallance P. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet.* 2006;367(9516):1075-9.
25. Corrales-Medina VF, Suh KN, Rose G, Chirinos JA, Doucette S, Cameron DW, Fergusson DA. Cardiac complications in patients with community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *PLoS Med.* 2011;8(6):e1001048.
26. Mortensen EM, Copeland LA, Pugh MJ, Fine MJ, Nakashima B, Restrepo MI, de Molina RM, Anzueto A. Diagnosis of pulmonary malignancy after hospitalization for pneumonia. *Am J Med.* 2010;123(1):66-71.

27. Bruns AH, Oosterheert JJ, Cucciolillo MC, El Moussaoui R, Groenwold RH, Prins JM, Hoepelman AI. Cause-specific long-term mortality rates in patients recovered from community-acquired pneumonia as compared with the general Dutch population. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(5):763-8.
28. Ortqvist A, Hedlund J, Wretling B, Carlstrom A, Kalin M. Diagnostic and prognostic value of interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired pneumonia. *Scand J Infect Dis.* 1995;27(5):457-62.
29. Low FN. The pulmonary alveolar epithelium of laboratory mammals and man. *Anat Rec.* 1953;117(2):241-63.
30. Mackenzie GA, Leach AJ, Carapetis JR, Fisher J, Morris PS. Epidemiology of nasopharyngeal carriage of respiratory bacterial pathogens in children and adults: cross-sectional surveys in a population with high rates of pneumococcal disease. *BMC Infect Dis.* 2010;10:304.
31. van oud Alblas AB, van Furth R. Origin, Kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J Exp Med.* 1979;149(6):1504-18.
32. Jonsson S, Musher DM, Chapman A, Goree A, Lawrence EC. Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. *J Infect Dis.* 1985;152(1):4-13.
33. Jeyaseelan S, Chu HW, Young SK, Worthen GS. Transcriptional profiling of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Infect Immun.* 2004;72(12):7247-56.
34. Jeyaseelan S, Manzer R, Young SK, Yamamoto M, Akira S, Mason RJ, Worthen GS. Induction of CXCL5 during inflammation in the rodent lung involves activation of alveolar epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32(6):531-9.
35. Smart SJ, Casale TB. Pulmonary epithelial cells facilitate TNF-alpha-induced neutrophil chemotaxis. A role for cytokine networking. *J Immunol.* 1994;152(8):4087-94.
36. Kreisel D, Nava RG, Li W, Zinselmeyer BH, Wang B, Lai J, Pless R, Gelman AE, Krupnick AS, Miller MJ. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(42):18073-8.
37. Ellis JA, Mayer SJ, Jones OT. The effect of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium on aerobic and anaerobic microbicidal activities of human neutrophils. *Biochem J.* 1988;251(3):887-91.
38. Aarbiou J, Tjabringa GS, Verhoosel RM, Ninaber DK, White SR, Peltenburg LT, Rabe KF, Hiemstra PS. Mechanisms of cell death induced by the neutrophil antimicrobial peptides alpha-defensins and LL-37. *Inflamm Res.* 2006;55(3):119-27.
39. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature.* 2002;416(6878):291-7.
40. Haslett C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(5 Pt 2):S5-11.

41. Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(6):L1137-45.
42. Bou Ghanem EN, Clark S, Roggensack SE, McIver SR, Alcaide P, Haydon PG, Leong JM. Extracellular Adenosine Protects against *Streptococcus pneumoniae* Lung Infection by Regulating Pulmonary Neutrophil Recruitment. *PLoS Pathog*. 2015;11(8):e1005126.
43. TILGHMAN RC, FINLAND M. CLINICAL SIGNIFICANCE OF BACTEREMIA IN PNEUMOCOCCIC PNEUMONIA. *JAMA Internal Medicine*. 1937;59(4):602-19.
44. Evans GM, Gaisford W. TREATMENT OF PNEUMONIA WITH 2-(p-AMINOBENZENESULPHONAMIDO) PYRIDINE. *The Lancet*. 1938;232(5992):14-9.
45. Ewig S, Höffken G, Kern WV, Rohde G, Flick H, Krause R, Ott S, Bauer T, Dalhoff K, Gatermann S, Kolditz M, Krüger S, Lorenz J, Pletz M, Roux Ad, Schaaf B, Schaberg T, Schütte H, Welte T. S3-Leitlinie

Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie

und Prävention – Update 2016 2016 [Available from:  
[http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/020-0201\\_S3\\_ambulant\\_erworbene\\_Pneumonie\\_Behandlung\\_Praevention\\_2016-02-2.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-0201_S3_ambulant_erworbene_Pneumonie_Behandlung_Praevention_2016-02-2.pdf).

46. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967;2(7511):319-23.
47. Mongardon N, Max A, Bougle A, Pene F, Lemiale V, Charpentier J, Cariou A, Chiche JD, Bedos JP, Mira JP. Epidemiology and outcome of severe pneumococcal pneumonia admitted to intensive care unit: a multicenter study. *Crit Care*. 2012;16(4):R155.
48. Chacko B, Peter JV, Tharyan P, John G, Jeyaseelan L. Pressure-controlled versus volume-controlled ventilation for acute respiratory failure due to acute lung injury (ALI) or acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;1:CD008807.
49. Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. 1974;110(5):556-65.
50. Maunder RJ, Pierson DJ, Hudson LD. Subcutaneous and mediastinal emphysema. Pathophysiology, diagnosis, and management. *Arch Intern Med*. 1984;144(7):1447-53.
51. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137(5):1159-64.
52. Slutsky AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest*. 1999;116(1 Suppl):9S-15S.
53. Bilek AM, Dee KC, Gaver DP, 3rd. Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening. *J Appl Physiol (1985)*. 2003;94(2):770-83.

54. Albert RK. The role of ventilation-induced surfactant dysfunction and atelectasis in causing acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(7):702-8.
55. Mead J, Takishima T, Leith D. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J Appl Physiol.* 1970;28(5):596-608.
56. Gattinoni L, Marini JJ, Pesenti A, Quintel M, Mancebo J, Brochard L. The "baby lung" became an adult. *Intensive Care Med.* 2016;42(5):663-73.
57. Maunder RJ, Shuman WP, McHugh JW, Marglin SI, Butler J. Preservation of normal lung regions in the adult respiratory distress syndrome. Analysis by computed tomography. *JAMA.* 1986;255(18):2463-5.
58. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest.* 1997;99(5):944-52.
59. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA.* 1999;282(1):54-61.
60. Hol J, Wilhelmsen L, Haraldsen G. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *J Leukoc Biol.* 2010;87(3):501-8.
61. Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, O'Mahony DS, Glenny RW, Martin TR, Liles WC. Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Invest.* 2006;86(8):790-9.
62. Cabrera-Benitez NE, Parotto M, Post M, Han B, Spieth PM, Cheng WE, Valladares F, Villar J, Liu M, Sato M, Zhang H, Slutsky AS. Mechanical stress induces lung fibrosis by epithelial-mesenchymal transition. *Crit Care Med.* 2012;40(2):510-7.
63. Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, de Perrot M, Fischer S, Edwards V, Cutz E, Liu M, Keshavjee S, Martin TR, Marshall JC, Ranieri VM, Slutsky AS. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA.* 2003;289(16):2104-12.
64. Nahum A, Hoyt J, Schmitz L, Moody J, Shapiro R, Marini JJ. Effect of mechanical ventilation strategy on dissemination of intratracheally instilled *Escherichia coli* in dogs. *Crit Care Med.* 1997;25(10):1733-43.
65. Murphy DB, Cregg N, Tremblay L, Engelberts D, Laffey JG, Slutsky AS, Romaschin A, Kavanagh BP. Adverse ventilatory strategy causes pulmonary-to-systemic translocation of endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(1):27-33.
66. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med.* 2000;342(18):1301-8.
67. Serpa Neto A, Cardoso SO, Manetta JA, Pereira VG, Esposito DC, Pasqualucci Mde O, Damasceno MC, Schultz MJ. Association between use of lung-protective ventilation with lower tidal

- volumes and clinical outcomes among patients without acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis. *JAMA*. 2012;308(16):1651-9.
68. Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, Roelofs JJ, Juffermans NP, Schultz MJ. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care*. 2009;13(1):R1.
69. Terragni PP, Del Sorbo L, Mascia L, Urbino R, Martin EL, Birocco A, Faggiano C, Quintel M, Gattinoni L, Ranieri VM. Tidal volume lower than 6 ml/kg enhances lung protection: role of extracorporeal carbon dioxide removal. *Anesthesiology*. 2009;111(4):826-35.
70. Esteban A, Anzueto A, Frutos F, Alia I, Brochard L, Stewart TE, Benito S, Epstein SK, Apezteguia C, Nightingale P, Arroliga AC, Tobin MJ, Mechanical Ventilation International Study G. Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study. *JAMA*. 2002;287(3):345-55.
71. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996;22(7):707-10.
72. Hegeman MA, Hennis MP, Heijnen CJ, Specht PA, Lachmann B, Jansen NJ, van Vught AJ, Cobelens PM. Ventilator-induced endothelial activation and inflammation in the lung and distal organs. *Crit Care*. 2009;13(6):R182.
73. Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML. tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene*. 1992;7(8):1471-80.
74. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev*. 1994;8(16):1897-909.
75. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. 1996;87(7):1171-80.
76. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997;277(5322):55-60.
77. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, Kriz W, Thurston G, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood*. 2004;103(11):4150-6.
78. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, Naldini L. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell*. 2005;8(3):211-26.

79. Davis S, Papadopoulos N, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Huang T, Kovac L, Xu A, Leidich R, Radziejewska E, Rafique A, Goldberg J, Jain V, Bailey K, Karow M, Fandl J, Samuelsson SJ, Ioffe E, Rudge JS, Daly TJ, Radziejewski C, Yancopoulos GD. Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nat Struct Biol.* 2003;10(1):38-44.
80. Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH, Kwak HJ, Koh GY. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res.* 2000;86(1):24-9.
81. Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb RG, O'Connor DS, Li F, Altieri DC, Sessa WC. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem.* 2000;275(13):9102-5.
82. Hughes DP, Marron MB, Brindle NP. The antiinflammatory endothelial tyrosine kinase Tie2 interacts with a novel nuclear factor-kappaB inhibitor ABIN-2. *Circ Res.* 2003;92(6):630-6.
83. Daly C, Wong V, Burova E, Wei Y, Zabski S, Griffiths J, Lai KM, Lin HC, Ioffe E, Yancopoulos GD, Rudge JS. Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). *Genes Dev.* 2004;18(9):1060-71.
84. Kim M, Allen B, Korhonen EA, Nitschke M, Yang HW, Baluk P, Saharinen P, Alitalo K, Daly C, Thurston G, McDonald DM. Opposing actions of angiopoietin-2 on Tie2 signaling and FOXO1 activation. *J Clin Invest.* 2016;126(9):3511-25.
85. Stiehl T, Thamm K, Kaufmann J, Schaeper U, Kirsch T, Haller H, Santel A, Ghosh CC, Parikh SM, David S. Lung-targeted RNA interference against angiopoietin-2 ameliorates multiple organ dysfunction and death in sepsis. *Crit Care Med.* 2014;42(10):e654-62.
86. Harfouche R, Gratton JP, Yancopoulos GD, Nosedà M, Karsan A, Hussain SN. Angiopoietin-1 activates both anti- and proapoptotic mitogen-activated protein kinases. *FASEB J.* 2003;17(11):1523-5.
87. Harfouche R, Hussain SN. Signaling and regulation of endothelial cell survival by angiopoietin-2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(4):H1635-45.
88. Bi X, Niu J, Ding W, Zhang M, Yang M, Gu Y. Angiopoietin-1 attenuates angiotensin II-induced ER stress in glomerular endothelial cells via a Tie2 receptor/ERK1/2-p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;428:118-32.
89. Kook SH, Lim SS, Cho ES, Lee YH, Han SK, Lee KY, Kwon J, Hwang JW, Bae CH, Seo YK, Lee JC. COMP-angiopoietin 1 increases proliferation, differentiation, and migration of stem-like cells through Tie-2-mediated activation of p38 MAPK and PI3K/Akt signal transduction pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;455(3-4):371-7.
90. Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, Mochizuki N. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):513-26.
91. Gavard J, Patel V, Gutkind JS. Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Dev Cell.* 2008;14(1):25-36.

92. Saharinen P, Eklund L, Miettinen J, Wirkkala R, Anisimov A, Winderlich M, Nottebaum A, Vestweber D, Deutsch U, Koh GY, Olsen BR, Alitalo K. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):527-37.
93. Mammoto T, Parikh SM, Mammoto A, Gallagher D, Chan B, Mostoslavsky G, Ingber DE, Sukhatme VP. Angiopoietin-1 requires p190 RhoGAP to protect against vascular leakage in vivo. *J Biol Chem.* 2007;282(33):23910-8.
94. Hakanpaa L, Sipila T, Leppanen VM, Gautam P, Nurmi H, Jacquemet G, Eklund L, Ivaska J, Alitalo K, Saharinen P. Endothelial destabilization by angiopoietin-2 via integrin beta1 activation. *Nat Commun.* 2015;6:5962.
95. Benest AV, Kruse K, Savant S, Thomas M, Laib AM, Loos EK, Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietin-2 is critical for cytokine-induced vascular leakage. *PLoS One.* 2013;8(8):e70459.
96. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, Gale NW, Witzernath M, Rosseau S, Suttorp N, Sobke A, Herrmann M, Preissner KT, Vajkoczy P, Augustin HG. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med.* 2006;12(2):235-9.
97. Parikh SM, Mammoto T, Schultz A, Yuan HT, Christiani D, Karumanchi SA, Sukhatme VP. Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoS Med.* 2006;3(3):e46.
98. Orfanos SE, Kotanidou A, Glynos C, Athanasiou C, Tsigkos S, Dimopoulou I, Sotiropoulou C, Zakyntinos S, Armaganidis A, Papapetropoulos A, Roussos C. Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators. *Crit Care Med.* 2007;35(1):199-206.
99. Mankhambo LA, Banda DL, Group IPDS, Jeffers G, White SA, Balmer P, Nkhoma S, Phiri H, Molyneux EM, Hart CA, Molyneux ME, Heyderman RS, Carrol ED. The role of angiogenic factors in predicting clinical outcome in severe bacterial infection in Malawian children. *Crit Care.* 2010;14(3):R91.
100. Siner JM, Bhandari V, Engle KM, Elias JA, Siegel MD. Elevated serum angiopoietin 2 levels are associated with increased mortality in sepsis. *Shock.* 2009;31(4):348-53.
101. Kumpers P, Lukasz A, David S, Horn R, Hafer C, Faulhaber-Walter R, Fliser D, Haller H, Kielstein JT. Excess circulating angiopoietin-2 is a strong predictor of mortality in critically ill medical patients. *Crit Care.* 2008;12(6):R147.
102. Ricciuto DR, dos Santos CC, Hawkes M, Toltl LJ, Conroy AL, Rajwans N, Lafferty EI, Cook DJ, Fox-Robichaud A, Kahn moui K, Kain KC, Liaw PC, Liles WC. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 as clinically informative prognostic biomarkers of morbidity and mortality in severe sepsis. *Crit Care Med.* 2011;39(4):702-10.
103. Gutbier B, Neuhauss AK, Reppe K, Ehrler C, Santel A, Kaufmann J, Scholz M, Weissmann N, Morawietz L, Mitchell TJ, Aliberti S, Hippenstiel S, Suttorp N, Witzernath M, Capnetz, groups Ps.

Prognostic and Pathogenic Role of Angiopoietin-1 and -2 in Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018.

104. David S, Park JK, Meurs M, Zijlstra JG, Koenecke C, Schrimpf C, Shushakova N, Gueler F, Haller H, Kumpers P. Acute administration of recombinant Angiopoietin-1 ameliorates multiple-organ dysfunction syndrome and improves survival in murine sepsis. *Cytokine.* 2011;55(2):251-9.

105. Kanda S, Miyata Y, Mochizuki Y, Matsuyama T, Kanetake H. Angiopoietin 1 is mitogenic for cultured endothelial cells. *Cancer Res.* 2005;65(15):6820-7.

106. Tournaire R, Simon MP, le Noble F, Eichmann A, England P, Pouyssegur J. A short synthetic peptide inhibits signal transduction, migration and angiogenesis mediated by Tie2 receptor. *EMBO Rep.* 2004;5(3):262-7.

107. Van Slyke P, Alami J, Martin D, Kuliszewski M, Leong-Poi H, Sefton MV, Dumont D. Acceleration of diabetic wound healing by an angiopoietin peptide mimetic. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(6):1269-80.

108. Korpela E, Yohan D, Chin LC, Kim A, Huang X, Sade S, Van Slyke P, Dumont DJ, Liu SK. Vasculotide, an Angiopoietin-1 mimetic, reduces acute skin ionizing radiation damage in a preclinical mouse model. *BMC Cancer.* 2014;14:614.

109. Rubig E, Stypmann J, Van Slyke P, Dumont DJ, Spieker T, Buscher K, Reuter S, Goerge T, Pavenstadt H, Kumpers P. The Synthetic Tie2 Agonist Peptide Vasculotide Protects Renal Vascular Barrier Function In Experimental Acute Kidney Injury. *Sci Rep.* 2016;6:22111.

110. Thamm K, Njau F, Van Slyke P, Dumont DJ, Park JK, Haller H, David S. Pharmacological Tie2 activation in kidney transplantation. *World J Transplant.* 2016;6(3):573-82.

111. Venkat P, Yan T, Chopp M, Zacharek A, Ning R, Van Slyke P, Dumont D, Landschoot-Ward J, Liang L, Chen J. Angiopoietin-1 Mimetic Peptide Promotes Neuroprotection after Stroke in Type 1 Diabetic Rats. *Cell Transplant.* 2018;27(12):1744-52.

112. Gutbier B, Jiang X, Dietert K, Ehrler C, Lienau J, Van Slyke P, Kim H, Hoang VC, Maynes JT, Dumont DJ, Gruber AD, Weissmann N, Mitchell TJ, Suttorp N, Witzenrath M. Vasculotide reduces pulmonary hyperpermeability in experimental pneumococcal pneumonia. *Crit Care.* 2017;21(1):274.

113. Kumpers P, Gueler F, David S, Slyke PV, Dumont DJ, Park JK, Bockmeyer CL, Parikh SM, Pavenstadt H, Haller H, Shushakova N. The synthetic tie2 agonist peptide vasculotide protects against vascular leakage and reduces mortality in murine abdominal sepsis. *Crit Care.* 2011;15(5):R261.

114. Trieu M, van Meurs M, van Leeuwen ALI, Van Slyke P, Hoang V, Geeraedts LMG, Jr., Boer C, van den Brom CE. Vasculotide, an Angiopoietin-1 Mimetic, Restores Microcirculatory Perfusion and Microvascular Leakage and Decreases Fluid Resuscitation Requirements in Hemorrhagic Shock. *Anesthesiology.* 2018;128(2):361-74.

115. Dekker NAM, van Meurs M, van Leeuwen ALI, Hofland HM, van Slyke P, Vonk ABA, Boer C, van den Brom CE. Vasculotide, an angiopoietin-1 mimetic, reduces pulmonary vascular leakage and

preserves microcirculatory perfusion during cardiopulmonary bypass in rats. *Br J Anaesth.* 2018;121(5):1041-51.

116. Sugiyama MG, Armstrong SM, Wang C, Hwang D, Leong-Poi H, Advani A, Advani S, Zhang H, Szaszi K, Tabuchi A, Kuebler WM, Van Slyke P, Dumont DJ, Lee WL. The Tie2-agonist Vasculotide rescues mice from influenza virus infection. *Sci Rep.* 2015;5:11030.

117. Wu FT, Lee CR, Bogdanovic E, Prodeus A, Garipey J, Kerbel RS. Vasculotide reduces endothelial permeability and tumor cell extravasation in the absence of binding to or agonistic activation of Tie2. *EMBO Mol Med.* 2015;7(6):770-87.

118. Saeland E, Vidarsson G, Jonsdottir I. Pneumococcal pneumonia and bacteremia model in mice for the analysis of protective antibodies. *Microb Pathog.* 2000;29(2):81-91.

119. Opitz B, Puschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, Hammerschmidt S, Schumann RR, Suttorp N, Hippenstiel S. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem.* 2004;279(35):36426-32.

120. Schmeck B, Zahlten J, Moog K, van Laak V, Huber S, Hocke AC, Opitz B, Hoffmann E, Kracht M, Zerrahn J, Hammerschmidt S, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. *Streptococcus pneumoniae*-induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promoter. *J Biol Chem.* 2004;279(51):53241-7.

121. Gamble JR, Drew J, Trezise L, Underwood A, Parsons M, Kasminkas L, Rudge J, Yancopoulos G, Vadas MA. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ Res.* 2000;87(7):603-7.

122. Berger S, Goekeri C, Gupta SK, Vera J, Dietert K, Behrendt U, Lienau J, Wienhold SM, Gruber AD, Suttorp N, Witzernath M, Nouailles G. Delay in antibiotic therapy results in fatal disease outcome in murine pneumococcal pneumonia. *Crit Care.* 2018;22(1):287.

123. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-10.

124. Ye X, Ding J, Zhou X, Chen G, Liu SF. Divergent roles of endothelial NF-kappaB in multiple organ injury and bacterial clearance in mouse models of sepsis. *J Exp Med.* 2008;205(6):1303-15.

125. Muller-Redetzky HC, Will D, Hellwig K, Kummer W, Tschernig T, Pfeil U, Paddenberg R, Menger MD, Kershaw O, Gruber AD, Weissmann N, Hippenstiel S, Suttorp N, Witzernath M. Mechanical ventilation drives pneumococcal pneumonia into lung injury and sepsis in mice: protection by adrenomedullin. *Crit Care.* 2014;18(2):R73.

126. Kopaniak MM, Issekutz AC, Movat HZ. Kinetics of acute inflammation induced by *E coli* in rabbits. Quantitation of blood flow, enhanced vascular permeability, hemorrhage, and leukocyte accumulation. *Am J Pathol.* 1980;98(2):485-98.

127. Yi ES, Ulich TR. Endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor cause neutrophil-dependent microvascular leakage in postcapillary venules. *Am J Pathol.* 1992;140(3):659-63.
128. Lv S, Han M, Yi R, Kwon S, Dai C, Wang R. Anti-TNF-alpha therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis. *Int J Clin Pract.* 2014;68(4):520-8.
129. Rahmel T. [SSC International Guideline 2016 - Management of Sepsis and Septic Shock]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2018;53(2):142-8.
130. Wong AL, Haroon ZA, Werner S, Dewhirst MW, Greenberg CS, Peters KG. Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res.* 1997;81(4):567-74.

## 6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Aina Lask, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Therapeutische Bedeutung eines Angiopoietin-1 Mimetikums für den beatmungsassoziierten Lungenschaden in der murinen Pneumokokkenpneumonie“ („Therapeutic implication of an angiopoietin-1 mimetic for ventilator-induced lung injury in murine pneumococcal pneumonia“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

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

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

Datum 19.03.2021

Unterschrift

## 7 Lebenslauf

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



## 8 Danksagung

Ich möchte allen Personen danken, die mich in den letzten Jahren bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben. Ein paar möchte ich an dieser Stelle besonders hervorheben.

Dr. Birgitt Gutbier ist diesen Weg vom Anfang bis zum Ende mit mir gemeinsam gegangen. Sie stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und hat mich immer unterstützt und gefördert. Diese Art von Engagement ist keinesfalls selbstverständlich und ich kann nicht in Worte fassen wie dankbar ich ihr dafür bin, dass sie die Zeit meiner Promotion zu einer meiner lehrreichsten und wertvollsten Erfahrungen gemacht hat.

Prof. Dr. Martin Witzernath hat es mir erst ermöglicht, unter seiner Betreuung zu promovieren. Er fand trotz seiner vielfältigen Verpflichtungen immer Gelegenheit, wichtige Anliegen zu besprechen und hat mich durch seine Erfahrung und kritischen Anregungen zuverlässig durch die letzten Jahre geleitet.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Witzernath. Durch die unglaublich herzlichen und hilfsbereiten Kollegen und Freunde, die ich hier gefunden habe, bin ich jeden Tag gerne ins Labor gekommen. Ich habe jederzeit alle Unterstützung bekommen, die ich brauchte – ob fachlich oder privat. Auch deswegen werde ich mich immer gerne an die Jahre meiner Promotion zurückerinnern.

Dr. Olivia Kershaw aus der AG Gruber hat die histopathologischen Auswertungen für mich durchgeführt und stand jederzeit für Fragen und Diskussionen zur Verfügung.

Zuletzt möchte ich hier meine Familie und Freunde erwähnen. Ohne die Unterstützung meiner Eltern wäre es mir nicht möglich gewesen, meine Doktorarbeit in dieser Form zu machen und dafür bin ich ihnen unendlich dankbar. Auch hatten sie immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und haben mich in meinen Entscheidungen bestärkt. Meine Schwester Hania und Freddy haben mir nicht nur emotional beigegeben, sondern waren auch beim Korrekturlesen zur Stelle. Ihr wart mir eine so große Hilfe! Mein besonderer Dank gilt außerdem Felix, der immer für mich da war, mich in den schwierigen Phasen wieder aufgebaut hat und mir jede Unterstützung gegeben hat, die ich brauchte.