

Rolle des Komplement C5a-Rezeptors 1 in der Pathophysiologie der Meningokokken-Sepsis

Role of complement C5a-Receptor 1 in Pathophysiology of Meningococcal Sepsis



Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infektion und Immunität

Vorgelegt von

Johannes Bernd Herrmann

aus

Heidelberg

Würzburg 2018

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. med. Oliver Kurzai

1. Betreuer: Prof. Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir

2. Betreuer: Dr. rer. nat. Kay Johswich

3. Betreuer: Dr. rer. nat. Martin Fraunholz

4. Betreuer: Prof. Dr. med. Hartwig Klinker

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Der Promovend ist Arzt.

Rolle des Komplement C5a-Rezeptors 1 in der Pathophysiologie der Meningokokken-Sepsis

Role of complement C5a-Receptor 1 in Pathophysiology of Meningococcal Sepsis



Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infektion und Immunität

Vorgelegt von

Johannes Bernd Herrmann

aus

Heidelberg

Würzburg 2018

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Neisseria meningitidis | 1 |
| 1.1.1 | Gramnegativer Diplokokkus | 1 |
| 1.1.2 | Invasive Meningokokkenerkrankung | 1 |
| 1.2 | Komplementsystem | 3 |
| 1.2.1 | Bedeutung des Komplementsystems beim Menschen..... | 3 |
| 1.2.2 | Aufbau der Komplementkaskade | 4 |
| 1.3 | Interaktion zwischen <i>Nme</i> und Komplementsystem | 6 |
| 1.4 | Anaphylatoxine | 7 |
| 1.4.1 | C3a und C5a | 7 |
| 1.4.2 | C3a- und C5a-Rezeptoren | 8 |
| 1.4.3 | Rolle der Anaphylatoxine..... | 8 |
| 1.5 | Sepsis und die Bedeutung der C5a-C5aR-Achse | 10 |
| 1.5.1 | Sepsis und SIRS | 10 |
| 1.5.2 | C5a in der Sepsis | 11 |
| 1.5.3 | C5a-Rezeptoren in der Sepsis..... | 12 |
| 1.6 | Hypothese | 14 |
| 1.7 | Herangehensweise | 15 |
| 2 | Material und Methoden | 16 |
| 2.1 | Laborgeräte | 16 |
| 2.2 | Verbrauchsmaterialien | 17 |
| 2.3 | Reagenzien | 18 |
| 2.3.1 | Chemikalien..... | 18 |
| 2.3.2 | Reaktionskits | 19 |
| 2.3.3 | Antikörper..... | 20 |
| 2.3.4 | Lösungen aus Eigenherstellung | 20 |
| 2.3.5 | Seren | 21 |
| 2.4 | Versuchstiere | 21 |
| 2.4.1 | Allgemeine Informationen zu Versuchstieren..... | 21 |
| 2.4.2 | Genotypen..... | 21 |
| 2.4.2.1 | Wildtyp-Maus..... | 21 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.4.2.2 | C3-knockout-Maus | 22 |
| 2.4.2.3 | C5a-Rezeptor-knockout-Maus | 22 |
| 2.4.3 | Haltungs- und Hygienebedingungen | 22 |
| 2.5 | Bakterien..... | 23 |
| 2.5.1 | Bakterienstämme, Lagerung und Umgang | 23 |
| 2.5.1.1 | <i>Neisseria meningitidis</i> MC58..... | 23 |
| 2.5.1.2 | <i>Neisseria meningitidis</i> MC58 Δ <i>csb</i> | 23 |
| 2.5.2 | Hitzeinaktivierung | 24 |
| 2.6 | Infektion von Versuchstieren..... | 24 |
| 2.6.1 | Zeitangaben | 24 |
| 2.6.2 | Inokulum..... | 24 |
| 2.6.3 | Infektion | 25 |
| 2.7 | Klinische Überwachung von Versuchstieren | 25 |
| 2.7.1 | Parameter, Belastungsgrad und humaner Endpunkt..... | 25 |
| 2.7.2 | Verblindung | 26 |
| 2.8 | In vivo Bestimmung der Bakterienlast | 27 |
| 2.8.1 | Probengewinnung und Prozessierung..... | 27 |
| 2.8.1.1 | Schwanzblut | 27 |
| 2.8.1.2 | Herzblut..... | 27 |
| 2.8.1.3 | Prozessierung | 27 |
| 2.9 | Messung pro-inflammatorischer Mediatoren | 27 |
| 2.9.1 | Probengewinnung und Prozessierung..... | 27 |
| 2.9.1.1 | Blutplasma..... | 28 |
| 2.9.1.2 | Peritoneallavage | 28 |
| 2.9.2 | ELISA..... | 28 |
| 2.9.2.1 | Allgemeine Informationen zu durchgeführten ELISA..... | 28 |
| 2.9.2.2 | C3a- und C5a-ELISA | 29 |
| 2.9.2.3 | TNF- α -, IL-6- und KC/CXCL1-ELISA | 30 |
| 2.9.3 | C5a in vivo capture assay | 30 |
| 2.9.3.1 | Allgemeine Informationen | 30 |
| 2.9.3.2 | Durchführung | 31 |
| 2.9.3.3 | C5a Messung per ELISA..... | 31 |
| 2.10 | In vivo C5aR1-Antagonisierung mit PMX205 | 32 |
| 2.11 | In vivo Zellepletion | 33 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.11.1 | Kontrollgruppe | 33 |
| 2.11.2 | Depletion von Neutrophilen mit RB6/8C5 Antikörper | 33 |
| 2.11.3 | Depletion von Makrophagen mit Clodronat-Liposomen..... | 33 |
| 2.12 | Test von PMX205 auf Bakterizidie | 33 |
| 2.13 | Anfertigung histologischer Schnitte | 34 |
| 2.13.1 | Gewebsentnahme..... | 34 |
| 2.13.2 | Gewebsfixation auf Objektträgern..... | 34 |
| 2.14 | Immunfluoreszenzfärbung..... | 34 |
| 2.14.1 | Herstellung von Rabbit-anti-Nme-FITC-Antikörper..... | 34 |
| 2.14.1.1 | Aufreinigungsprotokoll von Kaninchenenserum | 35 |
| 2.14.1.2 | Antikörpermarkierung mit FITC („labeling“)..... | 35 |
| 2.14.2 | Färbeprotokoll | 35 |
| 2.14.3 | Mikroskopie..... | 36 |
| 2.15 | Statistik | 36 |
| 3 | Ergebnisse | 37 |
| 3.1 | Etablierung des <i>Nme</i>-Sepsis-Modells in der Maus | 37 |
| 3.1.1 | Rolle des Komplementsystems in der murinen <i>Nme</i> -Sepsis | 37 |
| 3.1.2 | Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a..... | 39 |
| 3.1.2.1 | C3a | 39 |
| 3.1.2.2 | C5a | 41 |
| 3.2 | Rolle des C5aR1 in der <i>Nme</i>-Sepsis..... | 41 |
| 3.2.1 | <i>Nme</i> -Sepsis bei 10 ⁵ , 10 ⁶ , 10 ⁷ CFU MC58 | 42 |
| 3.2.2 | <i>Nme</i> -Sepsis bei 10 ⁵ CFU MC58 | 43 |
| 3.2.2.1 | Überlebensrate, Bakteriämie und klinischer Score | 43 |
| 3.2.2.2 | Anaphylatoxine und pro-inflammatorische Mediatoren | 45 |
| 3.3 | Histologische Untersuchungen..... | 47 |
| 3.4 | Mechanistischer Hintergrund..... | 52 |
| 3.4.1 | Einfluss der C5aR1-Aktivierung auf die Bakteriämie..... | 52 |
| 3.4.1.1 | Infektion mit 10 ⁹ CFU MC58Δ <i>csb</i> | 53 |
| 3.4.1.2 | Infektion mit 10 ⁷ CFU MC58 ohne Eisendextran..... | 54 |
| 3.4.2 | Einfluss von C5aR1-Aktivierung auf das SIRS | 55 |
| 3.5 | In vivo Depletion C5aR-exprimierender Zellpopulationen | 56 |
| 3.6 | Therapeutisches Potential der C5aR1-Blockade | 59 |
| 4 | Diskussion | 63 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.1 | Inflammatorischer Arm des Komplementsystems | 63 |
| 4.2 | Sepsismodelle..... | 65 |
| 4.2.1 | Verschiedene Sepsismodelle im Vergleich | 65 |
| 4.2.2 | <i>Nme</i> -Sepsismodelle | 67 |
| 4.2.3 | Gegenüberstellung von CLP-Modell und <i>Nme</i> -Sepsismodell..... | 69 |
| 4.3 | Rolle des C5aR1 in der <i>Nme</i>-Sepsis..... | 70 |
| 4.4 | Mechanismus der zellulären Pathophysiologie in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen/Monozyten..... | 71 |
| 4.5 | Endorganschäden während der <i>Nme</i>-Sepsis | 74 |
| 4.6 | C5a-C5aR1-Achse als therapeutische Zielstruktur | 76 |
| 4.7 | Rolle des C5aR2 in der <i>Nme</i>-Sepsis..... | 79 |
| 4.8 | Ausblick | 80 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 81 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 83 |
| 7 | Anhang | 99 |
| 7.1 | Abkürzungsverzeichnis | 99 |
| 7.2 | Tabellenverzeichnis | 100 |
| 7.3 | Abbildungsverzeichnis..... | 100 |

1 Einleitung

1.1 *Neisseria meningitidis*

1.1.1 Gramnegativer Diplokokkus

Neisseria meningitidis (*Nme*) ist ein bekapseltes, gramnegatives, diplokokkenförmiges Bakterium. Anhand der Kapselantigene werden zwölf Serogruppen (A, B, C, E, H, I, K, L, W, X, Y, und Z) unterschieden (1). *Nme* ist humanspezifisch, wird per Tröpfcheninfektion übertragen und besiedelt asymptomatisch die Schleimhaut des oberen Nasenrachenraums (2). Schätzungsweise 10 % der europäischen Bevölkerung sind Träger dieses Bakteriums (3), (4), (5). In verschiedenen gesellschaftlichen Gruppen mit engem, körperlichen Kontakt untereinander, wie z. B. bei Jugendlichen, Studenten oder Militärrekruten kann der Trägerstatus bis zu 35 % betragen (3), (6), (7), (8). *Nme* besitzt ein breites Spektrum verschiedenster Virulenzfaktoren, welche Funktionen wie Adhäsion, Invasion, Eisenakquise und Immunevasion vermitteln. In diesem Kontext sind neben dem wichtigsten Virulenzfaktor, der Kapsel, die Oberflächenadhäsionsproteine, d. h. Proteine der äußeren Membran (z. B. Pili, PorA, PorB, Opa, Opc), Eisenbindeproteine (z. B. Hämoglobin, Transferrin, Lactoferrin), Endotoxine (Lipooligosaccharid, LOS) und Mechanismen zum horizontalen Genaustausch sowie Phasenvariation von Oberflächenantigenen von entscheidender Bedeutung (2), (9).

1.1.2 Invasive Meningokokkenerkrankung

Unter besonderen Bedingungen kann es invasiven *Nme*-Stämmen der Serogruppen A, B, C, W, X und Y gelingen, von der Schleimhaut aus in den Blutstrom einzudringen und schwere Krankheitsbilder hervorzurufen (1). Von diesen Krankheitsbildern, welche als sogenannte „*invasive meningococcal disease*“ (IMD) zusammengefasst werden, sind Meningoenzephalitis und Sepsis die bedeutendsten (10). Risikofaktoren für das Auftreten von IMD sind direkter Kontakt mit Erkrankten, Rauchen, Asplenie, spezifische Komplementdefekte (z. B. Defekte des Membranangriffskomplexes oder Mangel des Mannosebindenden Lektins) und eine hohe Bevölkerungsdichte (2).

Die Inkubationszeit von IMD beträgt insgesamt ca. 1-14 Tage, jedoch ist ein fulminanter Erkrankungsbeginn innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Infektion charakteristisch (11), (12), (13). Klinisch präsentiert sich die Meningoenzephalitis mit Fieber, Kopfschmerz, Nackensteife und Bewusstseinstörung (14). Häufige Symptome der Sepsis sind Fieber, Schock, Verbrauchskoagulopathie (DIC) und Multiorganversagen (15). Eine frühzeitige intensivmedizinische Betreuung sowie die sofortige Therapie mit Penicillin G oder einem Cephalosporin der 3. Generation (Ceftriaxon, Cefotaxim) über 5-7 Tage sind bei IMD indiziert (16). Mögliche Komplikationen einer IMD sind Arthritis (17), Perikarditis (18), akutes Nierenversagen (19) oder das seltene, aber gefürchtete Waterhouse-Friderichsen-Syndrom (20), (21). Hierbei führt eine Verbrauchskoagulopathie zu einer Durchblutungsstörung der Nebennierenrinden mit akuter Insuffizienz der Glukokortikoid- und Aldosteronproduktion (12). Je nach der *Nme*-Serogruppe, Patient und Ausprägung des Krankheitsbildes beträgt die Letalität der IMD im Mittel ca. 8-14 % trotz optimaler Therapie (10), (15), (22). Im Einzelfall schwankt die Letalität jedoch erheblich und beträgt ca. 5 % bei Meningitis (10), (15), (12), (23), (24), bis zu ca. 30 % bei Sepsis (25) und bis zu 80 % beim Waterhouse-Friderichsen-Syndrom (12), (26). Nach überstandener IMD sind schwere Langzeitfolgen bei ca. 10-30 % der Patienten zu erwarten (10), (27). Beispiele für solche Langzeitfolgen sind Haut- (28), Muskel- (19), und Knochennekrosen (29). In 20 % der Fälle sind deshalb Amputationen oder plastische chirurgische Eingriffe erforderlich (12). Zudem können bei schweren Meningoenzephalitiden neurologische Folgen wie Hörminderung (28), motorische Störungen, mentale Retardierung (30), kognitive Defizite (31) und Krampfanfälle (32) auftreten.

In der Vergangenheit kam es weltweit immer wieder zu lokalen Epidemien von IMD. Der bisher größte Ausbruch mit ca. 300.000 Erkrankten und 30.000 Toten ereignete sich 1996-1997 im afrikanischen „Meningitisgürtel“ (Subsahara-Region von Äthiopien bis Senegal) (33). Durch die Einführung von effizienten Konjugatimpfstoffen und nationalen Impfprogrammen in Industriestaaten ab Ende der 1990er Jahre (34), konnte dort die jährliche Inzidenz von IMD in letzter Zeit stark gesenkt werden (35). Momentan stehen effektive Impfstoffe für die Serogruppen A, C, W und Y (MenACWY) zur Verfügung (36). Die Wirksamkeit der seit 2013 zur Verfügung stehenden Impfstoffe gegen Serogruppe B (MenB) ist noch nicht abschließend geklärt (37), (38). Trotz dieser Impferfolge sind jedes

Jahr schätzungsweise 0,5-1,2 Millionen Menschen weltweit von IMD betroffen, von denen ca. 50.000-135.000 an der Infektion versterben (9), (25).

Es bestehen mitunter erhebliche geographische, epidemiologische und mikrobiologische Unterschiede im Spektrum der jeweiligen Fälle von IMD. Beispielsweise wird die jährliche Inzidenz von IMD in Europa und USA aktuell mit ca. 0,3-0,8/100.000, in Südamerika mit ca. 0,1-2/100.000, in Asien und Australien mit ca. 0,03-3/100.000 und in Afrika mit ca. 10-20/100.000 angegeben (39), (40), (41), (42). Bei lokalen, periodisch wiederkehrenden Epidemien im afrikanischen „Meningitisgürtel“ kann die Inzidenz auf bis zu 1.000/100.000 pro Jahr ansteigen (9), (41). Große Epidemien in Afrika treten gehäuft während Trockenzeiten im Frühjahr und Sommer auf (35), (43), wohingegen lokale Ausbrüche in Industrienationen häufiger in Wintermonaten nach respiratorischen Virusinfektionen (z. B. Influenza) beobachtet werden (44), (45).

Darüber hinaus zeigen sich enorme Unterschiede in dem Erkrankungsrisiko zwischen verschiedenen Altersgruppen einer Population. Die höchste Inzidenz für IMD weisen Kinder im ersten Lebensjahr mit bis zu 12,3/100.000 pro Jahr in Europa (bzw. Kinder unter 5 Jahren mit ca. 4,1/100.000 pro Jahr) auf. Ein zweiter Häufigkeitsgipfel besteht in der Altersgruppe 15-24 Jahre mit ca. 1,3/100.000 pro Jahr. Erwachsene über 25 Jahren zeigen deutlich seltener IMD (40), (46).

Auch in Bezug auf die Serogruppen gibt es große regionale Unterschiede: In Nord- und Südamerika, Europa und Australien dominieren die Serogruppen B und C als Verursacher von IMD (35), (41). Im afrikanischen „Meningitisgürtel“ werden bei Patienten hauptsächlich die Serogruppen A, C, W und X gefunden und in Asien sind die Serogruppen A und C am weitesten verbreitet (35).

1.2 Komplementsystem

1.2.1 Bedeutung des Komplementsystems beim Menschen

Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen, unspezifischen und humoralen Immunsystems. Seine Hauptaufgabe besteht in der Abwehr eindringender Pathogene wie Bakterien, Viren und Pilze (47). Darüber hinaus wurde in den letzten Jahren deutlich, dass das Komplementsystem an zahlreichen immunologischen Überwachungsprozessen, wie

beispielsweise an der Modulation der adaptiven Immunantwort, an der Elimination von Immunkomplexen und apoptotischen Zellen, an verschiedenen Vorgängen des Fettstoffwechsels, der Angiogenese und der Organogenese, beteiligt ist (48).

1.2.2 Aufbau der Komplementkaskade

Über 30 verschiedene, gelöste oder membranständige Proteine bilden eine Kaskade aus sich gegenseitig aktivierenden Komponenten. Unter diesen nehmen die Komplementfaktoren C1 bis C9 eine Kernrolle ein. Die Kaskade besteht aus drei ineinander übergehenden Vorgängen: Aktivierung, Verstärkung und Formation des Membranangriffskomplexes (MAK) auf der Zelloberfläche des Pathogens. Es sind bisher drei Aktivierungswege des Komplementsystems bekannt, welche als klassischer Weg, Lektin-Weg und alternativer Weg bezeichnet werden. Alle drei Aktivierungswege führen zur Spaltung von C3 in C3a sowie C3b durch die C3-Konvertase. Diese Reaktion stellt den zentralen Schritt der Komplementkaskade dar (49).

Der klassische Weg wird durch Antigen-Antikörper-Bindung initiiert. Durch Konformationsänderung innerhalb des Antikörpers (AK) kann sich der C1-Komplex (C1q, C1r, C1s) an die Gelenkregion des Antikörpers anlagern und daraufhin gelöstes C4 in C4a und C4b, sowie gelöstes C2 in C2a und C2b spalten. Die Fragmente C4b und C2b verbinden sich zu C4bC2b (C3-Konvertase).

Der Lektin-Weg wird durch endständige Monosaccharide wie z. B. Mannose aktiviert, welche häufiger Bestandteil von Erregeroberflächen sind. Fünf verschiedene Lektin-Moleküle (Mannose-bindendes Lektin MBL, Collectin 11, Ficolin-1, -2, -3) können an verschiedensten Monosacchariden binden. Daraufhin werden sogenannte „MBL-assoziierte Serinproteasen“ (MASP1-3, Map19) aktiviert, welche C4 und C2 (vgl. klassischer Weg) spalten und C4bC2b generieren (49).

Der alternative Weg wird durch Autoaktivierung von C3 initiiert. Durch spontane Konformationsänderungen von C3 entsteht C3(H₂O) (50), an welches sich Faktor B anlagern kann. Faktor B wird daraufhin von Faktor D in Ba und Bb gespalten und es entsteht C3(H₂O)Bb (initiale C3-Konvertase). Das Bb Fragment kann C3 in C3a und C3b spalten. Das instabile C3b (Halbwertszeit ca. 60µs (51)) muss mit -OH oder -NH Gruppen an

Zellmembranen stabilisiert werden. Schließlich kann stabilisiertes C3b zusammen mit Bb die C3-Konvertase C3bBb bilden (49).

Nach erfolgter Aktivierung spalten die C3-Konvertasen (C4bC2b und C3bBb) C3 in C3a und C3b. Eine Verstärkung des Kaskadenprozesses erfolgt durch Anlagerung des C3b an die C3-Konvertasen, wodurch die C5-Konvertasen C3bC4bC2b und C3bC3bBb entstehen. Schließlich spalten die C5-Konvertasen C5 in C5a und C5b, welches zusammen mit C6, C7, C8 und C9 (c5b-9 Komplex) den Membran-Angriffs-Komplex (MAK) bildet, der als Pore auf der Oberfläche des Pathogens Zellyse induziert (49).

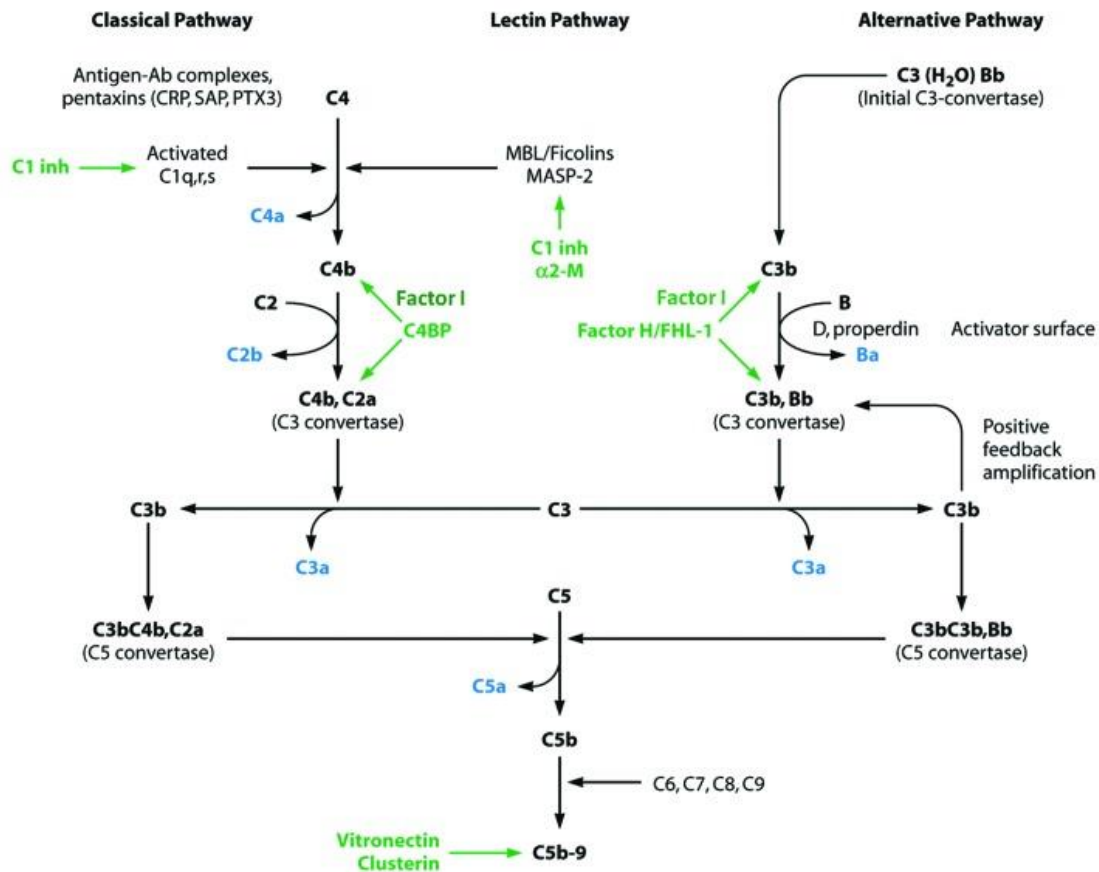


Abbildung 1

Schematische Darstellung des Komplementsystems nach Lewis und Ram

Neben der direkten Formierung des MAKs auf der Oberfläche eindringender Pathogene initiiert das Komplementsystem auch die Aktivierung der zellulären Abwehr. Einerseits

wirken die Komplementfragmente C3a und C5a als Anaphylatoxine und können neben Chemotaxis lokale sowie systemische Inflammationsprozesse über Aktivierung verschiedener Zellpopulationen triggern (52), (53). Andererseits fungieren die Fragmente iC3b und C1q als Opsonine und verstärken die direkte Wirkung von phagozytierenden Zellen über deren Komplement-Rezeptoren (CR1-3) bzw. C1q-Rezeptoren (49).

1.3 Interaktion zwischen *Nme* und Komplementsystem

Das Komplementsystem ist an der Abwehr verschiedener invasiver Erreger wie zum Beispiel *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *H. influenzae*, *N. meningitidis* (*Nme*) und *N. gonorrhoeae* beteiligt (47). Wie bei keinem anderen Pathogen jedoch, spielt das Komplementsystem eine herausragende Rolle in der Erkennung und Bekämpfung von *Nme*-Infektionen (49). Menschen mit isolierten oder komplexen Komplementdefekten zeigen im Vergleich zu Immunkompetenten beispielsweise eine vielfach höhere Suszeptibilität gegenüber IMD (49), (54). Die geringe Inzidenzrate von IMD (trotz gleichzeitig vorliegender hoher Kolonisierungsrate in der Bevölkerung) zeigt, dass ein feines Gleichgewicht aus *Nme*-spezifischen Virulenzfaktoren und der Immunabwehr besteht. Mit dem aktivierten Komplementsystem steht dem Immunkompetenten ein wirksames und facettenreiches Instrument in der Bekämpfung von *Nme* zur Verfügung.

Die bedeutendste Rolle in der *Nme*-Abwehr kommt dem MAK und der durch ihn vermittelten, direkten Lyse zu. Personen mit Komplementdefekten in der terminalen Kaskade (C5 bis C9) zeigen beispielsweise ein bis zu 10.000-fach höheres Risiko, an IMD zu erkranken, als gesunde Vergleichspersonen (54), (55). Zudem leiden ca. 40-50 % dieser Patienten an wiederkehrenden Episoden von IMDs, welche mitunter durch dieselben Serogruppen verursacht werden (49), (56), obwohl die Bildung suffizienter anti-*Nme*-Antikörper nicht vermindert ist (57). Defekte im alternativen Aktivierungsweg oder bei C3-Defizienz zeigen ähnlich schwere Krankheitsbilder (54), (47). Unabhängig davon potenziert das Komplementsystem über Opsonisierung die Wirkung von wirtseigenen anti-*Nme*-Antikörpern (49), (58).

Als Schutz vor der Detektion und Bekämpfung durch das Komplementsystem beherbergen invasive *Nme*-Stämme eine Fülle von spezifischen Virulenzfaktoren. Der zentrale Evasionsmechanismus von *Nme* ist die Hemmung der initialen Komplementaktivierung.

Obwohl die genauen Mechanismen bisher nicht vollständig geklärt und erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen bekannt sind, gelten die Polysaccharidkapsel sowie Lipooligosaccharid (LOS) als die wichtigsten Virulenzfaktoren zur Komplementhemmung (59), (60), (61), (62), (63).

Darüber hinaus kann *Nme* wirtseigene Komplement-Regulator-Proteine an der Oberfläche binden, um eine lokale Komplementhemmung zu induzieren (64). Beispielsweise sind die Oberflächenproteine Faktor-H-Binde-Protein (fHbp) und Neisseria-Oberflächenprotein A (NspA) essentiell an der Komplementhemmung beteiligt. Beide Proteine können wirtseigenen Faktor H (fH) binden, welcher über Hemmung von C3b und C3bBb (C3 Konvertase) den alternativen Aktivierungsweg inhibiert (65), (66). Des Weiteren kann Porin A (PorA) als Protein der äußeren *Nme*-Zellmembran das C4-Binde-Protein (C4BP) binden, wodurch aktives C4b und C4bC2b (C3-Konvertase) inaktiviert werden und somit der klassische Aktivierungsweg inhibiert werden kann (67). Hinzu kommt, dass die Oberflächenproteine Opacity-Protein (Opc) und Meningococcal surface fibrin (Msf) das Komplement-Regulator-Protein Vitronectin binden können, wodurch die Anlagerung des MAKs und die direkte Zellyse verhindert werden (68), (69).

1.4 Anaphylatoxine

1.4.1 C3a und C5a

Während der Aktivierung des Komplementsystems wird neben MAK-Bildung und Opsonisierung auch der inflammatorische Zweig aktiviert. Zentraler Mechanismus ist dabei die Freisetzung der Komplementspaltfragmente C3a und C5a. Diese Polypeptide sind potente immunmodulatorische Mediatoren (Anaphylatoxine), welche über die entsprechenden C3a- und C5a-Rezeptoren ein breites Spektrum unterschiedlicher Zellpopulationen auf lokaler und systemischer Ebene aktivieren und so eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie verschiedener Krankheitsbilder spielen können (53).

Die potente, inflammatorische Wirkung der Anaphylatoxine C3a und C5a wird durch lösliche oder gewebsständige Carboxypeptidasen kontrolliert, welche kurz nach der Freisetzung von C3a und C5a, deren C-terminales Arginin abspalten, wodurch C3a-desArg und C5a-desArg entstehen (70), (71). C5a-desArg zeigt eine deutlich reduzierte (ca. 1-10 %) und C3a-desArg zeigt keine inflammatorische Aktivität (53), (72).

1.4.2 C3a- und C5a-Rezeptoren

Die Anaphylatoxine C3a, C5a und C5a-desArg binden an die Rezeptoren C3aR, C5aR1 und C5aR2 (C5L2), welche alle aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stammen (53). Obwohl die genannten Rezeptoren untereinander große Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz aufweisen (73), sind deutliche Unterschiede in Struktur und Funktion dokumentiert (53).

Der C3aR besteht aus 482 Aminosäuren (54 kDa) und erkennt ausschließlich C3a (K_d ca. 1 nM) (74), (75), (76). C3aR wird hauptsächlich auf Zellen mit myeloischem Ursprung wie zum Beispiel neutrophilen (77), basophilen (78) und eosinophilen Granulozyten (79), Mastzellen (80), Makrophagen bzw. Monozyten (81) und dendritischen Zellen (82) exprimiert. Zusätzlich wird C3aR auch auf Gliazellen und Neuronen (83), Endothelzellen (84), Epithelzellen, glatten Muskelzellen (85) und aktivierten T-Zellen (86) gefunden.

Der aus 350 Aminosäuren (42 kDa) bestehende C5aR1 (CD88) bindet C5a mit hoher (K_d ca. 1 nM) und C5a-desArg mit geringerer Affinität (K_d ca. 660 nM) (53), (87). Ebenso wie der C3aR ist der C5aR1 hauptsächlich auf Immunzellen wie zum Beispiel neutrophilen (88), basophilen (89) und eosinophilen Granulozyten (87), Monozyten/Makrophagen (90), Mastzellen (91), dendritischen Zellen (92) und T-Zellen (93) exprimiert. Darüber hinaus ist der C5aR1 auch auf Endothelzellen (94) sowie auf organspezifischen Zellen in ZNS (95), (96), Niere, Lunge, Leber, Milz, Magen-Darm-Trakt, Haut und Herz zu finden (97), (98).

Der 337 Aminosäuren (37 kDa) umfassende C5aR2 erkennt sowohl C5a (K_d ca. 2,5 nM) als auch C5a-desArg mit hoher Affinität (53), (99). Auch der C5aR2 wird ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert. In folgenden Geweben konnte er identifiziert werden: Gehirn, Plazenta, Ovarien, Hoden, Milz, Kolon, Lunge, Leber, Fettzellen, Fibroblasten, auf neutrophilen Granulozyten, auf unreifen dendritischen Zellen und Epithelzellen (53), (100).

1.4.3 Rolle der Anaphylatoxine

Die wohl bedeutendste Aufgabe der Anaphylatoxine und ihrer Rezeptoren ist die Modulation von akuten und chronischen Entzündungsprozessen. Im Rahmen von allergischen,

autoimmunen oder infektiösen Prozessen bewirken C3a und C5a Chemotaxis myeloider Zellen (79), (101). Zudem triggern sie durch die Aktivierung von C3aR und C5aR1 auf oben genannten Zellen eine pro-inflammatorische Immunantwort (53). Durch B- und T-Zell-Aktivierung wird die Antwort auf das adaptive Immunsystem ausgedehnt (102). Somit können C3aR und C5aR1 erheblich zur Pathophysiologie bei Krankheitsbildern wie zum Beispiel Sepsis (101), allergischem Asthma (103), Organabstoßung nach Transplantationen (104), (105), Tumorentstehung (106) und neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer Demenz (107), M. Parkinson (108), Chorea Huntington (109) und altersbedingte Makuladegeneration (110) beitragen.

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die Anaphylatoxine zusammen mit den Rezeptoren C3aR und C5aR1 an anderen Aufgaben wie Gewebsregeneration und Fibrose (111), Gehirnentwicklung (112) und Migration hämatopoetischer Stammzellen (113) beteiligt sind.

Im Gegensatz zur Funktion des C3aR und C5aR1 ist die genaue Rolle des C5aR2 während immunologischen Prozessen umstritten und es liegen diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse vor. Unklar ist, inwiefern eine Bindung der Liganden C5a und C5a-desArg an den C5aR2 überhaupt Auswirkungen auf den Metabolismus bzw. auf eine Aktivierung der Zielzelle hat, da der Rezeptor durch eine Mutation von G-Proteinen entkoppelt ist und keine intrazelluläre Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktion aufweist; zudem bewirkt C5a-Stimulation keine transkriptionellen Veränderungen in C5aR2-transfizierten Zellen (99), (114), (115). Deshalb vermuten einige Autoren, dass der C5aR2 als Köder fungieren könnte („Decoy-Rezeptor“), der bei der Eliminierung von C5a und C5a-desArg behilflich sein könnte (53), (116), (117).

Andere Autoren gehen davon aus, dass der C5aR2 als funktioneller Antagonist des C5aR1 modulierend wirkt und anti-inflammatorisches Potential hat. Sie verweisen hierbei auf Experimente, die unter Abwesenheit des C5aR2 *in vivo* und *in vitro* stärkere Inflammation in Form gesteigerter Zytokinproduktion von IL-6 und TNF- α sowie stärkere Neutrophilenmigration in betroffene Organe zeigten (117), (118), (119), (120). Im Gegensatz dazu, zeigen andere *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen genau gegenteilige, pro-inflammatorische Effekte des C5aR2 mit positiv modulierender Wirkung von C3a und C5a (119), (120).

Abgesehen von der direkten Wirkung des C5aR2 ist auch nicht geklärt, inwiefern er indirekt pro- oder anti-inflammatorische Wirkungen entfaltet. Eine Modulation der Signalkaskaden anderer Rezeptoren (z. B. Oligomerisation) durch den C5aR2 wäre in diesem Zusammenhang denkbar (121), (122).

1.5 Sepsis und die Bedeutung der C5a-C5aR-Achse

1.5.1 Sepsis und SIRS

Für das Verständnis der Sepsis ist von entscheidender Bedeutung, dass die Bezeichnung „Sepsis“ ein Überbegriff für ein breites Spektrum von Erkrankungen darstellt. Definitivonsgemäß ist die Ursache einer Sepsis eine mikrobiologisch gesicherte oder klinisch mutmaßliche Infektion mit Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen, Viren, Parasiten bzw. deren Zellbestandteilen, welche im Organismus eine komplexe, dysregulierte Immunantwort aus pro- und anti-inflammatorischen Mechanismen triggert. Abhängig vom jeweiligen Infektfokus und dem Keimspektrum unterscheidet man zahlreiche Formen. Generell sind die häufigsten Ursachen beim Menschen Pneumonien, intraabdominelle und urogenitale Infektionen. In Deutschland beträgt die Prävalenz der Sepsis schätzungsweise 100/100.000. Weltweit wird von ca. 20 Millionen Fällen pro Jahr ausgegangen (123), (124). Trotz aufwändiger antibiotischer Therapie und intensivmedizinischer Betreuung beträgt die Gesamtmortalität bis zu 30 % (125), (126).

Im Unterschied zur Sepsis bezeichnet der früher häufiger verwendete Begriff „SIRS“ („*systemic inflammatory response syndrom*“) eine unspezifische, systemische Immunantwort mit infektiöser oder nicht-infektiöser Genese (z. B. Trauma, Verbrennung, Pankreatitis), welche mit einer Veränderung der Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz und des Blutbildes einhergeht. Im Zuge der „3. Internationalen Konsens Definition zu Sepsis und Septischer Schock“ 2016 hat die Bezeichnung „SIRS“ zugunsten der Bezeichnung „Sepsis“ an Bedeutung verloren (127).

Zur Erforschung der Pathophysiologie in SIRS und Sepsis sind verschiedene Modelle etabliert. *In vitro* Modelle untersuchen zellspezifische Reaktionen bei Stimulation durch C5a oder LPS. *In vivo* Modelle untersuchen die komplexen, systemischen Effekte nach

i. v. Applikation von *E. coli* oder LPS, z. B. an Schweinen und Primaten oder nach artifizierlicher Perforation des Magen-Darm-Trakts im „*cecal ligation and puncture*“-Modell (CLP) an Nagern (128), (129).

In den genannten Sepsis-Modellen konnte eine starke Komplementaktivierung über alle drei Aktivierungswege festgestellt werden. Mit Fokus auf den inflammatorischen Zweig konnte ein dosisabhängiger Anstieg der Anaphylatoxine C3a und C5a im Plasma von Mensch und Tier beobachtet werden (128), (130), (131). Das potente Anaphylatoxin C5a wurde dabei einerseits komplementabhängig durch die C5-Konvertase, andererseits komplementunabhängig von zellulären Serinproteasen freigesetzt (132). Obwohl die genauen Pathomechanismen immer noch kontrovers diskutiert werden, wird allgemein angenommen, dass C5a über seine beiden Rezeptoren C5aR1 und C5aR2 überwiegend pro-inflammatorische Immunreaktionen triggert (133).

1.5.2 C5a in der Sepsis

In *in vitro* Sepsis-Modellen stimulierte C5a alleine oder in Kombination mit LPS die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren durch zahlreiche Zellpopulationen (128). Neutrophile und Monozyten von Mensch und Nagern zeigten beispielsweise eine gesteigerte Produktion und Freisetzung von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α (nur Monozyten) (134), (135), (136), (137), (138).

Darüber hinaus konnten *in vivo* verschiedenste Parameter durch C5a-Blockade mit anti-C5a-Antikörpern verbessert werden. Beispielsweise konnten die Plasmakonzentrationen von IL-6 in Schweinen (139) und von IL-17F in Mäusen gesenkt werden (140). Bei Primaten konnten Sepsis-typische Gewebsdefekte an der Lunge reduziert und die Überlebensrate verbessert werden (141). Kreislaufparameter konnten in Ratten verbessert und Gefäßwandschäden reduziert werden (131). Zusätzlich konnte die Bakterienlast im Blut von Ratten gesenkt werden (142).

Außerdem scheint C5a durch Förderung der intravasalen Gerinnung (DIC) zum Multiorganversagen bei Sepsis beizutragen. Es konnte gezeigt werden, dass C5a in humanen Leukozyten die Thromboplastinproduktion induziert (143) und *in vivo* an Ratten über-

schießende Gerinnungsprozesse durch Therapie mit anti-C5a-Antikörpern gemildert werden konnten (144). Deshalb wird heutzutage eine enge Verzahnung von Komplementsystem und Gerinnungskaskade mit positiven Rückkopplungsmechanismen vermutet (128).

Des Weiteren lassen Ergebnisse aus *in vitro* und *in vivo* Sepsis-Versuchen vermuten, dass C5a an verschiedenen intrinsischen und extrinsischen, zellulären Apoptosemechanismen beteiligt ist. C5a induzierte verstärkte Apoptose in Endothelzellen (145) und Zellen des Nebennierenmarks (146). Im Gegensatz dazu scheint C5a einen anti-apoptotischen Effekt auf Neutrophile in der Akutphase der Inflammation zu haben (147). Durch anti-C5aR-Antikörper konnten *in vivo* pro- und anti-apoptotische Effekte von C5a auf oben genannte Zellpopulationen inhibiert werden (128).

Zudem konnte während der Sepsis in Ratten und Mäusen eine C5a induzierte Kardiomyopathie in Verbindung mit deutlich erhöhter Produktion von IL-6, TNF- α , IL-1 β , MIP-1 α , MIP-2, KC und IL-10 durch Kardiomyozyten beobachtet werden. Unter Therapie mit anti-C5aR-Antikörpern konnten sowohl die Symptome der Kardiomyopathie verbessert, wie auch die Konzentrationen oben genannter Mediatoren reduziert werden (148), (149).

1.5.3 C5a-Rezeptoren in der Sepsis

Auch in der Pathophysiologie der Sepsis sind die genaue Bedeutung der C5a-Rezeptoren C5aR1 und C5aR2 und deren Interaktion untereinander noch nicht hinreichend geklärt. Zahlreiche Experimente aus *in vivo* Sepsis-Modellen weisen klar auf eine überwiegend pro-inflammatorische Wirkung des C5aR1 in der Sepsis hin. C5aR2 hingegen zeigt sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte während der Sepsis (128).

C5aR1-knockout Mäuse zeigten im E.coli- und im CLP-Model verminderte Sepsis-Parameter im Vergleich zu Wildtyp Tieren (WT). Dies umfasste eine Verbesserung der Überlebensrate und geringere Konzentrationen pro-inflammatorischer Mediatoren in verschiedenen Geweben (120), (150), (151). Diese Ergebnisse konnten im CLP-Model in Wildtyp Mäusen unter Blockade von C5aR1 mit Antagonisten oder Antikörpern bestätigt werden. Zudem wurden geringere Bakteriämien durch C5aR1-Blockade gemessen (152), (153).

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression und Anzahl von C5aR1 auf der Zelloberfläche gerade während der Initialphase der Sepsis stark verändert sein kann. Auf zellulärer Ebene wurde im CLP-Modell an Mäusen eine erhöhte C5aR1-Expression auf Lunge, Thymus, Niere, Leber und Herz gefunden (149), (152), (154). Unter Therapie mit anti-C5aR1-Antikörpern zeigten sich geringere Konzentrationen von IL-6 und TNF- α sowie eine geringe Bakteriämie in Mäusen (152). Im Gegensatz dazu wurde eine Reduktion der Expression sowie der Anzahl von C5aR1 auf der Oberfläche von Neutrophilen beobachtet, welche mit einer geringeren Produktion der bakteriziden, reaktiven Sauerstoffspezies einher ging (155).

Zusätzlich wurde im CLP-Modell an Ratten beobachtet, dass der C5aR1 an der Induktion von Apoptose z. B. in Thymozyten (156) und in catecholaminproduzierenden Zellen des Nebennierenmarks (146) beteiligt ist. All diese Ergebnisse weisen auf eine überwiegend pro-inflammatorische Rolle des C5aR1 hin.

Wie zuvor angesprochen (Kapitel 1.4) wird die grundlegende Funktion des C5aR2 auch in der Sepsis äußerst kontrovers diskutiert. Es wird jedoch vermutet, dass C5aR1 und C5aR2 verschiedenen Regulationsmechanismen in der Sepsis unterliegen (128). Bezüglich des C5aR2 konnte zum Beispiel eine vermehrte Expression auf Neutrophilen (im Gegensatz zu C5aR1) sowie in Lunge, Leber, Niere und Herz (wie auch bei C5aR1) während der Sepsis im CLP-Modell beobachtet werden (118).

Einerseits werden dem C5aR2 anti-inflammatorische Effekte in der Sepsis im Sinne eines „Decoy Rezeptors“ zugeschrieben. Beispielsweise zeigten *in vitro* Studien, dass neutrophile Granulozyten nach Stimulation mit LPS und C5a mit verstärkter Expression von IL-6 reagieren, wenn diese vorher mit anti-C5aR2-Antikörper inkubiert worden waren (118). Eine Interpretation dieser Ergebnisse ist, dass der C5aR2 seinen Liganden C5a ohne relevante Signalübertragung bindet und damit weniger C5a an den funktionellen, pro-inflammatorischen C5aR1 binden kann (53), (117)

Andererseits liegen Ergebnisse am CLP-Modell vor, welche eine pro-inflammatorische Wirkung des C5aR2 und synergistische Effekte beider C5a-Rezeptoren vermuten lassen. Hierbei zeigten C5aR2-knockout Tiere geringere Serumkonzentrationen verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren und höhere Überlebensraten als vergleichbare Wildtyp Tiere (120), (149). Erstaunlicherweise zeigten sich genau gegensätzliche Ergebnisse

im LPS-Modell. C5aR2-knockout Mäuse wiesen eine erhöhte Konzentration von IL-1 β im Serum und geringere Überlebensraten auf als vergleichbare Wildtyp Tiere (119). Somit bleibt die genaue Bedeutung des C5aR2 in der Sepsis unklar.

1.6 Hypothese

Dem Komplementsystem kommt eine zentrale Rolle in der IMD zu. In diesem Kontext sind die Mechanismen und die Bedeutung des MAKs (lytischer Zweig) sowie der Opsonierung sehr gut dokumentiert. Im Gegensatz dazu ist die Untersuchung des inflammatorischen Arms während der *Nme*-Sepsis bisher weitgehend vernachlässigt worden. Gleichzeitig gibt es jedoch deutliche Hinweise, dass der inflammatorische Zweig des Komplementsystems, repräsentiert durch die Anaphylatoxine C3a, C5a und deren Rezeptoren, eine zentrale Rolle während verschiedener, anderer Formen der Sepsis spielt. Aus diesem Grund lautet die Hypothese der vorliegenden Promotionsarbeit wie folgt:

„Generell wirkt das Komplementsystem, speziell der lytische Zweig (MAK), protektiv während einer Nme-Sepsis. Allerdings kann der inflammatorische Arm des Komplementsystems (C5a-C5aR-Achse) Symptome einer Nme-Sepsis verstärken.“

1.7 Herangehensweise

An der Maus soll zunächst ein *Nme*-Sepsis Tiermodell mit intraperitonealer Infektion von *N. meningitidis* MC58 etabliert werden. Im Vergleich von Wildtyp zu komplementdefizienten C3^{-/-} Mäusen soll hierbei einerseits die Bedeutung des murinen Komplementsystems anhand der Parameter „Überlebensrate“, „klinischer Zustand“ und „Bakteriämie“ untersucht werden. Andererseits soll die Rolle des inflammatorischen Arms durch Messung der Anaphylatoxine C3a und C5a im Blut beleuchtet werden. Mit Hilfe verschiedener Infektionsdosen soll ein geeignetes Inokulum für weitere Experimente ermittelt werden.

Am etablierten Modell soll dann die Rolle des C5aR1 untersucht werden. Dazu werden Kohorten von Wildtyp und C5aR1^{-/-} Mäusen infiziert und anhand der Parameter „Überlebensrate“, „klinischer Zustand“, „Bakteriämie“, „Konzentrationen von C3a und C5a“, sowie „Konzentrationen der pro-inflammatorischen Mediatoren IL-6, CXCL1, TNF- α “ miteinander verglichen. Im Anschluss sollen vergleichende, histologische Untersuchungen von Leber, Lunge und Milz infizierter Wildtyp und C5aR1^{-/-} Mäusen durchgeführt werden.

Danach soll überprüft werden, welchen Einfluss distinkte, C5aR1 exprimierende Zellpopulationen auf die Sepsis haben. Dazu werden Kohorten von Wildtyp und C5aR1^{-/-} Tieren unter Depletion von neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen verglichen.

Abschließend soll das therapeutische Potential des C5aR1-Antagonisten PMX205 an infizierten Wildtyp Mäusen in verschiedenen Therapieregimen anhand der Parameter „Überlebensrate“, „klinischer Zustand“, „Bakteriämie“ und „Konzentrationen der pro-inflammatorischen Mediatoren IL-6, CXCL1, TNF- α “ untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte

| | |
|--|---|
| Brutschränke (37 °C, 5 % CO ₂ , 90 % Luftfeuchtigkeit) | B 6200 (Heraeus, Hanau) INC 246 (Mettler, Schwabach) |
| Eismaschine (Flockeneisbereiter) | AF 156 (Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA) |
| ELISA-Reader | Multiskan EX (Thermo Labsystems, Waltham, USA) |
| ELISA-Washer | Nunc TM immuno Washer 12 (Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) |
| Gefrierereinheit | GGU 1500 (Liebherr, Bulle, Schweiz); (-22 °C) ThermoForma -86C ULT Freezer (Thermo Scientific, Waltham, USA); (-81 °C) |
| Heizblock | Thermochem (Liebisch, Bielefeld) |
| Anlage zur Maushaltung in individuell ventilierten Käfigen (IVC) | RAIR Isosystem TM (Lab Products, Seaford, USA) |
| Kühlschränke (4-7 °C) | FKS 1800 (Liebherr, Bulle, Schweiz) KS 3160 (Liebherr, Bulle, Schweiz) |
| Magnetrührer | MR 3001 (Heidolph, Schwabach) RCT (IKAMAG [®] , Staufen) |
| Mehrkanalpipetten | VWR Signature TM Ergonomic High-Performance 20-200 µl (VWR International, Darmstadt) |
| Mikroskope | Type 020-507.010 (Leica, Wetzlar) BZ-9000 Bioevo (Keyence, Osaka, Japan) |
| Mikrowelle | MWS 1820 Duo (Bauknecht, Stuttgart) |
| OP-Besteck: anatomische Scheren und Pinzetten verschiedener Größen | unbekannte Hersteller (bezogen von A. Hartenstein, Würzburg) |
| Photometer | CO8000 (WPA, Cambridge, UK) |
| pH-Meter | Lab 850 (SI Analytics, Mainz) |
| Pipetten | Research [®] plus 0,5-10 µl / 10-100 µl / 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg) Reference [®] 0,5-10 µl / 10-100 µl / 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg) PIPETMAN P20 / P200 / P1000 (Gilson, Middleton, USA) Multipette [®] M4 (Eppendorf, Hamburg) |
| Pipettierhilfe | accu-jet [®] pro (BRAND, Wertheim) |
| Schüttler | KL-2 (Edmund Bühler, Tübingen) |
| Taschenrechner | LCD 3112 (Olympia, Hattingen) |
| Uhr | Timer SKT 338 N (Oregon Scientific, Tualatin, USA) |
| Vortexer | REAX 2000 (Heidolph, Schwabach) |
| Waagen | ABT 120-5DM (Kern, Balingen-Frommern) PFB 6000-1 (Kern, Balingen-Frommern) P1200 (Mettler, Greifensee, Schweiz) |
| Sterilwerkbänke | LaminAir [®] HB 2472 (Heraeus, Hanau) |

| | |
|-------------|--|
| | MSC Advantage™ 1.5 (Thermo Electron LED, Langenselboid) |
| Zentrifugen | Biofuge fresco (Heraeus, Hanau) Rotanta 460 R (Hettich, Tuttlingen) |

Tabelle 1: Laborgeräte

2.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--|
| Blutagarplatten (Columbia Agar + 5 % Hammelblut) | COS 90 mm (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) |
| Deckgläser | Deckgläser 24x50 mm (unbekannter Hersteller, bezogen von A. Hartenstein, Würzburg) |
| Delimiting Pen | Dako-Pen (Agilent Technologies, Glostrup, Dänemark) |
| Desinfektionsmittel | terralin® liquid (Schülke, Norderstedt) |
| Dialysemembran | Dialysierschlauch VISKING® Typ 20/32 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) |
| Einmalkittel | Einmalkittel orange (VE 100 Stück) (RMP-med, Dresden) |
| Einmalhandschuhe | Peha-soft® nitril fino (Hartmann, Heidenheim) |
| Einmal-OP-Haube | (unbekannter Hersteller, bezogen von A. Hartenstein, Würzburg) |
| Einmalspritzen | 1 ml TBC (Dispomed, Gelnhausen) 5 ml SOFT-JECT® / 10 ml SOFT-JECT® (Henke Sass Wolf, Tuttlingen) 50 ml INFUJECT® (Dispomed, Gelnhausen) |
| ELISA Verschlussfolie | Selbstklebende Polyester-Verschlussfolie für PCR-Platten (unbekannter Hersteller, bezogen von A. Hartenstein, Würzburg) |
| Falcon | Falcon™, 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube (BD, Franklin Lakes, USA) |
| GC-VCNT Agarplatten | 36 g BD Difco™ Chocolate Agar Base (GC Medium) (BD, Franklin Lakes, USA) wurde in 1 l ddH ₂ O gelöst und bei 121 °C autoklaviert. Dem abkühlenden Agar wurde bei ca. 50 °C 10 ml Natriumhydrogencarbonat, 10 ml Kellogg's supplement und 10 ml gelöster VCNT Inhibitor beigefügt. Der Agar wurde in Petrischalen gegossen, 48 h bei Raumtemperatur getrocknet und bei +4 °C gelagert. |
| Impfschlinge | Impfschlinge 10 µl (Sarstedt, Nümbrecht) |
| Kanülen | Microlance™ 3 26G x 3/8" (BD, Franklin Lakes, USA) NEOJECT® 25G x 5/8" (Dispomed, Gelnhausen) |
| Küvette | Halb-Mikro-Küvette (Sarstedt, Nümbrecht) |
| Mundschutz | Foliodress® mask Loop (Hartmann, Heidenheim) |
| Objektträger-Küvette (Glas) | (unbekannter Hersteller, bezogen von A. Hartenstein, Würzburg) |

| | |
|--------------------------------|---|
| Objektträger-Küvette (Plastik) | Färbeküvette 'Coplin', PP, mit Schraubdeckel (Schlee, Witten-Herbede) |
| Petrischalen | Petrischalen 92x16 mm (Sarstedt, Nümbrecht) |
| Plastikschalen | Reagent Reservoirs 50 ml (VWR International, Radnor, USA) |
| Plastikkammern (Dialyse) | (unbekannter Hersteller, bezogen von A. Hartenstein, Würzburg) |
| Pipettenspitzen (Dispenser) | Combitips advanced® 1 ml / 5 ml (Eppendorf, Hamburg) |
| Pipettenspitzen (Pipetten) | 10 µl / 200 µl / 1000 µl (Sarstedt, Nümbrecht) |
| Protein G Säule | HiTrap™ Protein G HP (GE Healthcare, Chalfont, UK) |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf Tubes® 0,5 ml / 1,5 ml / 2,0 ml / 5,0 ml (Eppendorf, Hamburg) |
| Rollrandglas | 15 ml-Rollrandglas mit Deckel, 52x24 mm (bezogen von A. Hartenstein, Würzburg) |
| Sterilfilter | Filtropur S 0.2 (Sarstedt, Nümbrecht) |
| Tierfutter | 1314 TPF (Altromin, Lage) |
| Verschlussfolie | Parafilm M, 4IN. X 125 Ft. (Bemis, Neenah, USA) |
| Wattestäbchen | Wattestäbchen 15 cm (Heinz Herenz, Hamburg) |
| Zentrifugenröhrchen | 15 ml / 50 ml (Greiner Bio-One, Frickenhausen) |
| 96-Well-Platten | Microtest Plate 96 Well, R (Sarstedt, Nümbrecht) |
| 96-Well-Platte ELISA | Microplate, 96 well, PS, U-bottom, MICRO-LON® 600, high binding, clear (Greiner Bio-One, Frickenhausen) |

Tabelle 2: Erworbene Verbrauchsmaterialien

2.3 Reagenzien

2.3.1 Chemikalien

| | |
|-------------------------------|--|
| Ammoniumsulfat | Ammoniumsulfat (Merck, Darmstadt) |
| Aquadest (ddH ₂ O) | Aqua B. Braun Ecotainer® (B. Braun, Melsungen) |
| Avidin-Peroxidase | Avidin-Peroxidase 1 mg/ml (A3151-1MG) (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA) |
| BHI-Bouillon | BD Bacto™ Brain Heart Infusion (BD, Franklin Lakes, USA) |
| BSA | A1391,0100 Albumin Fraction V (pH 7,0) (PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt) |
| C3a | Purified Mouse C3a Protein (native) (BD, Franklin Lakes, USA) |
| C5a | Purified Recombinant Mouse C5a (BD, Franklin Lakes, USA) |

| | |
|----------------------------|---|
| Clodronat Liposomen | Clodronate Liposomes (Clodronate Liposomes.com, Amsterdam, Niederlande) |
| DAPI | DAPI for nucleic acid staining (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid Rotipuran® ≥ 99,8 % p.a. (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) |
| EDTA | EDTA disodium salt dihydrate BioChemica (AppliChem GmbH, Darmstadt) |
| Eindeckmedium | Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA) |
| Eisendextran | D8517 Iron-Dextran solution (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA) |
| Ethanol | Ethanol Rotipuran® ≥ 99,8 % p.a. (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) |
| Formaldehyd | Formaldehydlösung ≥ 35%, DAB für die Histologie (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) |
| FITC | NHS-Fluorescein, 100 mg (Thermo Scientific, Rockford, USA) |
| GC Medium | BD Difco™ Chocolate Agar Base (GC Medium) (BD, Franklin Lakes, USA) |
| Glycerin (Propantriol) | Glycerin 86 % Rotipuran® p.a. (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) |
| Heparin | Heparin (5000 U/ml) (Biochrom AG, Berlin) |
| Isotonische Kochsalzlösung | 0,9 % Natriumchlorid 100 ml (Fresenius Kabi, Bad Homburg) |
| Methanol | Methanol Rotipuran® ≥ 99,9 % p.a. (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) |
| Nafamostat | Nafamostat mesylate 50 mg (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) |
| Paraformaldehyd | Paraformaldehyd reinst, DAC (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) |
| 10xPBS (steril) | gibco® DPBS powder without calcium chloride and magnesium chloride (life technologies Corporation, Grand Island, USA) |
| Schwefelsäure | Schwefelsäure 96 % (Roth, Karlsruhe) |
| Sudanschwarz B | Sudan Black B (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA) |
| TRIS | TRIS Pufferan® ≥ 99,9 % (Roth, Karlsruhe) |
| Tween 20 | Tween 20 (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) |
| VCNT Inhibitor | BBL™ VCNT Inhibitor 10 ml (BD, Franklin Lakes, USA) |
| Wasserstoffperoxid | Wasserstoffperoxid 30 % (Merck, Darmstadt) |
| Xylol | Xylol Emsure® (Merck, Darmstadt) |
| Zymosan A | Zymosan A from Saccharomyces cerevisiae (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA) |

Tabelle 3: Chemikalien

2.3.2 Reaktionskits

| | |
|-----------------------|--|
| BCA Protein Assay Kit | Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) |
|-----------------------|--|

| | |
|--------------------------|--|
| CXCL/KC-ELISA Kit | DuoSet® ELISA Development System Mouse CXCL1/KC (R&D Systems, Minneapolis, USA) |
| IL-6-ELISA Kit | DuoSet® ELISA Development System Mouse IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, USA) |
| TMB Substrat | TMB Substrate Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) |
| TNF- α -ELISA Kit | DuoSet® ELISA Development System Mouse TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, USA) |

Tabelle 4: Reaktionskits

2.3.3 Antikörper

| | |
|--|---|
| mC3a-Primärantikörper (ELISA) | Purified Rat-anti-Mouse-C3a-antibody (clone I87-1162) (BD, Franklin Lakes, USA) |
| mC3a-Sekundärantikörper (ELISA) | Biotin-Rat-anti-Mouse-C3a-antibody (clone I87-419) (BD, Franklin Lakes, USA) |
| mC5a-Primärantikörper (ELISA) | Purified Rat-anti-Mouse-C5a-antibody (clone I52-1486) (BD, Franklin Lakes, USA) |
| mC5a-Sekundärantikörper (ELISA) | Biotin-Rat-anti-Mouse-C5a-antibody (clone I52-278) (BD, Franklin Lakes, USA) |
| Goat-anti-Rabbit-Cy3 (IF Färbung) | Cy TM 3 AffiniPure Goat-Anti-Rabbit-IgG (H+L) (min X Hu, Ms, Rat Sr Prot), 1,5 mg (Jackson Immuno Research, West Grove, USA) |
| Rabbit-anti-Neutrophilen-Elastase (IF Färbung) | Anti-Neutrophil-Elastase-antibody (ab68672) (Abcam, Cambridge, UK) |
| Rat-IgG (Therapie) | Normal Rat-IgG Control (Azide free) (R&D Systems, Minneapolis, USA) |

Tabelle 5: Antikörper

2.3.4 Lösungen aus Eigenherstellung

| | |
|----------------------------|---|
| Carbonatpuffer | 0,1 M NaHCO ₃ (0,1 l ansetzen) mit 0,1 M Na ₂ CO ₃ auf pH 9,5 einstellen |
| BHI | 37 g Bacto TM BHI in 1 l ddH ₂ O lösen, 15 min bei 121 °C autoklavieren |
| 100 x Kellogg's supplement | 40 g Glucose 1 g Glutamin 2 mg Thiaminpyrophosphat 5 mg Eisen(III)-nitrat Ad 100 ml ddH ₂ O, lagern bei -20 °C |
| Natriumhydrogencarbonat | 0,42 g NaHCO ₃ Ad 100 ml ddH ₂ O, lagern bei -20 °C |
| Natriumcitrat Puffer | 0,294 g C ₆ H ₅ O ₇ in 0,1 l ddH ₂ O lösen (10 mM), mit 1 M Zitronensäure auf pH 6,0 einstellen |
| Sudanschwarz B Lösung | 0,3 % Sudanschwarz B in 70 % EtOH 1 h rühren, durch Faltenfilter abfiltrieren |

Tabelle 6: Lösungen aus Eigenherstellung

2.3.5 Seren

| | |
|-----------------------------------|--|
| Kaninchen-anti- <i>Nme</i> -Serum | hergestellt von Kay Johswich in Toronto; polyklonaler AK, nicht aufgereinigt; gelagert bei -80 °C |
| Kaninchenserum (naiv) | Baby Rabbit Complement (Pooled Normal Rabbit Serum from Young Rabbits) (Cedarlane, Burlington, Canada) |
| Mausserum (naiv) | gepoolt aus Herzpunktion von WT Mäusen |
| Mausserum (Zymosan-aktiviert) | Mausserum mit 2 mg/ml Zymosan 1 h bei 37 °C aktiviert, abzentrifugiert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. |
| Ziegenserum | Normal Goat Serum (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA) |

Tabelle 7: Seren

2.4 Versuchstiere

2.4.1 Allgemeine Informationen zu Versuchstieren

Tierversuche im Rahmen dieses Projekts wurden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) sowie der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) durchgeführt und sind von der Regierung von Unterfranken unter den Tierversuchsnummern 55.2-2531-14/14 sowie 55.2-2532-2-165 genehmigt worden. Einige Experimente wurden im Labor von Scott Gray-Owen (University of Toronto) nach Genehmigung durch das *Animal Ethics Review Committee* der *University of Toronto* (Permit 20008007), welches dem *Province of Ontario's Animals for Research Act* sowie dem *Federal Council of Animal Care* unterliegt, durchgeführt. Alle verwendeten Mausstämme (transgen und Wildtyp) waren auf dem genetischen Hintergrund der C57Bl/6J Linie entstanden. Es wurden ausschließlich 6-8 Wochen alte, männliche Tiere verwendet. Unter Berücksichtigung der „3R“ (*replacement, reduction, refinement*) wurde darauf geachtet, die Belastung der Mäuse während der Zucht und während der Experimente auf das notwendige Mindestmaß zu beschränken.

2.4.2 Genotypen

2.4.2.1 Wildtyp-Maus

Die verwendeten C57BL/6J Wildtyp Mäuse („WT“) wurden von Harlan Laboratories und von Charles River Laboratories bezogen. Innerhalb eines Experiments wurden nur Mäuse eines Herstellers verwendet.

2.4.2.2 C3-knockout-Maus

Die C3-knockout-Maus-Linie („C3^{-/-}“; vollständiger Name: B6.129S4-C3^{tm1Cr/J} (157)) wurde von Prof. Dr. med. Andreas Klos vom Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) bezogen und im Tierhaltungstrakt des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie (IHM) der Universität Würzburg gezüchtet. Aus der Abwesenheit von C3 resultiert eine funktionelle Komplementdefizienz.

2.4.2.3 C5a-Rezeptor-knockout-Maus

Auch die C5a-Rezeptor-knockout-Maus („C5aR1^{-/-}“, vollständiger Name: B6.129S4-C5ar1^{tm1Cge/J} (158)) wurde von Prof. Dr. med. Andreas Klos bezogen und im Tierhaltungstrakt des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie (IHM) der Universität Würzburg gezüchtet.

2.4.3 Haltungs- und Hygienebedingungen

Die Tiere wurden im Tierhaltungstrakt des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg gehalten. Etwa eine Woche vor der Infektion wurden die Versuchstiere in das individuell ventilierte Käfigsystem (IVC) im Versuchsraum umgesetzt, um sich akklimatisieren zu können. Ein Streaustausch zwischen allen Käfigen eines Experiments wurde durchgeführt, um die Mikrobiome der Tiere in allen Käfigen einander anzupassen.

In beiden Räumen erfolgte die Tierhaltung nach konventionellem Hygieneschema mit Personal- und Materialbarriere. Die Tierhaltung und der Zutritt der Experimentatoren unterlagen den jeweiligen Hygienerichtlinien der Räume und waren in der Nutzerordnung und den Tierhaltungsrichtlinien des Instituts geregelt.

Es herrschte ein 12 Stunden Licht-Dunkelrhythmus. Die Temperatur betrug 22-24 °C und die Luftfeuchtigkeit 55±10 %. Mit Ausnahme der Zuchtpaare fand eine Geschlechtertrennung statt und maximal fünf Tiere wurden pro Käfig mit einer Grundfläche von > 500 cm² gehalten. Während der gesamten Zeit in der Zucht und im Laufe eines Expe-

riments hatten die Tiere uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Trockenfutter (Standard-Diät). Um eine artgerechte Haltung zu gewährleisten, wurde den Tieren Spiel- und Rückzugsmöglichkeiten (Hölzchen, Papier, Eierkartons, Häuschen) angeboten. Gesundheit und Wohlbefinden wurden durch tägliche Sichtkontrollen überwacht.

Mäuse aus externen Tierhaltungen wurden nur nach Vorlage eines aktuellen, maximal vier Wochen alten Gesundheitszeugnisses aufgenommen. Nach Empfehlungen der FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Association*) wurden die Tiere vierteljährlich im Zuge des Hygienemonitorings mittels Sentinels auf pathogene Keime untersucht (159). In den hier verwendeten Tieren wurde zu keiner Zeit ein mauspathogener Keim nachgewiesen, weshalb der Hygienestatus der Tiere als SPF (specified pathogen free) angegeben wird. Zusätzlich wurde der unspezifische Keimgehalt des Tierraums vierteljährlich mit Sedimentationsplatten und Abklatschproben kontrolliert.

2.5 Bakterien

2.5.1 Bakterienstämme, Lagerung und Umgang

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der bekapselte Stamm MC58 und seine unbekapselte Mutante MC58 Δ *csb* verwendet. Bakterienstocks wurden in 30 % Glycerin in BHI bei -80 °C gelagert. Die Handhabung erfolgte ausschließlich in Sterilarbeitsbänken unter Bedingungen der biologischen Sicherheitsstufe 2.

2.5.1.1 *Neisseria meningitidis* MC58

Der Stamm MC58 ist ein klinisches Isolat aus Großbritannien von 1983, (160), (161), (162). Er wurde von Andrew Gorringe (Public Health England) zur Verfügung gestellt, gehört zu der Serogruppe B und wird klassifiziert als B:15:P1.7,16-2:ST-74 cc32.

2.5.1.2 *Neisseria meningitidis* MC58 Δ *csb*

MC58 Δ *csb* ist die unbekapselte Mutante des klinischen Isolats MC58. Durch die Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette und eines vorzeitigen Stopcodons wurde das *csb*-Gen (formals *siaD*) deletiert, das für die Serogruppe B spezifische Polysialyltransferase codiert, und somit die Fähigkeit zur Kapselbildung ausgeschaltet (1), (163).

2.5.2 Hitzeinaktivierung

Bei einigen Experimenten wurden hitzeinaktivierte Bakterien verwendet. Dazu wurde das fertige Inokulum (Kapitel 2.6.2) für 30 min bei 70 °C auf dem Heizblock inaktiviert.

2.6 Infektion von Versuchstieren

2.6.1 Zeitangaben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuchstiere mit *Nme* infiziert. Alle zeitlichen Angaben orientieren sich an dem Zeitpunkt der Infektion (0 h). Ereignisse vor Beginn der Infektion sind mit einer negativen („-“), Ereignisse nach der Infektion mit einer positiven Zeitangabe („+“) gekennzeichnet.

2.6.2 Inokulum

Zum Zeitpunkt -24 h wurden ca. 10 µl der gefrorenen Bakterien-Stocklösung mit Hilfe einer Impfschlinge im Dreiösenausstrich auf eine Blutagarplatte ausgestrichen. Die Bakterien wurden über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, gesättigte Wasserdampf-atmosphäre) inkubiert.

Bei -5 h wurden etwa 10 - 20 Einzelkolonien aus der dritten Fraktion des Dreiösenausstrichs mit einem Wattestäbchen aufgenommen und ein flächendeckender Rasenausstrich auf einer zweiten, frischen, zimmerwarmen Blutagarplatte ausgeführt. Diese zweite Blutagarplatte wurde im Brutschrank für vier Stunden inkubiert, um maximal teilungsfähige Bakterien in der log-Phase zu erhalten.

Die explizite InokulumEinstellung für Infektionsversuche wurde zum Zeitpunkt -1 h vorgenommen. Mit Hilfe eines Wattestäbchens wurde der gesamte Bakterienrasen der zweiten Blutagarplatte abgeerntet und in 1000 µl BHI eingerieben. Eine 1:10 oder 1:20 Vorverdünnung mit BHI wurde angefertigt und anschließend deren optische Dichte (OD₆₀₀) bestimmt. Zunächst wurde eine Suspension mit einer OD₆₀₀ von genau 1,0 eingestellt, was einer Bakterienkonzentration von $1,5 \times 10^9$ CFU/ml entsprach. Die gewünschte Bakterienkonzentration im Inokulum wurde dann durch Verdünnungen in BHI eingestellt.

Unmittelbar vor Applikation des eingestellten, infekionsfertigen Inokulums wurden serielle Verdünnungen angelegt und ausplattiert, um die tatsächliche Menge von CFU zu ermitteln.

2.6.3 Infektion

Die Infektion erfolgte durch intraperitoneale (i. p.) Applikation des Inokulums in den linken unteren Quadranten ventral. Dazu wurden 200 µl des eingestellten Inokulums in einer 1 ml-Spritze mit einer 26 G Kanüle verabreicht. Bei einer Bakterienkonzentration im Inokulum von beispielsweise 5×10^5 CFU/ml entsprach das einer Infektion mit 10^5 CFU pro Tier. Für die Infektion jedes einzelnen Tieres wurden jeweils neue, sterile Spritzen und Kanülen verwendet.

Nicht infizierten Kontrolltieren wurde zum Zeitpunkt 0 h 200 µl BHI ohne *Nme* intraperitoneal appliziert. In Bezug auf Art und Lokalisation der Verabreichung unterschieden sich die Kontrolltieren nicht von den Falltieren.

Um eine produktive Infektion mit *Nme* zu erreichen, wurde den Versuchstieren zusätzlich zum Inokulum Eisendextran i. p. in den rechten unteren Quadranten ventral appliziert (164). Eisendextran wurde in isotonischer Kochsalzlösung auf 10 mg/ml verdünnt und sterilfiltriert. Zu den Zeitpunkten 0 h und +12 h wurden jeweils 200 µl (entsprechend 2 mg Eisen) in einer 1 ml-Spritze mit einer 26 G Kanüle i. p. verabreicht. Um Kontaminationen zu verhindern, wurden für jede einzelne Injektion neue, sterile Spritzen und Kanülen verwendet.

2.7 Klinische Überwachung von Versuchstieren

2.7.1 Parameter, Belastungsgrad und humaner Endpunkt

Die Tiere wurden nach der Infektion alle sechs Stunden anhand des in Tabelle 8 dargestellten Scoring-Schemas bewertet. Die Punktesumme aller vier Werte aus den Bereichen Körpergewicht, Allgemeinzustand, Verhalten und Klinik wurde gebildet (zwischen 0 und 80) und daraus auf den individuellen Belastungsgrad geschlossen. Dieser war als gering (1-9 Punkte), mittelgradig (10-19 Punkte) oder hochgradig (≥ 20 Punkte) definiert. Versuchstiere bei denen ein Überleben als sehr unwahrscheinlich eingestuft wurde oder die

für die Dauer von 24 Stunden eine hochgradige Belastung (≥ 20 Punkte) ohne Tendenz zur Besserung aufwiesen, hatten den humanen Endpunkt erreicht und wurden unverzüglich mit CO₂-Inhalation euthanasiert. Versuchsende war bei allen Tieren spätestens nach 138 h, entsprechend 5,75 Tagen.

| Symptome | | Punkte |
|-------------------------|---|--------|
| Körpergewicht | < 3 % Abnahme | 0 |
| | Abnahme 3-5 % | 1 |
| | Abnahme 5-10 % | 5 |
| | Abnahme 10-20 % | 10 |
| | Abnahme > 20 % | 20 |
| Allgemeinzustand | Glattes, glänzendes Fell, ausgestrecktes Laufen, klare Augen | 0 |
| | Leichte Felldefekte | 1 |
| | Fell stumpf/ungeordnet, leichte Aufkrümmung | 5 |
| | Fell dreckig, After kotverschmiert, Augen trüb/Ausfluss, starke Aufkrümmung | 10 |
| | Zittern/Schwanken, starke Dehydrierung | 20 |
| Verhalten | Normal (agil, neugierig) | 0 |
| | Leichte Abweichung | 1 |
| | Eingeschränkte Motorik | 5 |
| | Selbstisolation, Lethargie, Koordinationsstörung | 10 |
| | Bewusstlosigkeit, kein Abwehrverhalten beim Hochnehmen | 20 |
| Klinik | Normalzustand (Atemfrequenz, Durchblutung) | 0 |
| | Leichte Abweichung | 1 |
| | Atemfrequenz +/- 30 % | 10 |
| | Atemfrequenz +/- 50 %, Durchblutungsstörungen | 20 |

Tabelle 8: Scoring Schema

2.7.2 Verblindung

Die Tierversuche wurden verblindet, d. h. von zwei Untersuchern durchgeführt. Untersucher A führte das Scoring durch. Untersucher B führte die Infektion und gegebenenfalls die Applikation von Substanzen durch. Um eine potentielle Verzerrung bei der klinischen Bewertung zu minimieren (*observer bias*), wurde bis zum Ende des Versuches kein Informationsaustausch zwischen den beiden Untersuchern bezüglich der Gruppenzugehörigkeit einzelner Mäuse (Fall- und Kontrollgruppe oder Behandlungsgruppen) betrieben.

2.8 In vivo Bestimmung der Bakterienlast

2.8.1 Probengewinnung und Prozessierung

Die Bakterienlast im Blut infizierter Mäusen (Bakteriämie) wurde zu definierten Zeitpunkten gemessen. Dafür wurden Schwanz- und Herzblut verwendet.

2.8.1.1 Schwanzblut

Die Bestimmung der Bakterienlast im Schwanzblut erfolgte zu den Zeitpunkten +3 h, +12 h, +24 h, +36 h, +48 h, +60 h, +72 h, +90 h, +114 h, +138 h. Mit einer sterilen 25 G Kanüle wurde die Schwanzvene ca. 1 - 2 cm proximal des desinfizierten Schwanzendes punktiert und 5 µl Blut entnommen.

2.8.1.2 Herzblut

Am Versuchsende wurde Herzblut durch eine Herzpunktion gewonnen. Euthanasierte Tiere wurden mit ausgestreckten Extremitäten in Rückenlage fixiert und die Bauchseite mit Terralin® desinfiziert. Das Herz wurde mit einer sterilen 25 G Kanüle durch die Haut hindurch punktiert (links lateral der Mediosternallinie, einige Millimeter unterhalb des Rippenbogens) und Herzblut mit einer 1 ml-Spritze entnommen.

2.8.1.3 Prozessierung

5 µl des gewonnenen Bluts wurden 1:10 in 45 µl Heparin in PBS (12,5 U/ml) verdünnt. In einer 96-Well Platte erfolgten fünf weitere serielle 1:10 Verdünnungen mit jeweils 10 µl Probe und 90 µl PBS. Jeweils 20 µl aller sechs Verdünnungsstufen wurden auf eine GC/VCNT-Platte pipettiert über Nacht im Brutschrank inkubiert und die CFU am nächsten Tag bestimmt, um die Bakterienkonzentration im Blut der Tiere zu ermitteln.

2.9 Messung pro-inflammatorischer Mediatoren

2.9.1 Probengewinnung und Prozessierung

Die Konzentration verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren wurde im Blut und in der Peritoneallavage (PL) per ELISA gemessen.

2.9.1.1 Blutplasma

Gewonnenes Blut (Kapitel 2.8.1) wurde direkt nach der Abnahme durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 2,5 - 5,0 mM) und Nafamostat (Endkonzentration 0,1 mg/ml) antikoaguliert und auf Eis gekühlt. Die zellulären Bestandteile wurden für 10 min bei 4 °C mit 13.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand (Blutplasma) wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.9.1.2 Peritoneallavage

Vor jeder Peritoneallavage (PL) wurde eine Herzpunktion durchgeführt (Kapitel 2.8.1), um die Kontaminationsgefahr durch Blutbestandteile zu minimieren. Das Abdomen wurde in der Medianlinie von Sternum bis Blase eröffnet und das Peritoneum stumpf freipräpariert. 3 ml PBS wurden mit einer 5 ml-Spritze per 26 G Kanüle in den Peritonealraum instilliert und eine Durchmischung wurde durch leichte, zirka 30-sekündige Agitation des Abdomens ermöglicht. Die Einstichstelle wurde etwas erweitert, die PL wurde mit einer 5 ml-Spritze zurückgewonnen und ab sofort mit Eis gekühlt. Die zellulären Bestandteile wurden für 3 min bei 4 °C und 600 rpm zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.9.2 ELISA

2.9.2.1 Allgemeine Informationen zu durchgeführten ELISA

Plasmaproben und Peritoneallavagen wurden per ELISA auf die Anaphylatoxine C3a und C5a sowie auf die pro-inflammatorischen Mediatoren TNF- α , IL-6 und KC/CXCL-1 hin untersucht. Sofern nicht explizit erwähnt, wurden alle Schritte bei Raumtemperatur (ca. 22 °C) (RT) in 96-Well-ELISA-Platten durchgeführt, die während der Inkubationszeit mit Folie versiegelt wurden. ELISA mit potentiell infektiösen Proben wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Beim Standard und Blank wurden Doppelwerte angefertigt und zur Auswertung das arithmetische Mittel gebildet. Bei Proben von Plasma oder PL wurden aufgrund des geringen Volumens i. d. R. Einfachwerte verwendet.

2.9.2.2 C3a- und C5a-ELISA

Puffer und Proben

| | C3a-ELISA | C5a-ELISA |
|---------------------------|---|---|
| Blockpuffer | 5 % BSA in PBS (pH 7,4) | |
| Waschpuffer | PBS/T | |
| Blank | 5 % BSA in PBS (pH 7,4) | |
| Plasmaproben | In PBS/T, 1:10 bis 1:25 | In PBS/T, unverdünnt und 1:10 bis 1:25 |
| Standard | Zymosan-aktiviertes Mause- rum in PBS/T, serielle 1:3,16 Verdünnungsreihen startend bei 1:10 bis 1:10.000 | Purified Recombinant Mouse C5a in 1 % BSA in PBS (pH 7,4), serielle 1:2 Verdün- nungsreihe startend bei 10 ng/ml, bis 0,156 ng/ml |
| Primärantikörper | Purified Rat-anti-Mouse-C3a-/C5a-antibody in 0,1 M Carbonat- puffer (pH 9,5) 1:125 verdünnen (Endkonzentration 4 µg/ml). | |
| Sekundärantikörper | Biotin-Rat-anti-Mouse-C3a-/C5a-antibody in PBS/T 1:500 verdün- nen (Endkonzentration 1 µg/ml). | |
| Avidin-Peroxidase | in PBS/T 1:10.000 verdünnen (Endkonzentration 0,1 µg/ml) | |
| Substratlösung | TMB-Substrat | |
| Abstopplösung | 1 M Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) | |

Tabelle 9: Puffer und Proben für C3a- und C5a-ELISA

Protokoll

In jedes Well einer ELISA-Platte wurden 50 µl C3a-/C5a-Primärantikörper pipettiert, mit Folie versiegelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Primärantikörper wurde entfernt, dreimal mit je 200 µl frischem Waschpuffer gewaschen, anschließend je 200 µl Blockpuffer pro Well hinzugefügt und 1 h bei RT geblockt. Je 50 µl Proben (Standard, Blank, Plasma) wurden hinzugeben und 1 h bei RT inkubiert. Die Wells wurden dreimal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen, 50 µl des verdünnten C3a-/C5a-Sekundärantikörpers hinzugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Dann wurden die Wells dreimal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen, je 50 µl Avidin-Peroxidase wurde hinzugeben und 1 h bei RT inkubiert. Die Wells wurden dreimal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen, je 100 µl von frisch hergestelltem TMB-Substrat wurde hinzupipettiert und die Farbreaktion wurde für einige Minuten abgewartet. 100 µl 1 M Schwefelsäure (H₂SO₄) wurde dazugegeben und bei 450 nm im Photometer gemessen.

2.9.2.3 TNF- α -, IL-6- und KC/CXCL1-ELISA

Die TNF- α -, IL-6- und KC/CXCL1-ELISA wurden mit den enthaltenen Substanzen der Reaktionskits durchgeführt. Die vom Hersteller empfohlenen Protokolle wurden leicht modifiziert.

Puffer und Proben

Die Plasma- und PL-Proben wurden in PBS/T, die Primärantikörper wurden in PBS und die Avidin-Peroxidase sowie der Sekundärantikörper wurden mit 1 % BSA in PBS wie in der Tabelle 10 angegeben verdünnt.

| | TNF-α | IL-6 | KC/CXCL1 |
|---------------------------|---|-------------------------|-------------------------|
| Blockpuffer | 1 % BSA in PBS | | |
| Waschpuffer | PBS/T | | |
| Blank | 1 % BSA in PBS | | |
| Plasmaproben | 1:4 bis 1:10 | 1:10 bis 1:1.000 | 1:10 bis 1:10.000 |
| PL Proben | - | unverdünnt und 1:10 | unverdünnt und 1:10 |
| Standard | Nach Herstellerangaben in 1 % BSA in PBS verdünnen | | |
| Primärantikörper | 1:125 0,8 μ g/ml | 1:120 2,0 μ g/ml | 1:120 2,0 μ g/ml |
| Sekundärantikörper | 1:60 50 ng/ml | 1:60 150 ng/ml | 1:60 200 ng/ml |
| Avidin-Peroxidase | 1:40 | 1:40 | 1:40 |
| Substratlösung | TMB-Substrat | | |
| Abstopplösung | 1 M Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) | | |

Tabelle 10: Puffer und Proben für in TNF- α -, IL-6- und KC/CXCL1-ELISA

Modifiziertes Protokoll

Für die TNF- α -, IL-6- und KC/CXCL1-ELISAs wurde das Protokoll der C3a/C5a-ELISA (Kapitel 2.9.2.2) mit folgenden Änderungen verwendet: Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei RT. Die Inkubation der Proben (je 50 μ l Standard, Blank, Plasma/PL) und der Sekundärantikörper erfolgte 2 h bei RT. Die Inkubationszeit der Avidin-Peroxidase betrug 20 min.

2.9.3 C5a in vivo capture assay

2.9.3.1 Allgemeine Informationen

Da C5a an den spezifischen Rezeptoren C5aR1 und C5aR2 bindet oder rasch von der Carboxypeptidase B zur geringer potenten Form C5a-desArg gespalten wird, beträgt

seine Halbwertszeit im Blut nur wenige Minuten (165), (166) und eine exakte Konzentrationsbestimmung ist daher schwierig.

Mit dem „C5a in vivo capture assay“ wurde eine genaue Bestimmung der C5a-Konzentration im Blut angestrebt, indem infizierten Versuchstieren ein C5a-Sekundärantikörper i. p. verabreicht wurde, welcher C5a sofort nach der Entstehung im Blut binden und vor einem schnellen Abbau schützen konnte.

2.9.3.2 Durchführung

C5a-Sekundärantikörper (Biotin-Rat-Anti-Mouse-C5a-Antikörper) enthält 0,09 % Natriumazid als Konservierungsmittel, welches toxisch ist (167). Deshalb wurde er vor Verwendung für 6 h mit einer autoklavierten Dialysemembran gegen 50 ml PBS dialysiert. Anschließend wurde der C5a-Sekundärantikörper mit PBS auf eine Endkonzentration von 20 µg/ml verdünnt und 200 µl (entsprechend 4 µg) pro Tier bei +12 h i. p. appliziert. Bei +15 h wurde Blutplasma euthanasierter Versuchstiere per Herzpunktion (Kapitel 2.8.1) gewonnen und ELISAs zur C5a Messung durchgeführt.

2.9.3.3 C5a Messung per ELISA

Puffer und Proben

| | C5a-ELISA |
|---------------------------|--|
| Blockpuffer | 5 % BSA in PBS (pH 7,4) |
| Waschpuffer | PBS/T |
| Blank | 5 % BSA in PBS (pH 7,4) |
| Plasmaproben | Unverdünnt bei uninfizierten Versuchstieren (0 h); unverdünnt und 1:10 in PBS/T verdünnt bei infizierten Versuchstieren (+12 h) |
| Standard | Rekombinantes, murines C5a mit 2 µg/ml C5a-Sekundärantikörper vorinkubiert, in PBS/T serielle 1:3,16 Verdünnungsreihen startend bei 1000 nM, bis 0,01 nM |
| Primärantikörper | Purified Rat-anti-Mouse-C5a-antibody in 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,5) 1:125 verdünnen (Endkonzentration 4 µg/ml). |
| Sekundärantikörper | Biotin-Rat-anti-Mouse-C5a-antibody (Kapitel 2.9.3.2) |
| Avidin-Peroxidase | in PBS/T 1:10.000 verdünnen (Endkonzentration 0,1 µg/ml) |
| Substratlösung | TMB-Substrat |
| Abstopplösung | 1 M Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) |

Tabelle 11: Puffer und Proben für ELISA des „C5a in vivo capture assay“

“C5a in vivo capture assay” ELISA Protokoll

In jedes Well einer ELISA-Platte wurden 50 µl C5a-Primärantikörper pipettiert, mit Folie versiegelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Primärantikörper wurde entfernt, dreimal mit je 200 µl frischem Waschpuffer gewaschen, anschließend je 200 µl Blockpuffer pro Well hinzugefügt und 1 h bei RT geblockt. Je 50 µl Proben (Standard, Blank, Plasma) wurden hinzugeben und 1 h bei RT inkubiert, bevor die Wells dreimal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen wurden. Danach wurde je 50 µl Avidin-Peroxidase hinzugegeben, 1 h bei RT inkubiert und dreimal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Je 100 µl von frisch hergestelltem TMB-Substrat wurde hinzu pipettiert und die Farbreaktion für einige Minuten abgewartet. 100 µl 1 M Schwefelsäure (H₂SO₄) wurden dazugegeben und die Platte bei 450 nm im Photometer gelesen.

2.10 In vivo C5aR1-Antagonisierung mit PMX205

Das zyklische Hexapeptid PMX205 ist ein Antagonist des C5aR1 (168) (169). PMX205 wurde freundlicherweise von Prof. Trent Woodruff von der Universität Queensland, Australien, zur Verfügung gestellt. PMX205 wurde mit 5 % Glukose in ddH₂O auf die entsprechende Endkonzentration verdünnt und den Versuchstieren zu den angegebenen Zeitpunkten i. p. appliziert. Kontrolltiere erhielten 5 % Glukose in ddH₂O.

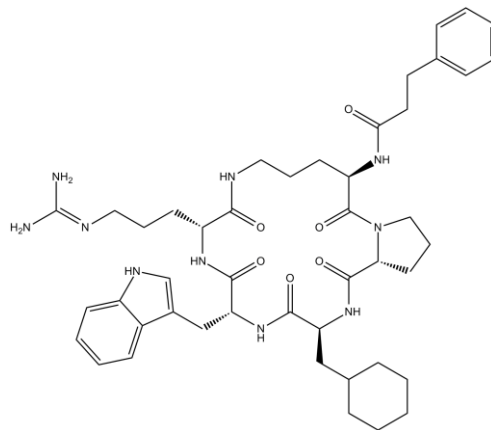


Abbildung 2

Struktur des C5aR1 Antagonists PMX205 (170)

2.11 In vivo Zelldepletion

2.11.1 Kontrollgruppe

Den Mäusen der Kontrollgruppe wurde zu den Zeitpunkten -72 h, -24 h, -12 h, 0 h, +12 h, +24 h, +36 h, +48 h 200 µl PBS i. p. appliziert.

2.11.2 Depletion von Neutrophilen mit RB6/8C5 Antikörper

RB6/8C5 ist ein monoklonaler Ratte-IgG2b Antikörper, der *in vivo* selektiv an murine neutrophile und eosinophile Granulozyten bindet und zur Depletion dieser Zellreihen führt (171), (172), (173), (174). Die Hybridomalinie wurde freundlicherweise von Prof. Paul Allen von der Universität Washington, School of Medicine, St. Louis, USA (Department of Pathology and Immunology), zur Verfügung gestellt. RB6/8C5 AK wurde von Lea Strobel und Christina Linnemann aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg (AG Johswich) aus Zellkulturüberständen mit einer Protein G Säule aufgereinigt. Die Stocklösung wurde mit PBS auf die Endkonzentration 1,25 mg/ml verdünnt und je 200 µl (entsprechend 250 µg RB6/8C5 AK) pro Tier zu den Zeitpunkten -24 h, 0 h, +24 h und +48 h i. p. appliziert.

2.11.3 Depletion von Makrophagen mit Clodronat-Liposomen

Clodronat-Liposomen sind in Lipidpartikel verpackte Bisphosphonate, welche *in vivo* zu einer Makrophagendepletion führen. Die Entwicklung dieser Substanz (175), (176) sowie die Beschreibung des Mechanismus gehen auf van Rooijen zurück (177). Die Clodronat-Liposomen wurden gebrauchsfertig bei clodronateliposomes.com (178) als Lösung erworben und den Versuchstieren je 200 µl zu den Zeitpunkten -72 h und -12 h i. p. verabreicht.

2.12 Test von PMX205 auf Bakterizidie

Mit dem Test von PMX205 auf Bakterizidie („PMX205 Killing assay“) wurden potentiell bakteriostatische bzw. bakterizide Eigenschaften der Substanzen PMX205 auf *Nme* MC58 untersucht. Eine serielle Verdünnungsreihe (150 µg/ml - 2,3 µg/ml) von PMX205

wurde in 1 % Glukose in Mausserum erstellt. 40 µl jeder Verdünnung wurden in Dreifachwerten in eine 96-Well-Platte gegeben, mit 500 CFU *Nme* in 10 µl PBS versetzt und versiegelt für 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden in Dreifachwerten 1:10 und 1:100 Verdünnungen mit PBS hergestellt, je Well 20 µl auf einer GC-VCNT Platte ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die CFU wurden gezählt und das arithmetische Mittel gebildet. Der Test von PMX205 auf Bakterizidie wurde von Christina Linnemann aus der AG Johswich, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

2.13 Anfertigung histologischer Schnitte

2.13.1 Gewebentnahme

Euthanasierte Versuchstiere wurden in Rückenlage fixiert und die Bauchhaut, subkutanes Fettgewebe und das Peritoneum in der Medianlinie von Sternum bis Blase eröffnet. Ca. 0,5 cm große Organproben von Leber, Lunge und Milz wurden entnommen und in 15 ml-Rollrandgläsern in 4 % Paraformaldehyd in PBS für 24 h fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

2.13.2 Gewebsfixation auf Objektträgern

Die weiteren Schritte der histologischen Gewebspräparation bestehend aus Einbetten, Schneiden und Aufbringen der Organe auf Objektträgern wurden von Erna Kleinschroth mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. Süleyman Ergün vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

2.14 Immunfluoreszenzfärbung

2.14.1 Herstellung von Rabbit-anti-Nme-FITC-Antikörper

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurde Rabbit-anti-Nme-FITC-Antikörper aufgereinigt und markiert („labeling“). Grundlage war Kaninchenserum von einem Tier, das mit hitzeinaktiviertem *Nme* (MC58 und MC58siaD) infiziert worden war (Kapitel 2.3.5). Die Herstellung dieses Kaninchensersums wurde von Kay Johswich an der Universität Toronto durchgeführt und seitdem bei -80 °C gelagert.

2.14.1.1 Aufreinigungsprotokoll von Kaninchenenserum

Die Protein G Säule wurde unter der Sterilwerkbank mit 35 ml PBS durchgespült. 2 ml Kaninchenserum wurde in PBS 1:5 verdünnt, dreimal durch die Säule gedrückt und danach mit 35 ml PBS nachgespült. Anschließend wurden 10 ml 0,2 M Glycerin in ddH₂O sterilfiltriert und durch die Säule gedrückt. Die Säule wurde erneut mit 30 ml PBS gespült, was insgesamt 10 ml Eluat ergab. Das Eluat wurde mit 1,3 ml 1 M Tris Puffer auf pH 8,0 gebracht, 6,5 g Ammoniumsulfat (NH₄SO₄) bei RT hinzugegeben, um den Antikörper auszufällen. Das Präzipitat wurde bei 4600 rpm, 4 °C, 10 min zentrifugiert und das Pellet in 3 ml PBS gelöst. Die Lösung wurde lichtgeschützt über Nacht bei 4 °C mit einem Dialyseschlauch (Porengröße 15 kDa) gegen 1 l PBS dialysiert. Der aufgereinigte Antikörper wurde aliquotiert bei -80 °C eingefroren.

2.14.1.2 Antikörpermarkierung mit FITC („labeling“)

2 mg FITC wurde in 200 µl sterilem DMSO gelöst (10 mg/ml), 10,5 µl davon wurden in 614,5 µl PBS verdünnt und 500 µl aufgereinigtes Kaninchenserum („Überstand“) dazugegeben. Die Lösung wurde für 2 h auf dem Schüttler inkubiert und anschließend lichtgeschützt über Nacht bei 4 °C mit einem Dialyseschlauch gegen 1 l PBS dialysiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde der FITC-markierte-Antikörper bei -20 °C gekühlt.

2.14.2 Färbeprotokoll

Die Schnitte wurden dreimal für je 7 min in Xylol gestellt und über eine steigende Ethanol-Reihe (100 %, 96 %, 70 %, 50 % ddH₂O) rehydriert. Die Wiederherstellung der nativen Antigen-Konformation erfolgte durch Aufkochen in 10 mM Na-Citrat Puffer (pH 6) in der Mikrowelle mit anschließender langsamer Abkühlung (> 1 h). Dann wurden die Schnitte dreimal je 5 min in PBS gewaschen, für 30 min in 3 % H₂O₂ in MeOH gestellt und erneut dreimal je 5 min in PBS gewaschen. Die Gewebeproben wurden mit dem Delimiting-Pen eingerahmt, mit je 100 µl Blockpuffer (5 % BSA, 5 % goat Serum in PBS) geblockt und über Nacht bei RT in feuchter Kammer gelagert. Die Schnitte wurden je 5 min zweimal in PBS/T und einmal in PBS gewaschen. Jede Gewebeprobe wurde mit 100 µl Rabbit-anti-Neutrophilen-Elastase (1:200) für 2 h bei RT in feuchter Kammer inkubiert und dann erneut je 5 min zweimal in PBS/T und einmal in PBS gewaschen. Die

Schnitte wurden mit 100 µl Blockpuffer (5 % BSA, 5 % goat Serum in PBS) 15 min bei RT in feuchter Kammer inkubiert und dann je 5 min zweimal in PBS/T und einmal in PBS gewaschen. Die Gewebeprobe wurde mit je 100 µl Goat-anti-Rabbit-Cy3 (1:200) 1 h bei RT in feuchter Kammer inkubiert und je 5 min zweimal in PBS/T und einmal in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte in je 100 µl Rabbit-anti-Nme-FITC (Kapitel 2.14.1) (1:30) 1 h bei RT in feuchter Kammer inkubiert und je 5 min zweimal in PBS/T und einmal in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden 10 min in Sudanschwarz B Lösung gefärbt und in PBS gewaschen. Je 100 µl DAPI (1 µg/ml in PBS) wurden auf jede Gewebeprobe gegeben und nach 10 min mit Fluoroshield eingedeckt.

2.14.3 Mikroskopie

Die hergestellten Schnitte wurden mit dem Digitalmikroskop BZ-9000 Bioevo von Keyence (Osaka, Japan) mikroskopiert. Helligkeit, Kontrast und Schwarzabgleich wurden mit der Analysesoftware BZ-II Analyzer bearbeitet.

2.15 Statistik

Die Graphen dieser Arbeit wurden mit GraphPad Prism (Version 6.04) und Microsoft Excel erstellt. Für Vergleiche zweier Gruppen mit nicht-parametrischen Daten (z. B. klinischer Score) oder mit parametrischen Daten, die nicht einer Gauß'schen Normalverteilung (nach Kolmogorow-Smirnow-Test bestimmt) folgen, wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Bei Vergleichen zweier Gruppen mit normalverteilten parametrischen Daten wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's T-test angewendet. Analyse von normalverteilten parametrischen Daten wurde für Datensätze mit mehr als zwei Gruppen per one-way-ANOVA unter Verwendung von Dunnett's *post hoc* Test durchgeführt, wobei gegen die Kontroll-Kohorte ohne Behandlung verglichen wurde. Analog wurde bei nicht-parametrischen Daten oder nicht normalverteilten Daten der Kruskal-Wallis-Test unter Verwendung von Dunnett's *post hoc* Test analysiert. Zur Analyse von Überlebenskurven wurde der Mantel-Cox-Test angewendet. Unterschiede wurden bei einem *P*-Wert von kleiner als 0,05 als statistisch signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des *Nme*-Sepsis-Modells in der Maus

Salit *et al.* konnten 1984 ein Mausmodell mit intranasaler Infektion zur Untersuchung der Pathophysiologie der *Nme*-Infektion etablieren (179), (180). Es gelang durch zusätzliche i. p. Applikation von Eisendextran (164), Mäuse mit verschiedenen Serogruppen des humanspezifischen Pathogens *Nme* zu kolonisieren und zu infizieren.

Gleichzeitig wurde 1983 von Baker *et al.* das „cecal ligation and puncture“ (CLP) Modell in der Maus zur Untersuchung einer polymikrobiellen Sepsis beschrieben (181). Heutzutage ist das CLP-Modell das am häufigsten verwendete Modell zur Untersuchung der polymikrobiellen Sepsis (129). Es ist Grundlage für wichtige Erkenntnisse über die Rolle des Komplementsystems (182) und speziell der C5a-C5aR-Achse (120), (142) während einer polymikrobiellen Sepsis.

Bei Verwendung dieser Tiermodelle und Interpretation erhobener Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass *Nme* ein humanspezifisches Pathogen ist. Auswirkungen der Sepsis auf den gesamten Organismus können in der Maus zwar untersucht und dargestellt werden, eine vollständige Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die *Nme*-Sepsis am Menschen ist jedoch nicht zulässig.

Obwohl bekannt ist, dass dem Komplementsystem in der Abwehr gegenüber IMD beim Menschen eine zentrale Bedeutung zukommt, wurde die Rolle des Komplementsystems in der murinen *Nme*-Sepsis bislang nur unzureichend untersucht. Aus diesem Grund wurde am Beginn dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen *Nme*-Sepsis und Komplementaktivierung in der Maus geklärt.

3.1.1 Rolle des Komplementsystems in der murinen *Nme*-Sepsis

Kohorten von WT und C3^{-/-} Mäusen wurden mit Infektionsdosen von 10¹ bis 10⁵ CFU i. p. infiziert. Zu den Zeitpunkten 0 h und +12 h wurde 2 mg freies Eisen (Fe³⁺) in Form von Eisendextran i. p. appliziert (Kapitel 2.6.3). Die Überlebensrate, die Bakteriämie und das klinische Erscheinungsbild im zeitlichen Verlauf sind in Abbildung 3 dargestellt.

Bei der Infektionsdosis 10^5 CFU zeigte sich eine hohe Letalität in beiden Genotypen. Bereits nach 18 h waren alle $C3^{-/-}$ Tiere und nach 24 h 4 von 5 WT Tieren aus dem Versuch ausgeschieden. Entsprechend dazu zeigten alle Versuchstiere innerhalb der ersten 12-24 h schnell ansteigende klinische Scores bis zu 60 Punkten und eine stete Zunahme der Bakteriämie bis zu 10^9 CFU/ml. Das einzig überlebende WT Tier zeigte nach einem initialen Peak bei +12 h im klinischen Scoring und in der Bakteriämie eine Reduktion beider Parameter. Nach 36 h waren keine Bakterien im Blut mehr nachweisbar und der klinische Score normalisierte sich bis +120 h auf 0 Punkte.

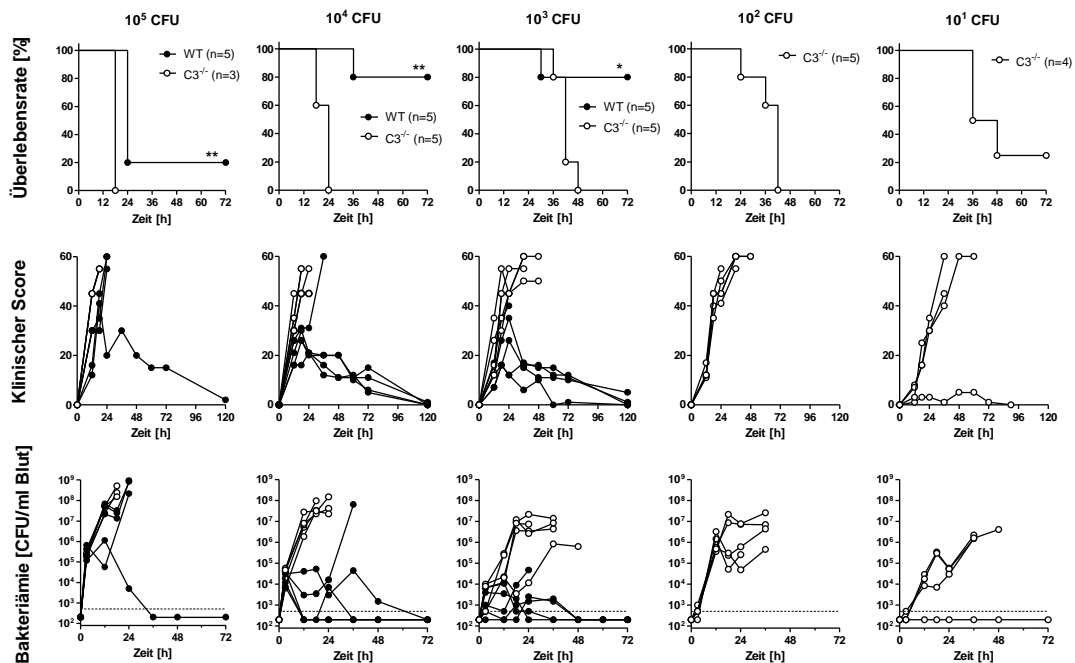


Abbildung 3

Bedeutung des Komplementsystems für Überlebensrate, klinischen Score und Bakteriämie in WT (●) und $C3^{-/-}$ (○) Mäusen nach intraperitonealer Infektion mit verschiedenen Inokula von *N. meningitidis* MC58. Inokula (10^1 bis 10^5 CFU pro Tier) wie oberhalb der Graphen angezeigt; Gruppengrößen in jeweils oberen Graphen angezeigt; Überlebensraten (oben) wurden per Mantel-Cox-Test statistisch analysiert (*, **: $P < 0.05$, $P < 0.01$). Klinischer Score (Mitte) und Bakteriämie (unten) wurde für jedes Tier individuell aufgetragen.

Mit abnehmender Infektionsdosis stieg die Überlebensrate der WT Mäuse, sodass bei 10^4 und 10^3 CFU je 4 von 5 der Versuchstiere überlebten. Parallel dazu zeigten sich bei WT Mäusen niedrigere klinische Scores (bis zu 40 Punkte) und eine niedrigere Bakteriämie

(bis zu 10^5 CFU/ml Blut) bei einer Infektion mit 10^4 und 10^3 CFU im Vergleich zu einer Infektion mit 10^5 CFU.

Im Gegensatz zur Situation bei WT Mäusen, war bei $C3^{-/-}$ Mäusen bei sinkender Infektionsdosis kein Anstieg der Überlebensrate zu erkennen. Bei den Infektionsdosen 10^4 , 10^3 und 10^2 CFU überlebte keines der Tiere bis zum Versuchsende.

Bei 10^1 CFU überlebte 1 von 4 Mäusen. Hierbei war auffällig, dass dieses Tier gleichzeitig nur einen geringen klinischen Score aufwies und über den gesamten Versuchszeitraum keine Bakterien im Blut zu messen waren, weshalb unklar ist, ob hier eine erfolgreiche Infektion stattgefunden hat.

Die klinischen Scores der $C3^{-/-}$ Mäuse blieben unabhängig von der Infektionsdosis (10^1 - 10^5 CFU) unverändert hoch (bis zu 60 Punkte). Die Bakteriämie zum Todeszeitpunkt der $C3^{-/-}$ Mäuse sank mit abnehmender Infektionsdosis um mehr als zwei log-Stufen, betrug aber dennoch bei einer Infektionsdosis von 10^1 CFU über 10^6 CFU/ml Blut.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Komplementsystem auch im Modellorganismus Maus eine essenzielle Rolle zur Bekämpfung der *Nme*-Sepsis einnimmt und komplementdefiziente Organismen eine vielfach höhere Suszeptibilität gegenüber *Nme* im Vergleich zu WT Mäusen aufweisen.

3.1.2 Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a

In dieser Versuchsserie wurde die Aktivierung des inflammatorischen Arms des Komplementsystems während der *Nme*-Sepsis untersucht. Dazu wurden die Konzentrationen der aktivierten Komplement-Fragmente C3a und C5a im Blut von WT Mäusen vor und nach einer Infektion bestimmt.

3.1.2.1 C3a

Die Konzentration von C3a wurde im Schwanzblut von WT Mäusen per C3a-ELISA (Kapitel 2.9.2.2) vor und 12 h nach intraperitonealer Infektion mit 10^5 CFU MC58 gemessen. Das Ergebnis der C3a-Konzentrationen ist in Abbildung 4A dargestellt. Die C3a-Konzentration in Zymosan-aktiviertem Mausserum als Referenz (Kapitel 2.3.5) wurde auf 1000 Units/ml definiert.

Es zeigte sich, dass die C3a-Konzentration im Blut 12 h nach der Infektion (infiziert) signifikant höher war als vor der Infektion (uninfiziert). Abbildung 4B zeigt die C3a-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Bakteriämie.

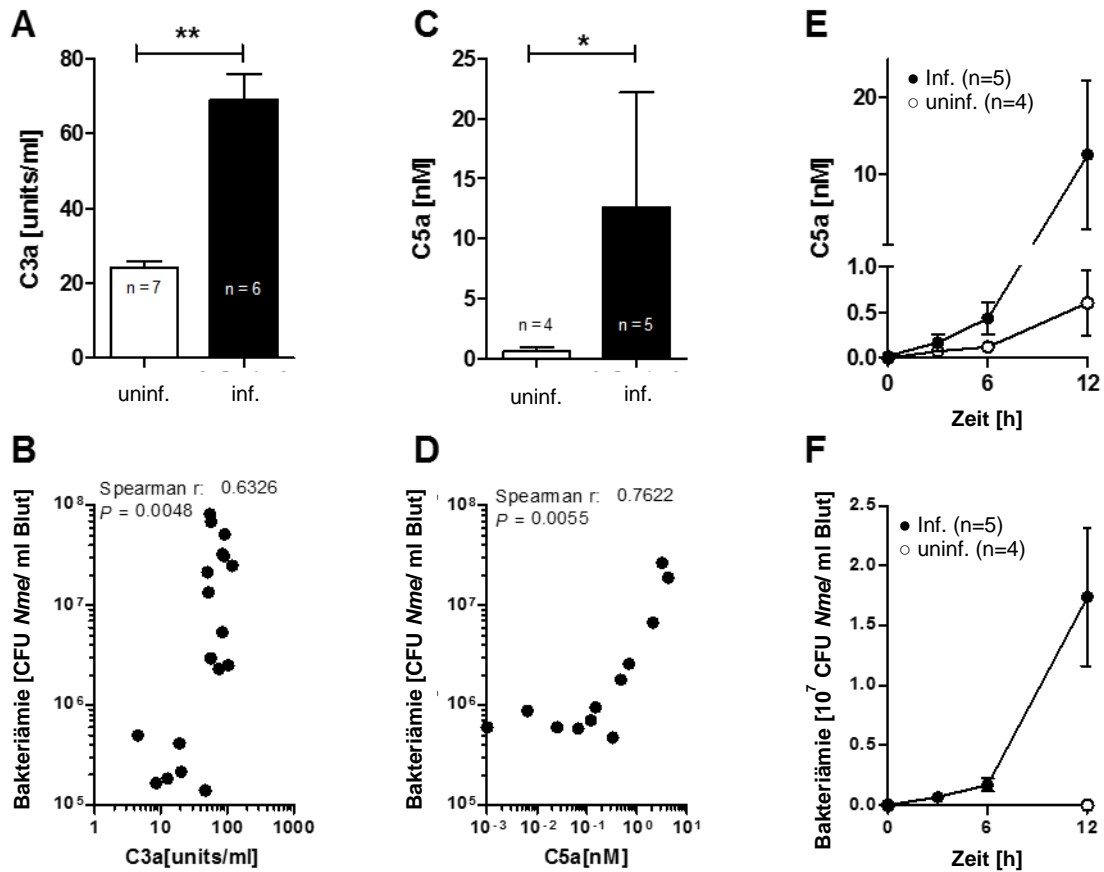


Abbildung 4

Aktivierung des inflammatorischen Komplementarms anhand der Anaphylatoxinkonzentrationen (C3a, C5a) im Blut und Bakteriämie in WT Mäusen nach intraperitonealer Infektion mit 10⁵ *N. meningitidis* MC58 (●) bzw. uninfizierten WT Mäusen (○). Gruppengrößen sind in den einzelnen Graphen angezeigt **A** C3a-Konzentrationen in willkürlich definierten Einheiten relativ zu Zymosan-aktiviertem Serum [Units/ml Blut; Zymosan-aktiviertes Serum enthält 1000 U/ml]; uninf. vs. inf. bei +12 h **B** Korrelation von C3a-Konzentration in [Units/ml Blut] und Bakteriämie in [CFU/ml Blut] in infizierten Mäusen **C** C5a-Konzentrationen im Blut in [nM]; uninf. vs. inf. bei +12 h **D** Korrelation von C5a-Konzentration in [nM] und Bakteriämie in [CFU/ml Blut] in infizierten Mäusen **E** C5a-Konzentration in [nM]; uninf. vs. inf. im zeitlichen Verlauf **F** Bakteriämie in [10⁷ CFU/ml Blut]; uninf. vs. inf.; Mittelwert und Standardfehler sind eingezeichnet bei A, C, E und F. Die C3a- und C5a-Konzentrationen bei uninf. und inf. Tieren wurden mit dem Student's T-test statistisch analysiert (*, **, ***: $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$). Die Korrelation zwischen Bakteriämie und der C3a- bzw. C5a-Konzentration wurde mit einer Spearman Rangkorrelation untersucht und der Spearman-Rangkoeffizient r , sowie das Signifikanzniveau P sind angegeben.

3.1.2.2 C5a

Die C5a-Konzentration im Blut wurde mit dem C5a-ELISA (Kapitel 2.9.2.2) gemessen. WT Mäuse wurden in Fall- und Kontrollgruppe aufgeteilt. Die Tiere der Fallgruppe wurden mit 10^5 CFU i. p. infiziert, den Tieren der Kontrollgruppe wurden 200 μ l BHI i. p. appliziert. Direkt nach der Infektion wurde allen Tieren aus Fall- und Kontrollgruppe 10 μ g Biotin-Rat-anti-Mouse-C5a-Antikörper (Sekundärantikörper) in 200 μ l BHI i. p. verabreicht. Alle Tiere wurden 12 h nach der Infektion euthanasiert. Zu den Zeitpunkten +3 h und +6 h wurde Schwanzblut, bei +12 h wurde Herzblut entnommen, die Bakteriämie gemessen und die C5a-Konzentration per C5a-ELISA quantifiziert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4C-E dargestellt.

In Abbildung 4C ist die C5a-Konzentration im Blut infizierter Mäuse (Fallgruppe) der C5a-Konzentration im Blut uninfizierter Mäuse (Kontrollgruppe) gegenübergestellt. Abbildung 4E zeigt die C5a-Konzentration beider Gruppen im zeitlichen Verlauf. Durch die Infektion kam es zu einem signifikanten Anstieg der C5a-Konzentrationen.

Die Bakteriämie im zeitlichen Verlauf ist in Abbildung 4F abgebildet. Infizierte Tiere wiesen Bakterienlasten bis über 10^7 CFU/ml Blut bis zum Ende des Experiments auf. Abbildung 4D zeigt die direkte Korrelation zwischen der Bakterienlast und der Generierung von C5a im Blut infizierter WT Mäuse.

Mit Hilfe dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass das murine Komplementsystem während einer *Nme*-Sepsis stark aktiviert wird. Es kommt zum signifikanten Anstieg der Komplement Fragmente C3a und C5a im Blut infizierter Versuchstiere. Die C5a- und C3a-Generierung korreliert hierbei mit der Bakteriämie.

3.2 Rolle des C5aR1 in der *Nme*-Sepsis

In früheren Publikationen konnte bereits der schädliche Einfluss des C5aR1 in der polymikrobiellen Sepsis im CLP Model aufgezeigt werden (120). Nachdem im vorherigen Versuch (Kapitel 3.1) gezeigt werden konnte, dass das Komplementsystem auch im Maus-*Nme*-Sepsismodell von entscheidender Bedeutung ist, wurde nun die Rolle des C5aR1 in diesem Zusammenhang untersucht. Hierbei stellt die Frage nach dem Beitrag des C5aR1 zur Pathophysiologie der *Nme*-Sepsis den Mittelpunkt dieser Dissertation dar.

In WT und C5aR1^{-/-} Mäusen wurde eine Nme Sepsis durch i. p. Applikation verschiedener Infektionsdosen induziert. Die Überlebensrate, die Bakteriämie, das klinische Erscheinungsbild, die Konzentrationen von C3a und C5a sowie pro-inflammatorischer Mediatoren im Blut beider Genotypen wurden ermittelt und miteinander verglichen.

3.2.1 Nme-Sepsis bei 10⁵, 10⁶, 10⁷ CFU MC58

Mit diesem Versuch wurde die murine Nme-Sepsis in WT und C5aR1^{-/-} Mäusen mit verschiedenen Inokula untersucht. WT und C5aR1^{-/-} Mäuse wurden mit 10⁵, 10⁶ und 10⁷ CFU infiziert. Überlebensrate und Bakteriämie sind in Abbildung 5 dargestellt.

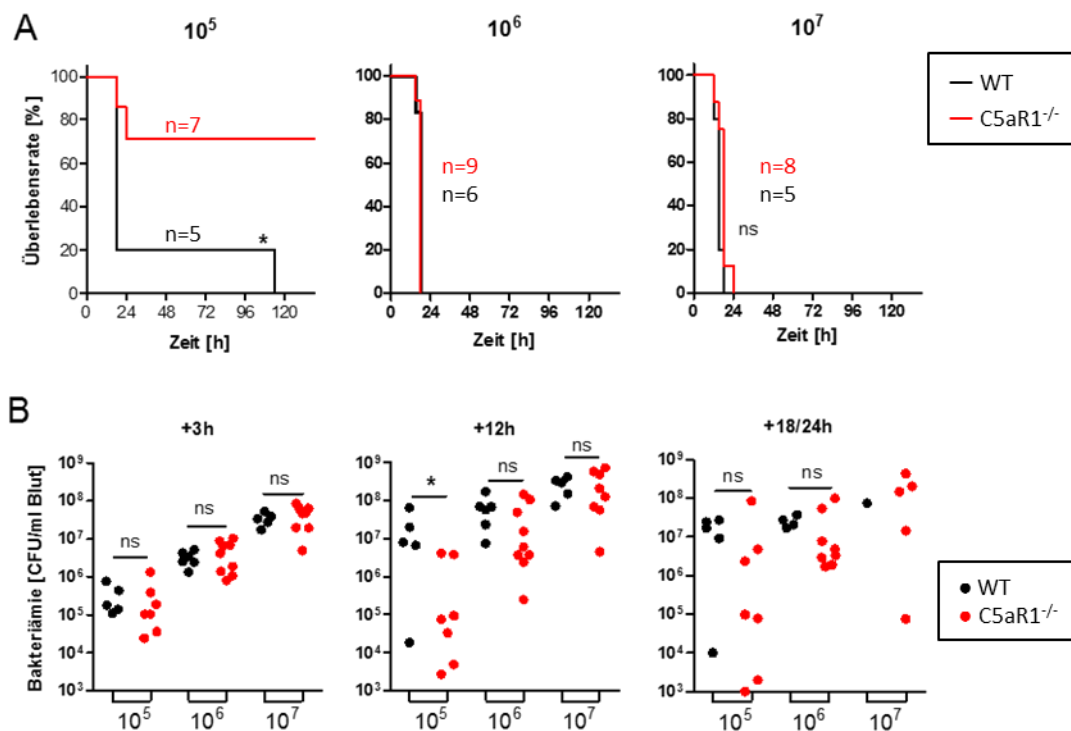


Abbildung 5

Bedeutung des C5aR1 für Überlebensrate und Bakteriämie. Vergleich von WT (●) und C5aR1^{-/-} (●) Mäusen nach intraperitonealer Infektion verschiedener Inokula (10⁵ bis 10⁷) *N. meningitidis* MC58. Inokula (10⁵ bis 10⁷ CFU/Tier) wie oberhalb der Graphen angezeigt; Gruppengrößen in einzelnen Graphen angezeigt **A** Überlebensrate in [%] **B** Bakteriämie [CFU/ml Blut] zu den Zeitpunkten +3 h, +12 h und +18/+24 h (gepoolte Daten); Die Statistische Analyse der Überlebensrate wurde per Mantel-Cox-Test durchgeführt und die Konfidenzintervalle sind für 10⁵ und 10⁷ angegeben (ns, *: nicht signifikant, P ≤ 0,05). Die Mittelwerte sind eingezeichnet.

In Bezug auf die Überlebensrate unterschieden sich WT und C5aR1^{-/-} signifikant für 10⁵ CFU (Abb. 5A). Keine der WT, aber 5 von 7 C5aR1^{-/-} Mäuse überlebten bis zum Versuchsende. Bei den Inokula 10⁶ und 10⁷ CFU verstarben alle Tiere bis +24 h.

Bei der Bakteriämie zeigte sich für das Inokulum 10⁵ CFU zum Zeitpunkt +12 h ein signifikant niedrigerer Wert bei C5aR1^{-/-} im Vergleich zu WT Mäusen (Abb. 5B). Bei den anderen Inokula und Zeitpunkten waren die beobachteten Unterschiede nicht signifikant. Dennoch war ein Trend zu geringeren Bakteriämien in C5aR1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen für das Inokulum 10⁵ bei +3 h und +18/+24 h und für das Inokulum 10⁶ bei +12 h und +18/+24 h zu erkennen.

Aufgrund der Genotyp-spezifischen Unterschiede in der Überlebensrate wurde 10⁵ CFU für weitere Infektionsversuche bei WT vs. C5aR1^{-/-} Mäusen als Standard-Inokulum festgelegt.

3.2.2 Nme-Sepsis bei 10⁵ CFU MC58

In dieser Versuchsreihe wurde die Infektion mit 10⁵ CFU MC58 genauer untersucht, nachdem sich im vorhergehenden Experiment ein signifikanter Überlebensvorteil bei diesem Inokulum für C5aR1^{-/-} gegenüber WT Mäusen gezeigt hatte (Kapitel 3.2.1). Die Parameter „Überlebensrate“, „Bakteriämie“, „klinischer Score“, „Konzentrationen der Anaphylatoxine C3a und C5a“ sowie „Konzentrationen der pro-inflammatorischen Mediatoren IL-6, CXCL-1 und TNF-α“ im Blut von WT und C5aR1^{-/-} Mäusen wurden gemessen.

3.2.2.1 Überlebensrate, Bakteriämie und klinischer Score

WT und C5aR1^{-/-} Mäuse (je n = 6) wurden mit 10⁵ CFU MC58 infiziert. Die gepoolten Daten aus diesem und aus dem vorhergehenden Experiment (Kapitel 3.2.1) mit WT und C5aR1^{-/-} Mäusen für die Parameter „Überlebensrate“, „Bakteriämie“ und „klinischer Score“ sind in der Abbildung 6 dargestellt.

C5aR1^{-/-} Mäuse zeigten eine signifikant höhere Überlebensrate als WT Mäuse (Abb.6A). Bis zum Ende des Versuches bei +144 h überlebten 8 von 13 C5aR1^{-/-} und 0 von 11 WT Mäusen. Dabei ist zu beachten, dass insgesamt nur 1 WT Maus länger als 24 h überlebte.

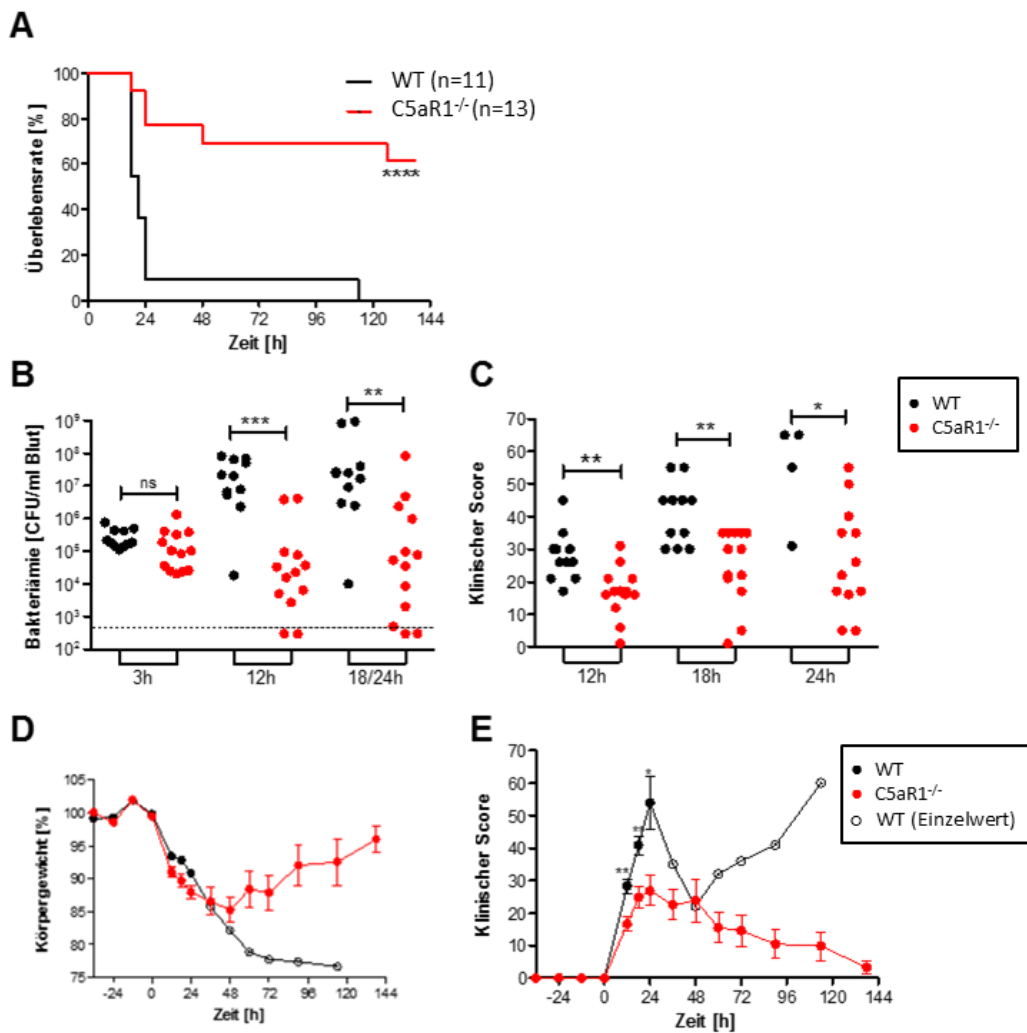


Abbildung 6

Bedeutung des C5aR1 für Überlebensrate, Bakteriämie, klinischen Score und Körpergewicht. Vergleich von WT (●) und C5aR1^{-/-} (●) Mäusen bei intraperitonealer Infektion mit 10⁵ *N. meningitidis* MC58. Gepoolte Daten aus zwei getrennten Experimenten; Gruppengrößen wie im oberen Graphen angegeben **A** Überlebensrate in [%]; in Mantel-Cox-Test (****: $P \leq 0,001$) **B** Bakteriämie [CFU/ml Blut] bei +3 h, +12 h und +18 h / +24 h (gepoolte Daten: Versuchstiere, die bei +18h den humanen Endpunkt erreichten, wurden aus dem Versuch genommen. Die gemessenen Bakteriämien wurde bei den +24h Werten der bis dorthin überlebenden Tiere ergänzt.); Nachweisgrenze für Bakteriämie (···); in Mann-Whitney-Test (ns, *, **, ****: nicht signifikant, $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$) **C** Klinischer Score bei +3 h, +12 h und +24 h; in Mann-Whitney-Test (*, **, ****: $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$) **D** Körpergewicht in [%]; Mittelwert und Standardfehler **E** Klinischer Score; Mittelwert und Standardfehler

Entsprechende Ergebnisse fanden sich auch bei der Bakteriämie (Abb. 6B). Zum Zeitpunkt +3 h unterschieden sich die Bakterienlasten nicht signifikant voneinander und

beide Genotypen zeigten ca. 10^5 - 10^6 CFU/ml Blut. Im zeitlichen Verlauf stieg die mittlere Bakterienlast im Blut der WT Mäuse an und sank im Blut der C5aR1^{-/-} Mäuse ab. Dieser Unterschied zwischen den Genotypen war für die Zeitpunkte +12 h und +18/+24 h signifikant.

Der klinische Score zeigte ähnliche Ergebnisse (Abb. 6C, E). Zu den Zeitpunkten +3 h, +12 h und +24 h wiesen C5aR1^{-/-} Mäuse signifikant niedrigere Punktwerte auf als WT Mäuse, was für eine bessere körperliche Verfassung der C5aR1^{-/-} Mäuse sprach. Im zeitlichen Verlauf war die Genesung der überlebenden C5aR1^{-/-} Mäuse anhand des sinkenden klinischen Scores zu verfolgen. In Abbildung 6D ist das Körpergewicht in Prozent während der Infektion aufgetragen. Innerhalb der ersten 48 h verloren C5aR1^{-/-} Mäuse ca. 15 % ihres Körpergewichts. Vergleichbar zum klinischen Score war eine Erholung des Körpergewichts bis zum Versuchsende zu erkennen.

3.2.2.2 Anaphylatoxine und pro-inflammatorische Mediatoren

Die Konzentrationen der Anaphylatoxine C3a und C5a, sowie die pro-inflammatorischen Mediatoren IL-6, CXCL-1 und TNF- α im Blut wurden bestimmt. WT und C5aR1^{-/-} Mäuse wurden in Fall- und Kontrollgruppen eingeteilt. Mäuse der Fallgruppen wurden mit 10^5 CFU MC58 infiziert. Mäusen der Kontrollgruppen wurde 200 μ l BHI i. p. injiziert. Die Konzentrationen von C3a, C5a (gemessen mit „C5a in vivo capture assay“, Kapitel 2.9.3), IL-6, CXCL-1 und TNF- α wurden zum Zeitpunkt +12 h im Schwanzblut gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

Es war ein nicht signifikanter Unterschied in der Bakteriämie zum Zeitpunkt +3 h zwischen WT und C5aR1^{-/-} Mäusen zu beobachten, welcher dann bis +12 h signifikant wurde (Abb. 7A).

Abbildung 7B stellt den klinischen Score zum Zeitpunkt +12 h von WT vs. C5aR1^{-/-} Mäusen dar. Es zeigte sich, dass infizierte Tiere der Fallgruppe viel höhere Scoringwerte aufwiesen als nicht infizierte Kontrolltiere. Klinische Scores zwischen WT und C5aR1^{-/-} Tieren zeigten trotz eines klaren Trends keine statistische Signifikanz bei +12 h.

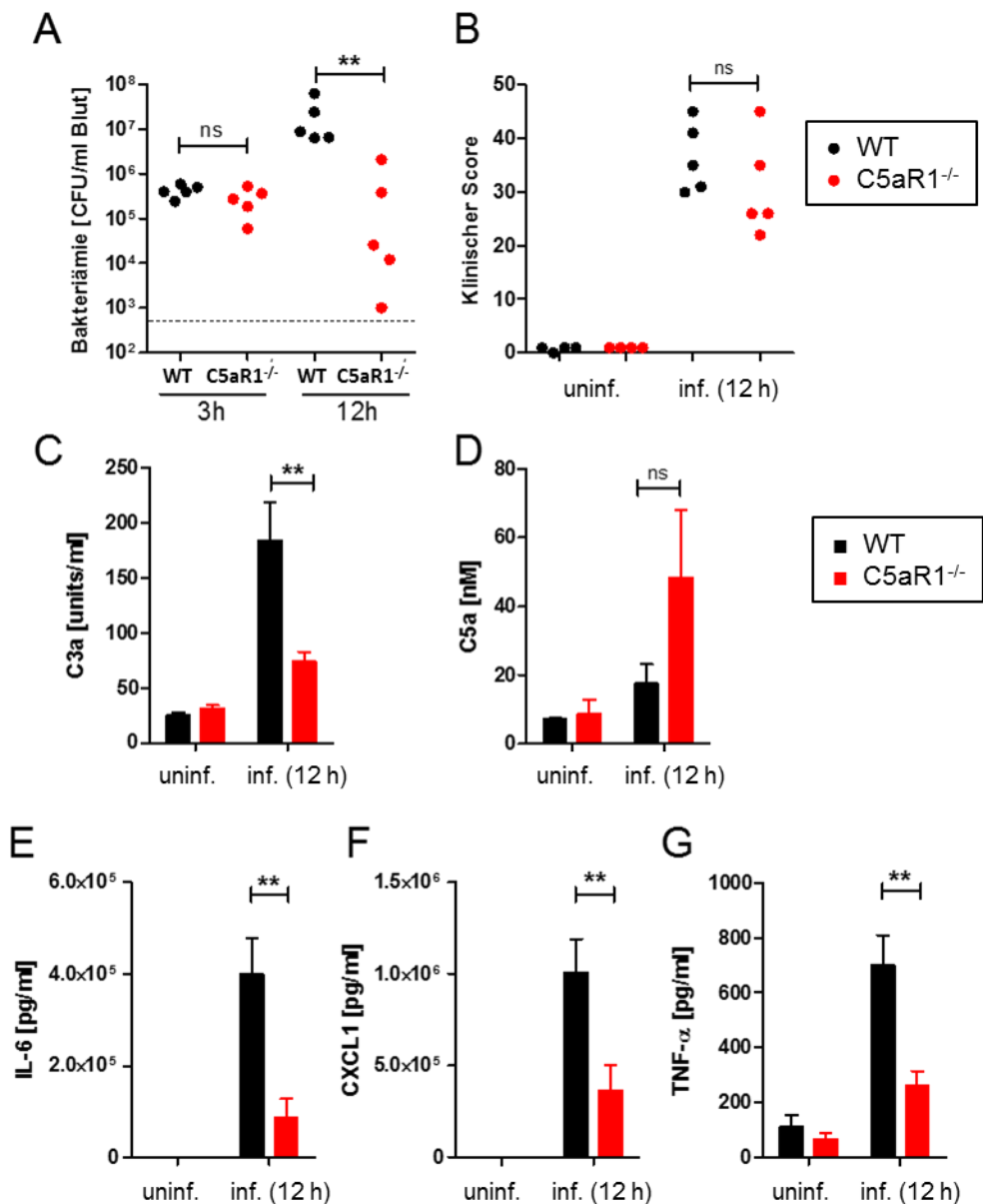


Abbildung 7

Bedeutung von C5aR1 auf Bakteriämie, klinischen Score, und Konzentrationen von C3a, C5a, IL-6, CXCL-1 und TNF-α im Blut. Vergleich von WT (●) mit C5aR1^{-/-} (●) Mäusen und Vergleich von uninifizierten (uninf.) mit infizierten (inf.) Mäusen zum Zeitpunkt +12 h nach intraperitonealer Infektion mit 10⁵ *N. meningitidis* MC58 A Bakteriämie [CFU/ml] in infizierten Tieren bei +3 h und +12 h; WT (n=5) vs. C5aR1^{-/-} (n=5); Nachweisgrenze für Bakteriämie (···) B Klinischer Score; uninf. (WT und C5aR1^{-/-} je n=4) vs. inf. (WT und C5aR1^{-/-} je n=5) C,D C3a-Konzentration [Units/ml Blut] und C5a-Konzentration [nM]; uninf. (WT und C5aR1^{-/-} je n=4) vs. inf. (WT und C5aR1^{-/-} je n=5) E,F,G IL-6-, CXCL1- und TNF-α-Konzentrationen [pg/ml Blut]; uninf. (WT und C5aR1^{-/-} je n=4) vs. inf. (WT und C5aR1^{-/-} je n=5); Bakteriämie, klinischer Score und die Konzentrationen von C3a, C5a, IL-6, CXCL-1 und TNF-α wurden per Mann-Whitney-Test statistisch analysiert (ns, *, **: nicht signifikant, $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$). Mittelwerte und Standardfehler sind bei den Konzentrationen von C3a, C5a, IL-6, CXCL-1 und TNF-α abgebildet.

In Abbildung 7C ist die C3a-Konzentration im Schwanzblut zum Zeitpunkt +12 h dargestellt. Infizierte WT und C5aR1^{-/-}-Mäuse wiesen eine signifikant höhere C3a-Konzentration auf als nicht infizierte Tiere desselben Genotyps. Gleichzeitig wiesen infizierte WT Mäuse eine höhere C3a-Konzentration auf als infizierte C5aR1^{-/-} Mäuse. Abbildung 7D zeigt die C5a-Konzentration im Schwanzblut zum Zeitpunkt +12 h. Auch hier zeigten infizierte Mäuse höhere C5a-Konzentrationen als nicht infizierte Mäuse desselben Genotyps. Innerhalb der Fall- und Kontrollgruppen wiesen jedoch C5aR1^{-/-} Mäuse höhere C5a Konzentrationen auf als WT Mäuse. Dies kann damit erklärt werden, dass generiertes C5a in C5aR1^{-/-} Mäuse - im Gegensatz zu WT Mäusen - nicht an den C5aR1 binden kann, nicht internalisiert werden kann und im Blut verbleibt. Vermutlich findet dennoch eine Bindung und Internalisierung von C5a durch den C5aR2 in geringerem Ausmaß statt.

Abbildungen 7E-G zeigen die Konzentrationen von IL-6, CXCL1 und TNF- α . Bei infizierten Falltieren zeigte sich eine signifikant höhere Konzentration von allen drei Mediatoren im Blut bei WT Mäusen im Vergleich zu C5aR1^{-/-} Mäuse. In nicht infizierten Kontrolltieren bewegte sich die Konzentration von IL-6 und CXCL1 bei beiden Genotypen unter der Nachweisgrenze, bei TNF- α zeigten WT Kontrolltiere eine leicht höhere Konzentration als C5aR1^{-/-} Kontrolltiere.

Der C5a-Rezeptor scheint eine entscheidende Rolle in der *Nme*-Sepsis zu spielen. Im Vergleich zu infizierten WT Mäusen wiesen infizierte C5aR1^{-/-}-Mäuse eine höhere Überlebensrate, einen besseren klinischen Zustand, eine niedrigere Bakteriämie, sowie niedrigere Konzentrationen der pro-inflammatorischen Mediatoren IL-6, CXCL1 und TNF- α auf. Die Abwesenheit des C5aR1 scheint protektiv zu sein.

3.3 Histologische Untersuchungen

Im bisherigen Verlauf der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die induzierte *Nme*-Sepsis mitunter erhebliche Auswirkungen auf den Modellorganismus Maus hat. In diesem Teil der Arbeit wurden die Folgen der *Nme*-Sepsis auf mikroskopischer Ebene in speziellen Geweben untersucht.

WT und C5aR1^{-/-} Mäuse, welche im Rahmen vorheriger Experimente mit 10⁵ CFU *Nme* infiziert worden waren, wurden zu den Zeitpunkten +6 h, +12 h bzw. +24 h euthanasiert

(je eine Maus jeden Genotyps zu jedem genannten Zeitpunkt). Organproben von Leber, Lunge und Milz wurden entnommen. Darüber hinaus wurden entsprechende Organproben von je einer uninfizierten WT und C5aR1^{-/-} Maus als Kontrollen entnommen. Histologische Schnitte wurden angefertigt (Kapitel 2.13) und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Kapitel 2.14). Zellkerne wurden mit DAPI, neutrophile Granulozyten mit Kaninchen-anti-Neutrophilen-Elastase und Cy3 und Meningokokken mit FITC gefärbt. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie sind in Abbildungen 8-10 gezeigt.

Im Laufe der Infektion war eine Migration von neutrophilen Granulozyten in die Lunge zu beobachten (Abb. 8). In den WT Mäusen nahm die Anzahl der neutrophilen Granulozyten (weiße Pfeile) von 0 h (nicht infiziert) bis +24 h stetig zu. In C5aR1^{-/-} Mäusen stieg die Anzahl bis zum Zeitpunkt +6 h bzw. +12 h und nahm dann wieder bis zum Zeitpunkt +24 h ab. Im Vergleich zu WT Mäusen wiesen infizierte C5aR1^{-/-} Mäuse bei +6 h, +12 h und +24 h deutlich weniger neutrophile Granulozyten in der Lunge auf.

Ähnliche Ergebnisse wie in der Lunge konnten in der Leber gefunden werden (Abb. 9), auch wenn sie geringer ausgeprägt waren. Im Verlauf der Infektion von 0 h bis +24 h stieg die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in WT Mäusen kontinuierlich an. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in C5aR1^{-/-} Mäusen bis zum Zeitpunkt +6 h leicht an und fiel dann wieder bis +24 h ab. Über die Zeitpunkte +6 h, +12 h und +24 h wiesen infizierte C5aR1^{-/-} Mäuse allgemein weniger neutrophile Granulozyten auf als vergleichbare WT Tiere.

In Milzgewebe waren keine erheblichen Unterschiede in der Anzahl der neutrophilen Granulozyten zwischen beiden Genotypen bzw. im Verlauf der Infektion zu erkennen (Abb. 10). Lediglich von 0 h bis +6 h war in WT und C5aR1^{-/-} Mäusen eine Zunahme zu verzeichnen, welche durch eine erneute Abnahme der neutrophilen Granulozyten im Gewebe bis +24 h gefolgt wurde. C5aR1^{-/-} Mäuse zeigten durchschnittlich keine niedrigere Anzahl an neutrophilen Granulozyten als WT Mäuse.

Darüber hinaus konnten in Lungen-, Leber- und Milzgewebe in infizierten WT Tieren zum Zeitpunkt +24 h einzelne Meningokokken in der 100x Vergrößerung beobachtet werden (weiße Dreiecke in Abb. 8-10). Hierbei fanden sich Meningokokken gehäuft in der Nachbarschaft von neutrophilen Granulozyten. Vereinzelt waren phagozytierte Bakterien innerhalb der Immunzellen zu erkennen.

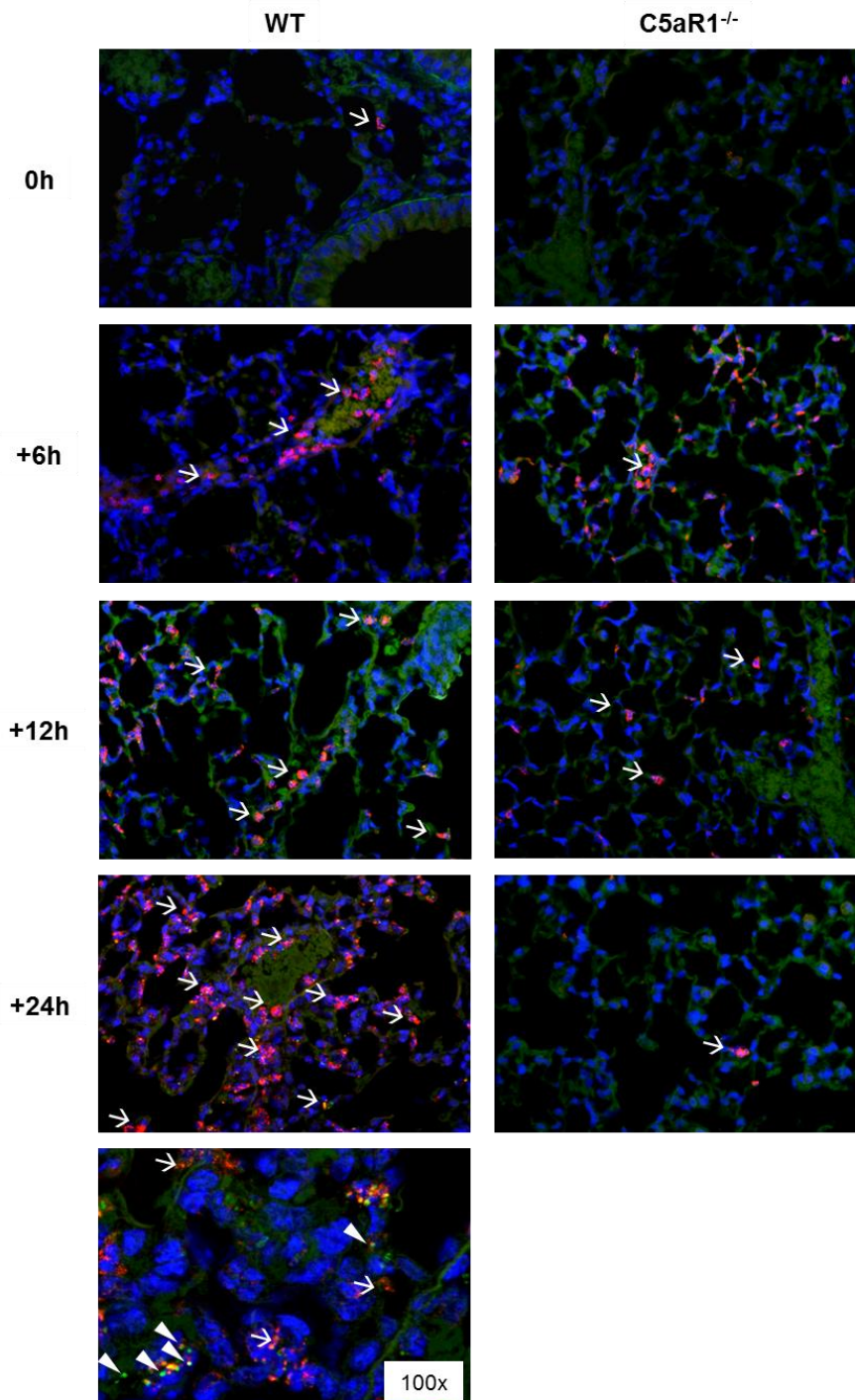


Abbildung 8

Histologische Untersuchung von Lungengewebe mit Immunfluoreszenzfärbung. Exemplarische Ausschnitte von WT und C5aR1^{-/-} Mäusen. Uninfizierte Kontrolltiere bei 0 h und infizierte Tiere zu den Zeitpunkten +6 h, +12 h und +24 h nachintraperitonealer Infektion mit 10⁵ *N. meningitidis* MC58. Schnitte in 60x Vergrößerung, unten links in 100x Vergrößerung von WT bei +24 h; Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau), neutrophile Granulozyten mit Kaninchen-anti-Neutrophilen-Elastase und Cy3 gefärbt (rot) (weiße Pfeile), Meningokokken mit Kaninchen-Antiserum und FITC gefärbt (grün) (weiße Dreiecke), unspezifisches Hintergrundsignal im grünen Kanal ermöglicht Sichtbarkeit von Gewebe bzw. Erythrozyten.

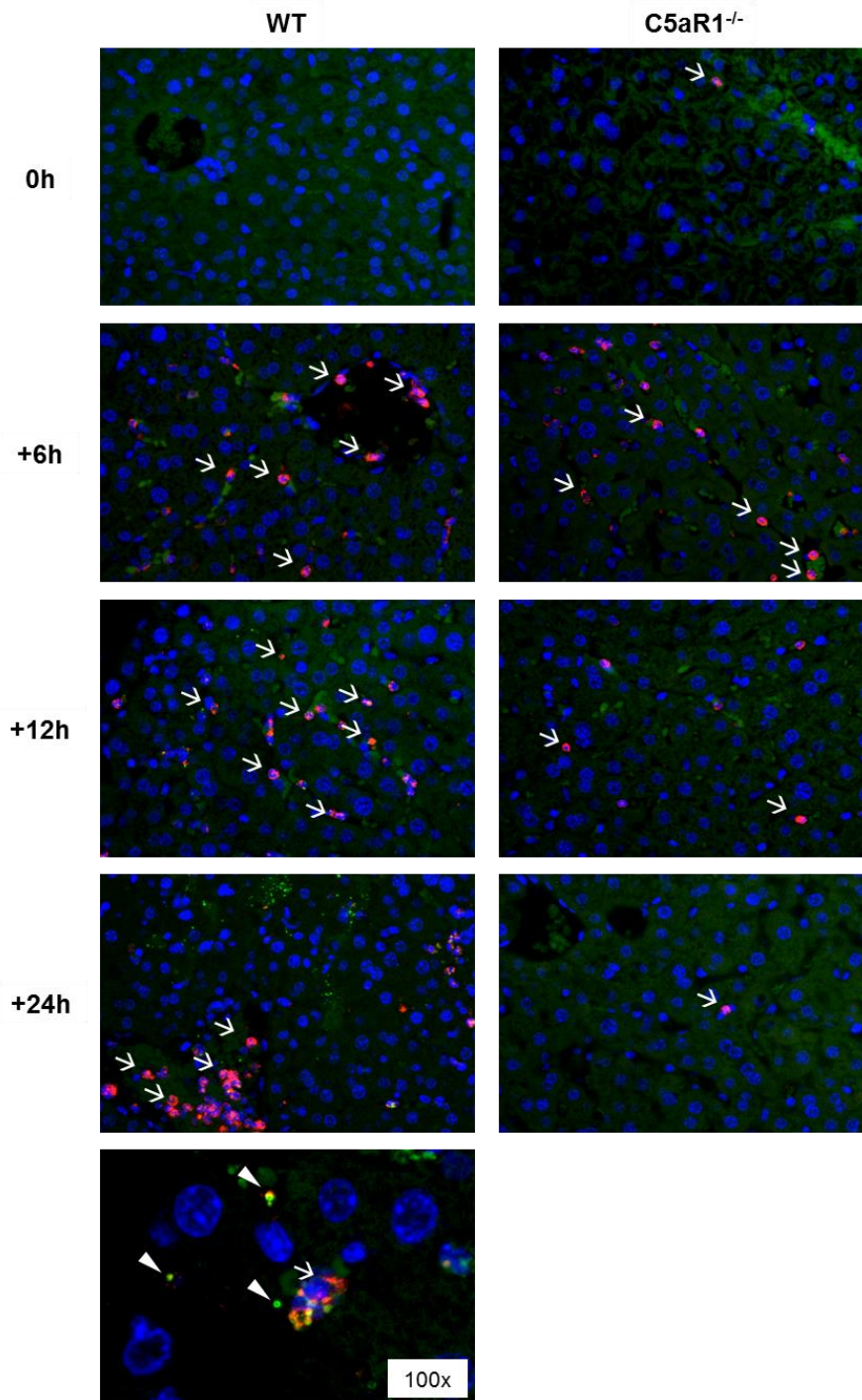


Abbildung 9

Histologische Untersuchung von Lebergewebe mit Immunfluoreszenzfärbung. Exemplarische Ausschnitte von WT und C5aR1^{-/-} Mäusen. Uninfizierte Kontrolltiere bei 0 h und infizierte Tiere zu den Zeitpunkten +6 h, +12 h und +24 h nach intraperitonealer Infektion mit 10⁵ *N. meningitidis* MC58. Schnitte in 60x Vergrößerung, unten links in 100x Vergrößerung von WT bei +24 h; Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau), neutrophile Granulozyten mit Kaninchen-anti-Neutrophilen-Elastase und Cy3 gefärbt (rot) (weiße Pfeile), Meningokokken mit Kaninchen-Antiserum und FITC gefärbt (grün) (weiße Dreiecke), unspezifisches Hintergrundsignal im grünen Kanal ermöglicht Sichtbarkeit von Gewebe bzw. Erythrozyten.

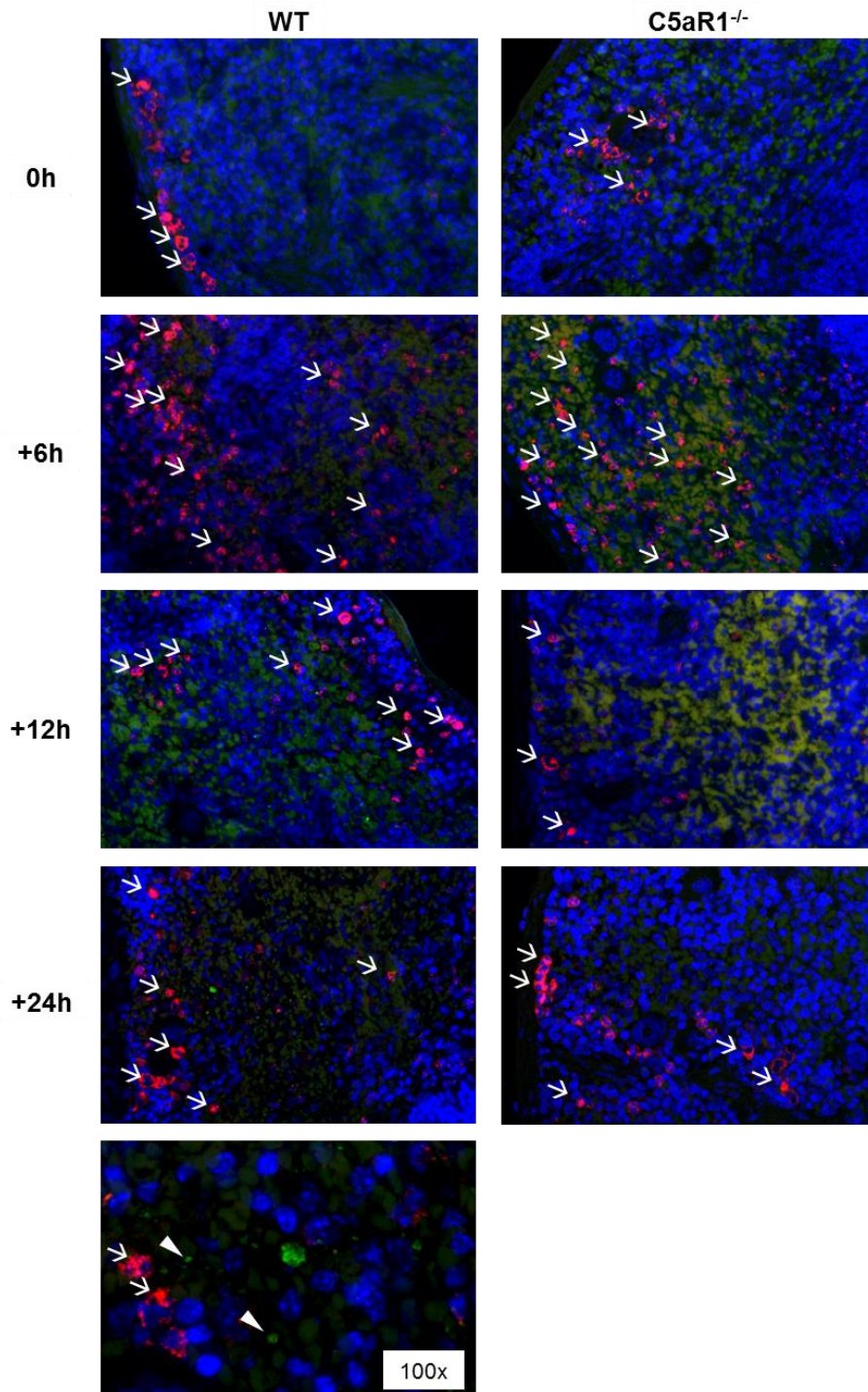


Abbildung 10

Histologische Untersuchung von Milzgewebe mit Immunfluoreszenzfärbung. Exemplarische Ausschnitte von WT und C5aR1^{-/-} Mäusen. Uninfizierte Kontrolltiere bei 0 h und infizierte Tiere zu den Zeitpunkten +6 h, +12 h und +24 h nach intraperitonealer Infektion mit 10⁵ *N. meningitidis* MC58. Schnitte in 60x Vergrößerung, unten links in 100x Vergrößerung von WT bei +24 h; Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau), neutrophile Granulozyten mit Kaninchen-anti-Neutrophilen-Elastase und Cy3 gefärbt (rot) (weiße Pfeile), Meningokokken mit Kaninchen-Antiserum und FITC gefärbt (grün) (weiße Dreiecke), unspezifisches Hintergrundsignal im grünen Kanal ermöglicht Sichtbarkeit von Gewebe bzw. Erythrozyten.

Mit diesen Untersuchungen konnte im Ansatz gezeigt werden, dass systemische Auswirkungen der Infektion mit *Nme* auch auf mikroskopischer Ebene zu beobachten sind. Unter der *Nme*-Sepsis kommt es zu einer Zunahme der Anzahl neutrophiler Granulozyten in den Organen Leber, Lunge und Milz, wobei dieser Effekt in Lungengewebe am besten zu beobachten ist. Tendenziell sind WT Mäuse stärker von einer neutrophilen Migration in entsprechende Organe betroffen als vergleichbare C5aR1^{-/-} Mäuse.

3.4 Mechanistischer Hintergrund

Bisher konnte gezeigt werden, dass der C5aR1 eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der *Nme*-Sepsis spielt. Die Abwesenheit des C5aR1 ist mit einer höheren Überlebensrate, einer geringeren Bakteriämie sowie einer geringeren Konzentration proinflammatorischer Mediatoren in Mäusen assoziiert (Kapitel 3.2). Im folgenden Kapitel soll nun der Zusammenhang von C5aR1, Bakteriämie und der Konzentrationen verschiedener Mediatoren untersucht werden.

Bei der Frage nach dem mechanistischen Hintergrund im Rahmen einer *Nme*-Sepsis sind zwei mögliche Szenarien denkbar. In ‚Szenario 1‘ bewirkt die massive Aktivierung des C5aR1 eine Paralyse phagozytischer Immunzellen. Infolgedessen kann sich *Nme* im Blut ungehemmt vermehren. Daraufhin reagieren verschiedene Körperzellen mit einer Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren ins Blut. Gemäß diesem ‚Szenario 1‘ ist der Zytokinsturm (SIRS) Folge der Bakteriämie.

In ‚Szenario 2‘ potenziert die Aktivierung des C5aR1 auf Immunzellen direkt deren *Nme*-induzierte Zytokinfreisetzung. Als Folge dieser überschießenden Zytokinantwort werden phagozytische Zellen paralytisch und *Nme* kann sich im Blut ungehindert vermehren. ‚Szenario 2‘ zufolge wäre die Bakteriämie demnach die Folge einer C5aR1 induzierten SIRS.

3.4.1 Einfluss der C5aR1-Aktivierung auf die Bakteriämie

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob ‚Szenario 1‘ (SIRS ist Folge von Bakteriämie als Folge von C5a-vermittelter Phagozyten-Paralyse) zutrifft. Zuerst sollte geklärt werden, ob die C5aR1-Aktivierung die Bekämpfung der Bakteriämie der Versuchstiere

beeinflusst. Dazu wurden die Tiere entweder mit unkapselten *Nme* (MC58 Δ *csb*) infiziert oder sie wurden mit Wildtyp *Nme* (MC58) infiziert, ohne gleichzeitige Verabreichung von Eisendextran. In beiden Fällen kommt es trotz Verabreichung eines vitalen Inokulums nicht zu einer produktiven Infektion, da unkapselte *Nme* avirulent sind und auch kapselte *Nme* ohne gleichzeitige Eisengabe sich in der Maus nicht vermehren können. Dies ist wichtig, um in den Untersuchungen zu verhindern, dass die Klärung der Meningokokken durch Wirtsmechanismen von der gleichzeitigen Vermehrung der Bakterien überlagert wird.

3.4.1.1 Infektion mit 10^9 CFU MC58 Δ *csb*

WT Mäuse und C5aR1^{-/-} Mäuse wurden mit 10^9 CFU des unkapselten Stammes MC58 Δ *csb* infiziert (Kapitel 2.5.) und die Bakteriämie zu den Zeitpunkten +1 h, +2 h, +3 h, +4 h, +5 h, +8 h und +12 h gemessen (Abb. 11).

Durch die fehlende Kapsel wird eine unproduktive, nicht letale Infektion in beiden Genotypen herbeigeführt. Tatsächlich zeigten die infizierten Tiere keine äußerlichen Anzeichen einer Belastung. Die Bakteriämie kann von den Versuchstieren geklärt werden und es können Aussagen über die Kinetik im Vergleich von WT zu C5aR1^{-/-} Mäusen getroffen werden.

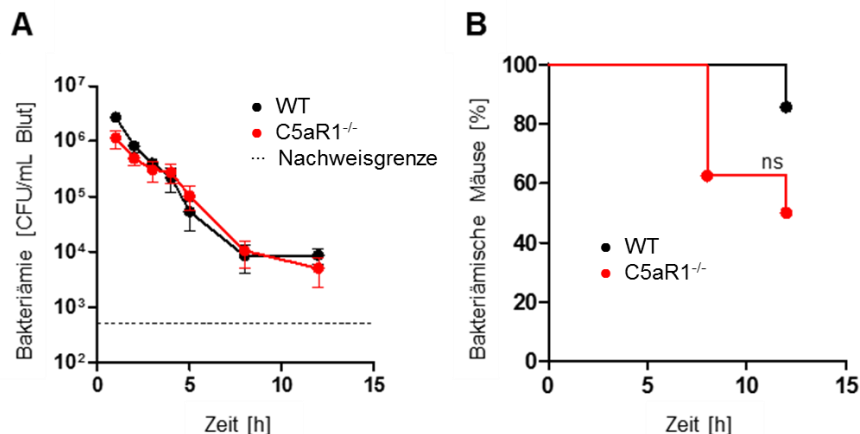


Abbildung 11

Einfluss von C5aR1 Aktivierung auf die Bakteriämie im zeitlichen Verlauf in WT (●) (n=7) und C5aR1^{-/-} (●) (n=8) Tieren nach intraperitonealer Infektion mit 10^9 *N. meningitidis* MC58 Δ *csb*. A Bakteriämie [CFU/ml Blut]; Nachweisgrenze für Bakteriämie (···); Mittelwerte und Standardfehler für die einzelnen Zeitpunkte eingezeichnet **B** Anteil bakteriämischer Mäuse [%]; Die statistische Analyse der Bakteriämie erfolgte mit dem ungepaarte, zweiseitige Student's

T-Test und die des Anteils bakteriämischer Mäuse. erfolgte mit dem Mantel-Cox-Test (*ns*: nicht signifikant).

Die Kinetik der Bakteriämien beider Genotypen ähnelte sich im Verlauf des Experiments (Abb. 11A). Gleichzeitig war kein signifikanter, genotypischer Unterschied im Anteil der bakteriämischen Mäuse (Abb. 11B) zu erkennen.

3.4.1.2 Infektion mit 10^7 CFU MC58 ohne Eisendextran

WT Mäuse und $C5aR1^{-/-}$ Mäuse wurden mit 10^7 CFU MC58 infiziert. Die standardmäßig ausgeführte i. p. Applikation von Eisendextran bei 0 h und +12 h wurde bei diesem Versuch unterlassen. Die Bakteriämie im Schwanzblut wurde zu den Zeitpunkten +1 h, +3 h, +6 h und +9 h gemessen und das Ergebnis ist in Abbildung 12 dargestellt.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT und $C5aR1^{-/-}$ Mäusen in der Bakteriämie oder dem Anteil bakteriämischer Mäuse in den Stunden nach der Infektion (Abb. 12A,B). $C5aR1^{-/-}$ Mäuse wiesen lediglich leicht geringere Bakteriämien auf als WT Mäuse.

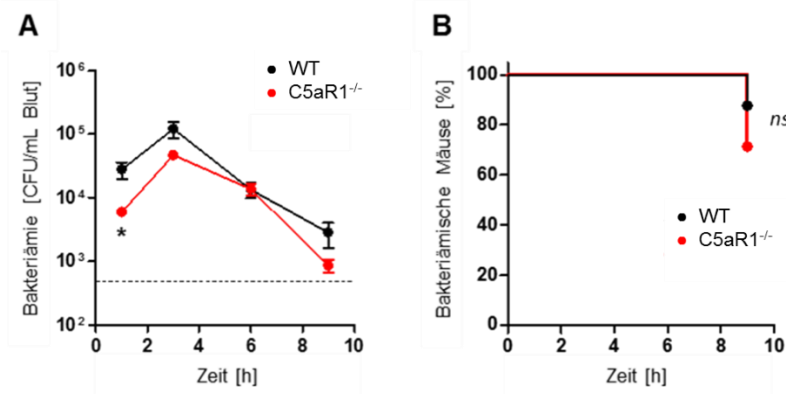


Abbildung 12

Einfluss von C5aR1-Aktivierung auf die Bakteriämie im zeitlichen Verlauf in WT (●) (n=8) und $C5aR1^{-/-}$ (●) (n=7) Mäusen nach intraperitonealer Infektion mit 10^7 *N. meningitidis* MC58 ohne Eisendextran. A Bakteriämie [CFU/ml Blut]; Nachweisgrenze für Bakteriämie (···); Mittelwerte und Standardfehler für die einzelnen Zeitpunkte eingezeichnet **B** Anteil bakteriämischer Mäuse [%]; Die statistische Analyse der Bakteriämie erfolgte mit dem ungepaarten, zweiseitigen Student's T-Test und die des Anteils bakteriämischer Mäuse. erfolgte mit dem Mantel-Cox-Test (*ns*: nicht signifikant).

Die Ergebnisse aus beiden obigen Experimenten (Infektion mit 10^9 CFU MC58 Δ *csb* und Infektion mit 10^7 CFU MC58 ohne Eisendextran) lassen keine Unterschiede in der Fähigkeit zur Klärung von *Nme* aus dem Blut zwischen den Genotypen erkennen. Die hier gewählten, unproduktiven Infektionsbedingungen sollen dabei das Frühstadium der Infektion widerspiegeln. Somit erscheint ‚Szenario 1‘ als widerlegt.

3.4.2 Einfluss von C5aR1-Aktivierung auf das SIRS

Mit dem folgenden Experiment wurde ‚Szenario 2‘ untersucht. Es sollte geklärt werden, ob eine C5aR1-Aktivierung den Zytokinsturm (SIRS) in Versuchstieren beeinflusst. WT und C5aR1^{-/-} Mäuse wurden mit 10^8 CFU hitzeinaktivierter *Nme* infiziert (Kapitel 2.5). Es wurde mit einem hitzeinaktivierten Inokulum gearbeitet, um in beiden Maus-Genotypen einen identischen Stimulus zu setzen und diesen von der bakteriellen Teilungsrate zu entkoppeln. Sowohl vor Infektion als auch bei +3 h und +12 h nach Infektion wurden Blutproben entnommen und IL-6 und CXCL1 gemessen (Abb. 13). Zusätzlich wurde die Konzentration genannter Mediatoren zum Zeitpunkt +12 h in der Peritoneallavage bestimmt.

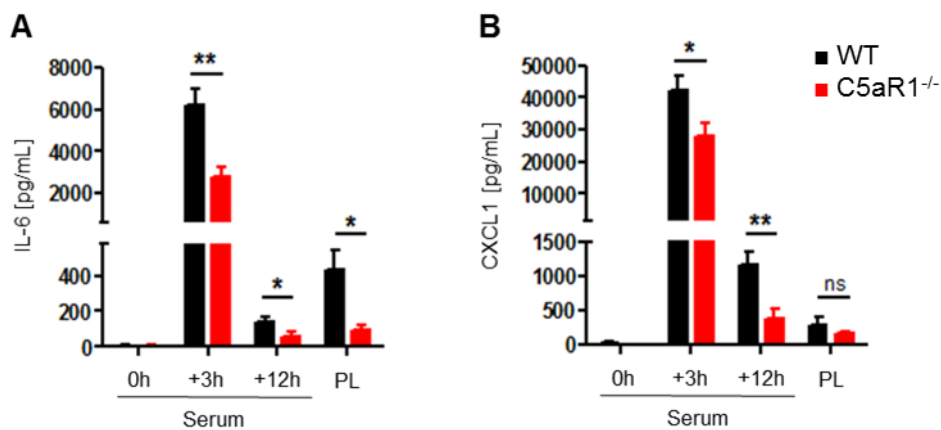


Abbildung 13

Einfluss von C5aR1 Aktivierung auf den Zytokinsturm (SIRS) anhand der IL-6- und CXCL1-Konzentrationen im Serum bei WT (●) (n=8) und C5aR1^{-/-} (●) (n=8) Mäusen nach intraperitonealer Infektion mit 10^8 hitzeinaktivierter *N. meningitidis* MC58. Zeitpunkte: 0 h (vor der Infektion), +3 h, +12 h und in Peritoneallavage (PL) bei +12 h **A IL-6-Konzentration [pg/ml] **B** CXCL1-Konzentration [pg/ml]; Mittelwerte und Standardfehler sind in den Graphen angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit einem unabhängigen, zweiseitigen Student's-T-Test (ns, *, **: nicht signifikant $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$).**

Es zeigte sich, dass die Konzentrationen von IL-6 (Abb. 13A) und CXCL1 (Abb. 13B) bei +3 h und bei +12 h im Blut von C5aR1^{-/-} Mäusen signifikant niedriger war, als im Blut vergleichbarer WT Mäuse. In der Peritoneallavage war IL-6 bei +12 h in C5aR1^{-/-} Mäusen signifikant niedriger als in WT Mäusen.

Auf Grundlage der in den Kapiteln 3.4.1 und 3.4.2 beschriebenen Versuchsergebnissen (Abb. 11-13) scheint das o. g. ‚Szenario 2‘ eher zuzutreffen, als ‚Szenario 1‘. Der protektive Effekt des C5aR1^{-/-} Genotyps besteht vermutlich in der geringeren Aktivierung von Immunzellen durch C5a im Vergleich zu WT Tieren. Die resultierende Immunantwort (SIRS) fällt dann geringer aus (Abb. 13A, B), sodass die Integrität phagozytierender Zellen gewahrt bleibt und die Bekämpfung der Bakteriämie noch suffizienter ausgeführt werden kann („Bakteriämie folgt SIRS“).

3.5 In vivo Depletion C5aR-exprimierender Zellpopulationen

Im Laufe dieser Arbeit konnte die entscheidende Rolle des C5aR1 in der murinen *Nme*-Sepsis gezeigt werden (Kapitel 3.2). Vermutlich ist der schädliche Effekt des C5aR1 auf die starke Aktivierung C5aR1-exprimierender Zellpopulationen und auf deren anschließende Immunantwort (SIRS) zurückzuführen (Kapitel 3.4). In der Vergangenheit sind bereits zahlreiche C5aR1- und C5aR2-exprimierende Zellpopulationen beschrieben worden, wie zum Beispiel Granulozyten (PMN), Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen, Pneumozyten, Thymozyten, Mastzellen und dendritische Zellen (53), (125), (183).

Im folgenden Experiment sollte geklärt werden, ob die C5aR1 getriggerte Immunantwort auf eine definierte Zellpopulation zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang wurde der individuelle Beitrag von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zur *Nme*-Sepsis untersucht.

Kohorten von WT und C5aR1^{-/-} Mäusen wurden in drei Versuchsgruppen eingeteilt. Alle Tiere wurden zum Zeitpunkt 0 h mit 10⁴ CFU MC58 infiziert. Gruppe 1 war die unbehandelte Kontrollgruppe. Tieren dieser Gruppe wurde PBS zu definierten Zeiten i. p. appliziert (Kapitel 2.11.1). Bei Tieren der Gruppe 2 wurden neutrophile Granulozyten mit dem Neutrophilen-Antikörper RB6/8C5 depletiert (Kapitel 2.11.2). Bei Tieren der Gruppe 3 wurden Makrophagen mit Clodronat-Liposomen depletiert (Kapitel 2.11.3).

Die Ergebnisse der Überlebensrate, der Bakteriämie und des klinischen Scores sind in Abbildung 14 dargestellt.

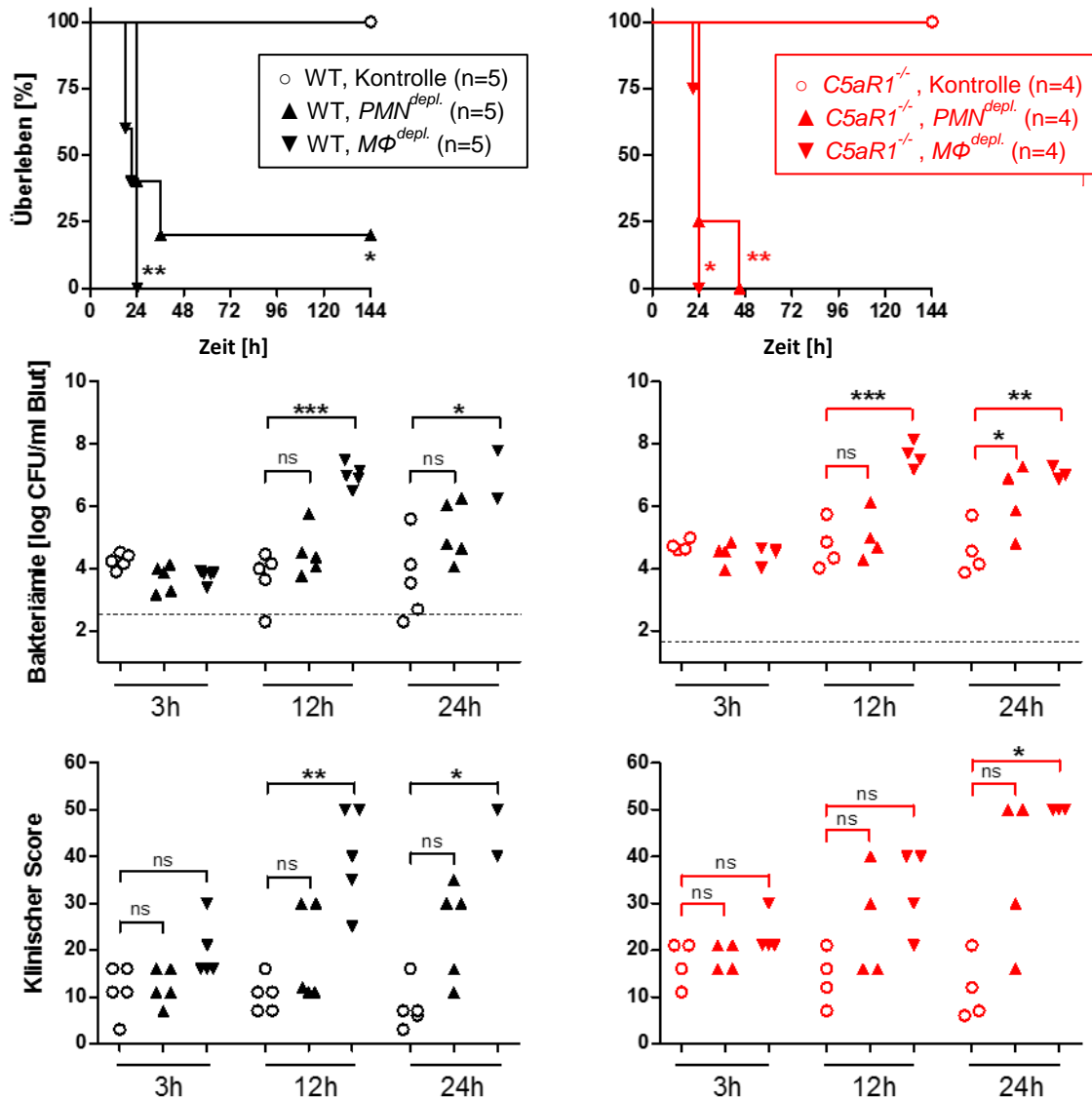


Abbildung 14

Einfluss von Neutrophilen- und Makrophagen-Depletion auf Überlebensrate, Bakteriämie und klinischen Score in WT (●) und C5aR1^{-/-} (●) Mäusen nach intraperitonealer Infektion mit 10⁴ *N. meningitidis* MC58. Vergleich von unbehandelter Kontrollgruppe (Kontrolle) mit Neutrophilen-depletierter (PMN^{depl.}) und Makrophagen-depletierter Gruppe (MΦ^{depl.}); Gruppengrößen sind in oberen Graphen angegeben; Überlebensrate [%] (oben); statistisch analysiert mit Mantel-Cox-Test; Bakteriämie [CFU/ml Blut] (Mitte); statistisch analysiert mit one-way ANOVA mit Dunnett's multiple comparison post hoc Test (Vergleichsgruppe: Kontrollgruppe) (*ns*, *, **, ***: nicht signifikant, $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$); klinischer Score (unten); statistisch analysiert mit Kruskal-Wallis-Test mit Dunnett's multiple comparison post hoc Test (Vergleichsgruppe: Kontrollgruppe) (*ns*, *, **, ***: nicht signifikant, $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$)

Bei der Überlebensrate zeigte sich, dass alle Kontrolltiere beider Genotypen bis zum Ende des Experiments überlebten. Die Makrophagendepletion führte in beiden Genotypen zu einem Versterben aller Tiere bis +24 h. Auch die Neutrophilendepletion ging in beiden Genotypen mit einer hohen Sterblichkeit einher. Lediglich 1 von 5 WT Tieren überlebte bis zum Versuchsende, wohin gegen alle 4 C5aR1^{-/-} Mäuse bis zum Zeitpunkt +48 h verstarben.

Im Hinblick auf die Bakteriämie ergab sich bei beiden Genotypen kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und Tieren mit Neutrophilendepletion. Über die gezeigten Zeitpunkte wiesen Tiere mit Neutrophilendepletion tendenziell eine höhere Bakteriämie im Vergleich zu Kontrolltieren innerhalb beider Genotypen auf. Die Makrophagendepletion äußerte sich für die Zeitpunkte +12 h und +18 h / +24 h in beiden Genotypen mit einer signifikant höheren Bakteriämie im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

Der klinische Score präsentierte sich ähnlich wie die Bakteriämie. Auf beide Genotypen bezogen wiesen Tiere mit Neutrophilen- und Makrophagendepletion eher höhere klinische Scores als vergleichbare Kontrolltiere auf.

In diesem Versuch wurde keine signifikante Verbesserung der *Nme*-Sepsis durch die Depletion von neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch die C5aR1-Aktivierung getriggerte Immunantwort nicht auf eine einzige, spezifische Zellpopulation zurückzuführen ist. Dennoch scheinen Makrophagen in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle zu spielen.

Zudem wurde bei den Depletionsversuchen kein genotypischer Unterschied zwischen WT und C5aR1^{-/-} Mäusen gefunden. Dieser Befund legt nahe, dass die bakterizide Aktivität der Phagozyten gegenüber *Nme* unabhängig von C5aR1 ist. In der Summe scheint ein potenziell schädlicher Effekt von C5aR1 durch die Summe aller bakteriziden Faktoren der Phagozyten aufgewogen zu werden. Nicht zuletzt wegen der geringen Anzahl an Versuchstieren sollten diese Ergebnisse durch Wiederholungsversuche statistisch weiter abgesichert werden.

3.6 Therapeutisches Potential der C5aR1-Blockade

Aufbauend auf den vorherigen Ergebnissen, wurde in der nächsten Versuchsserie das therapeutische Potential der C5aR1-Blockade untersucht. Infizierten WT Mäusen wurde dazu der C5aR1-Antagonist PMX205 intraperitoneal verabreicht (Kapitel 2.10).

WT Mäuse wurden in vier Gruppen aufgeteilt: „uninfizierte Kontrollgruppe“, „infizierte Kontrollgruppe“, „PMX205-prä-Gruppe“ und „PMX205-post-Gruppe“. Zum Zeitpunkt 0 h wurden alle Tiere der „infizierte Kontrollgruppe“, der „PMX205-prä-Gruppe“ und der „PMX205-post-Gruppe“ mit 10^5 CFU MC58 infiziert. Den Versuchstieren der „PMX205-prä-Gruppe“ wurde zu den Zeitpunkten -12 h, -6 h, 0 h, +12 h, +24 h, +36 h, +48 h, +60 h und +72 h jeweils 3 mg PMX205 in 100 μ l ddH₂O / 5 % Glukose i. p. appliziert. Tieren der „PMX205-post-Gruppe“ wurde 3 mg PMX205 in 100 μ l ddH₂O / 5 % Glukose zu den Zeitpunkten +4 h, +9 h, +15 h, +24 h, +36 h, +48 h, +60 h und +72 h i. p. appliziert. Die applizierte Tagesdosis für Tiere beider Gruppen betrug 6 mg PMX205 pro kg Körpergewicht. Tieren der „infizierten Kontrollgruppe“ wurde zu den Zeitpunkten -12 h, -6 h, 0 h, +12 h, +24 h, +36 h, +48 h, +60 h und +72 h je 100 μ l ddH₂O / 5 % Glukose i. p. ohne PMX205 verabreicht. WT Tiere der „uninfizierten Kontrollgruppe“ wurden weder infiziert noch behandelt. Die kombinierten Ergebnisse der Überlebensrate, der Bakteriämie, des klinischen Scores und des Körpergewichts aus zwei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 15A-D gezeigt.

Darüber hinaus wurden die pro-inflammatorischen Mediatoren IL-6, CXCL1 und TNF- α im Schwanzblut zum Zeitpunkt +12 h gemessen. Die Konzentrationen der genannten Mediatoren sind in Abbildung 15E-G für „uninfizierte Kontrollgruppe“, „infizierte Kontrollgruppe“, „PMX205-prä-Gruppe“ und „PMX205-post-Gruppe“ dargestellt. Weiterhin wurde ein PMX205 Killing assay durchgeführt (Kapitel 2.12) (Abb. 15H).

Unter der Therapie von PMX205 mit der Tagesdosis 6 mg/kg KG war ein signifikanter Anstieg der Überlebensrate in beiden Behandlungsgruppen („PMX205-prä-Gruppe“ und „PMX205-post-Gruppe“) im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen (Abb. 15A).

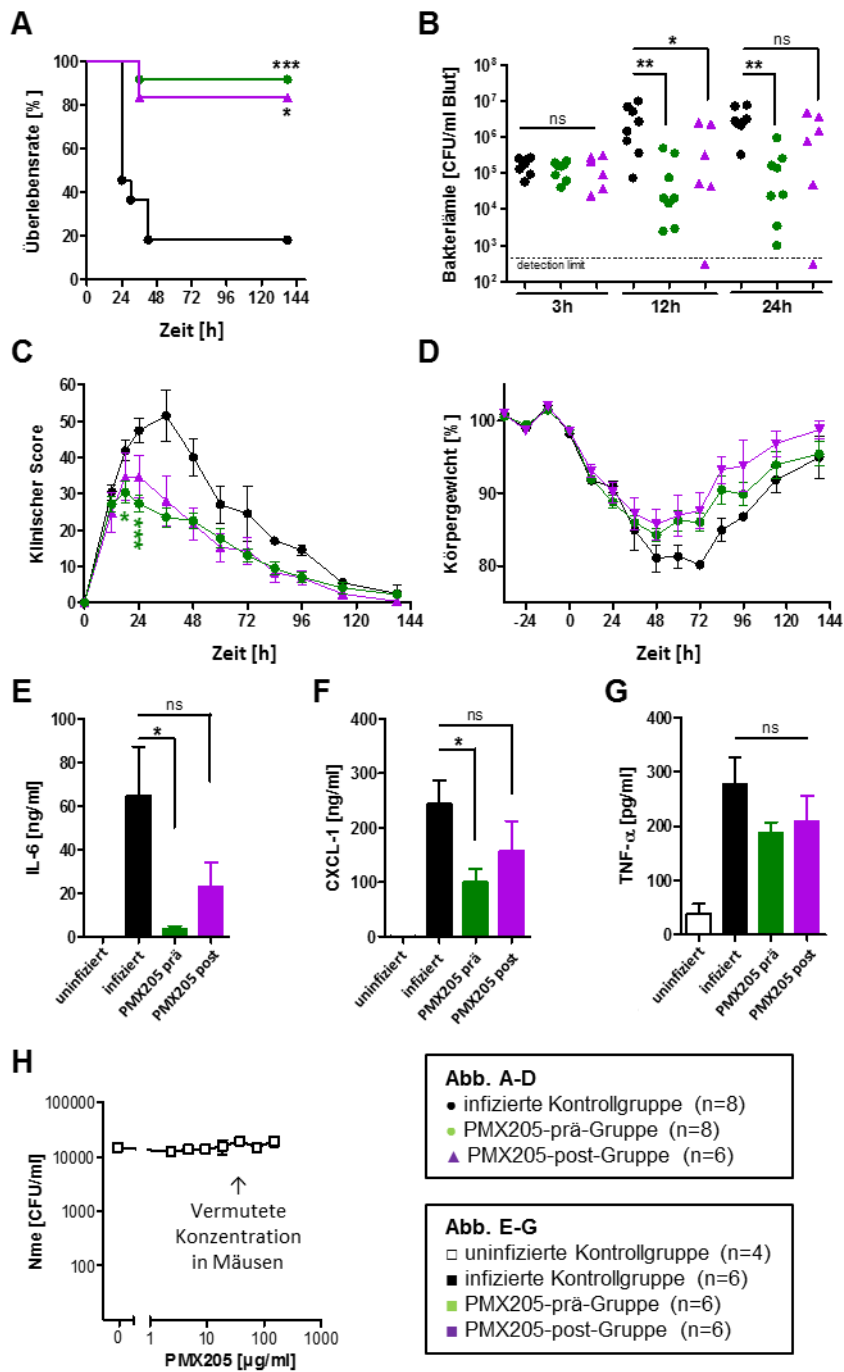


Abbildung 15

Einfluss von C5aR1-Blockade mit PMX205 auf Überlebensrate, Bakteriämie, klinischen Score, Körpergewicht und Konzentrationen pro-inflammatorischer Mediatoren in WT Tieren nach intraperitonealer Infektion mit 10^5 *N. meningitidis* MC58. Behandlungskohorten wie folgt: Kontrollgruppe ohne Infektion und ohne Behandlung (□, E-G), infizierte Kontrollgruppe mit Vehikel (5 % Glukose) anstelle von PMX205 (● in A-D, ■ in E-G); infizierte Behandlungsgruppe mit PMX205 nach ‘prä’-Schema (● in A-D, ■ in E-G); infizierte Behandlungsgruppe mit

PMX205 nach ‘post’-Schema (▲ in A-D, ■ in E-G). Infizierte Tiere erhielten 10^5 CFU *N. meningitidis* MC58. Behandlungsschema in infizierter Kontrollgruppe: je 100 μ l ddH₂O / 5 % Glukose i. p. zu den Zeitpunkten -12 h, -6 h, 0 h, +12 h, +24 h, +36 h, +48 h, +60 h und +72 h. Behandlungsschema in PMX205-prä-Gruppe: je 3 mg PMX205 in 100 μ l ddH₂O / 5 % Glukose i. p. zu den Zeitpunkten -12 h, -6 h, 0 h, +12 h, +24 h, +36 h, +48 h, +60 h und +72 h. Behandlungsschema in PMX205-post-Gruppe: je 3 mg PMX205 in 100 μ l ddH₂O / 5 % Glukose i. p. zu den Zeitpunkten +4 h, +9 h, +15 h, +24 h, +36 h, +48 h, +60 h und +72 h. Gruppengrößen für Abb. A-D wie in A angegeben, Gruppengrößen für Abb. E-G wie rechts unten angegeben. **A** Überlebensrate [%]; Die statistische Analyse erfolgte in Mantel-Cox-Test (jeweilige PMX205-Gruppe vs. Kontrollgruppe) (*, **, ***; $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$) **B** Bakteriämie [CFU/ml Blut]; Die Nachweisgrenze für Bakteriämie ist angegeben (...). Die statistische Analyse erfolgte für jeden Zeitpunkt in Kruskal-Wallis-Test mit Dunnett’s *post hoc* Test (Vergleichsgruppe: jeweils Kontrollgruppe) (ns, *, **, ***: nicht signifikant, $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$) **C** Klinischer Score; Mittelwerte und Standardfehler sind angegeben **D** Körpergewicht; Mittelwerte und Standardfehler sind angegeben **E,F,G** Konzentrationen von IL-6 [pg/ml], CXCL1 [pg/ml] und TNF- α [pg/ml]; Die statistische Analyse erfolgte mit one-way ANOVA mit Dunnett’s *post hoc* Test (vs. infizierte Kontrollgruppe) **H** Test von PMX205 auf Bakterizidie („Killing assay“); Die vermutete Konzentration von PMX205 im Serum behandelter Versuchstiere ist eingezeichnet.

Gleichzeitig kam es zu einer signifikanten Reduktion der Bakteriämie beider Behandlungsgruppen („PMX205-prä-Gruppe“ und „PMX205-post-Gruppe“) zum Zeitpunkt +12 h im Vergleich zur uninfizierten Kontrollgruppe. Diese signifikant reduzierte Bakteriämie konnte in der „PMX205-prä-Gruppe“ auch bei +24 h beobachtet werden (Abb. 15B).

Auch die Ergebnisse des klinischen Scorings zeigten, dass niedrigere Belastungen bei Tieren beider Behandlungsgruppen („PMX205-prä-Gruppe“ und „PMX205-post-Gruppe“) im Vergleich zu Tieren der „infizierten Kontrollgruppe“ vorlagen. Bei +18 h und +24 h waren die klinischen Scores der „PMX205-prä-Gruppe“ signifikant niedriger als die der „infizierten Kontrollgruppe“ (Abb. 15C). Darüber hinaus sank das Körpergewicht bei Versuchstieren beider Behandlungsgruppen im zeitlichen Verlauf geringer ab, als bei denjenigen der „infizierten Kontrollgruppe“ (Abb. 15D).

Zudem zeigten Tiere beider Behandlungsgruppen („PMX205-prä-Gruppe“ und „PMX205-post-Gruppe“) geringere Konzentrationen der pro-inflammatorischen Mediatoren IL-6, CXCL1 und TNF- α (Abb. 15E-G). Zum Zeitpunkt +12 h war dieser Effekt für IL-6 und CXCL1 sogar signifikant zwischen der „PMX205-prä-Gruppe“ und der „infizierten Kontrollgruppe“. In Tests auf Bakterizidie (Kapitel 2.12) konnte gezeigt werden, dass PMX205 keine bakterizide Wirkung auf *Nme* hat (Abb. 15H).

Diese Experimente belegen, dass Symptome einer murinen *Nme*-Sepsis im Hinblick auf die Parameter „Überlebensrate“, „Bakteriämie“, „klinisches Scoring“ und „Konzentration pro-inflammatorischer Mediatoren“ unter der Therapie von PMX205 sowohl in präventiver als auch therapeutischer Situation verbessert werden konnten. Von dem C5aR1-Antagonisten PMX205 ging dabei keine direkt bakterizide Wirkung aus, weshalb anzunehmen ist, dass tatsächlich die Antagonisierung von C5aR1 zur Symptommilderung während der *Nme*-Sepsis geführt hat.

4 Diskussion

4.1 Inflammatorischer Arm des Komplementsystems

Wie zahlreiche Untersuchungen zeigen konnten, kommt dem humanen Komplementsystem in der Erkennung und Bekämpfung invasiver *Nme*-Stämme eine zentrale Rolle zu. Innerhalb des humanen Komplementsystems konnte die entscheidende Bedeutung des lytischen Arms in Form der terminalen Kaskade (C5b-9) mit Bildung des MAK auf der Oberfläche von *Nme* in umfangreichen Untersuchungen gezeigt werden. In Abwesenheit des MAKs, z. B. in komplement-defizienten Patienten, ist ein signifikanter Anstieg der Suszeptibilität gegenüber *Nme*-Sepsis beobachtet worden. Im Vergleich zu immungesunden Menschen haben solche Patienten ein bis zu 10.000-fach erhöhtes Risiko eine IMD zu entwickeln und ein bis zu 150-fach erhöhtes Risiko rezidivierende Infektionen zu erleiden (49), (54), (184). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass der opsonisierende Arm des Komplementsystems mit dem Opsonin C3b die AK-vermittelte Bekämpfung von invasiven *Nme* unterstützt (58). Im Gegensatz dazu ist - über Spekulationen hinaus - sehr wenig über die Bedeutung des inflammatorischen Astes in Rahmen der *Nme*-Sepsis bekannt. Erste Hinweise über dessen Bedeutung gehen auf ein *in vitro* *Nme*-Infektionsmodell an menschlichem Vollblut nach Sprong *et al.* zurück (185). Hierbei konnte eine Aggravation verschiedener Sepsisparameter durch den inflammatorischen Arm beobachtet werden. Unter Hemmung des inflammatorischen Arms mit anti-C5a-Antikörpern konnten gleichzeitig die Parameter CR3-Expression, Phagozytose und oxidativer Burst von Granulozyten und Monozyten reduziert werden, ohne dass jedoch die Bildung des MAKs und die induzierte Bakterienlyse beeinflusst wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse am murinen *in vivo* *Nme*-Sepsis-Modell stehen in Einklang mit oben genannten, klinischen Beobachtungen am Menschen bzw. mit den Ergebnissen am *Nme*-Sepsis-Modell mit menschlichem Vollblut. Grundlegend ist anzumerken, dass die Komplementsysteme von Mensch und Maus - nach heutigem Stand der Forschung - sowohl in Aufbau als auch Funktion weitgehend vergleichbar sind. Beispielsweise existieren auch in der Maus die drei Aktivierungswegen klassischer Weg, Lektin-Weg und alternativer Weg (186), (187).

Wie auch in klinischen Beobachtungen am Menschen gezeigt werden konnte, ergab sich in der Maus aus der funktionellen Abwesenheit des Komplementsystems bei C3^{-/-} Mäusen

eine extrem erhöhte Suszeptibilität gegenüber *Nme* (Kapitel 3.1, Abb. 3), was dafür spricht, dass das Komplementsystem auch in der Maus generell protektiv wirkt.

Es stellt sich an dieser Stelle die Frage nach dem individuellen Beitrag der drei Arme des murinen Komplementsystems (lytischer, opsonisierender und inflammatorischer Arm) in der murinen *Nme*-Sepsis und ob jeweils ein protektiver oder schädlicher Effekt überwiegt.

In Bezug auf den lytischen Arm in $C3^{-/-}$ Mäusen ist eine Aktivitätsminderung zu vermuten. Durch die fehlende C3-Spaltung ist die Bildung der C5 Konvertase vermutlich nicht möglich, weshalb eine direkte C5-Spaltung und eine anschließende MAK-Formierung mit Lyse ausbleibt. Dennoch ist eine indirekte C5-Spaltung über Quervernetzungen mit der Gerinnungskaskade (z. B. durch Thrombin) möglich, wie an menschlichem Blut gezeigt werden konnte (188). Welchen Einfluss diese indirekte C5-Spaltung auf die suffiziente MAK-Bildung und Lyseinduktion hat, ist ungewiss. Um die genaue Bedeutung des lytischen Arms in der *Nme*-Sepsis zu untersuchen, wäre die Verwendung einer C6-defizienten Maus ($C6^{-/-}$) denkbar, welche allerdings nicht im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung stand. Unabhängig von der Art der C5-Spaltung könnten $C6^{-/-}$ Mäuse im *Nme*-Sepsis-Modell mit WT Mäusen verglichen werden, oder C6-blockierende Antikörper zum Einsatz kommen.

Darüber hinaus ist eine Aktivitätsminderung des opsonisierenden Arms in $C3^{-/-}$ Mäusen zu vermuten. Aufgrund der Abwesenheit von C3 kann keine Spaltung dieses Faktors in C3a und C3b erfolgen. Eine durch das Opsonin C3b vermittelte Phagozytenattraktion bleibt aus. Um den genauen Beitrag des Opsonins C3b zu untersuchen, könnte im *Nme*-Sepsis-Modell eine C5-defiziente Maus ($C5^{-/-}$) genutzt werden. Bei dieser sind der lytische Arm sowie der wichtigste Teil des inflammatorischen Arms (in Form des C5a) mit Ausnahme des C3a inhibiert.

Bezug nehmend auf Ergebnisse dieser Arbeit an gesunden WT Mäusen kann ein überwiegend schädlicher Effekt des inflammatorischen Astes des Komplementsystems vermutet werden. Während der *Nme*-Sepsis konnte zunächst die Aktivierung des inflammatorischen Astes in Form von C3a- und C5a-Freisetzung gezeigt werden (Kapitel 3.1.2). Da die gemessenen C5a-Konzentrationen in infizierten Tieren (Abb.4) deutlich über den Dissoziationskonstanten für den C5aR1 (K_d ca. 1 nM) und für den C5aR2 (K_d ca. 2,5 nM)

lagen (53), ist eine relevante Rezeptor-Aktivierung und resultierende Zellantwort zu vermuten. Bei solch hohen Konzentrationen muss gegebenenfalls mit einer „Paralyse“ von Zellen des Immunsystems gerechnet werden (189). Aus Hemmung der C5a-C5aR-Achse als Teil der Signalübertragung des inflammatorischen Astes, resultierten geringere Entzündungszeichen und höhere Überlebensraten in Versuchstieren (Abb. 5-10, 13, 15).

Im Gegensatz zu dem lytischen und opsonisierenden Arm des Komplementsystems scheint der inflammatorische Arm eine überschießende, schädliche Immunreaktion im Wirt Maus zu vermitteln. Obwohl die Maus kein natürlicher Wirt von *Nme* ist, lässt sich vermuten, dass der inflammatorische Arm auch in der menschlichen *Nme*-Sepsis eine schädliche Wirkung haben könnte. In Patienten anderer Sepsis-Studien konnte eine Korrelation zwischen hohen Konzentrationen von C3a und C5a mit Multiorganversagen und geringeren Überlebensraten beobachtet werden (130), (190). Diese Aspekte sollten in nachfolgenden Arbeiten anhand von humanem Vollblut untersucht werden, um die hier in der Maus erhobenen Daten auf den Menschen übertragen zu können.

4.2 Sepsismodelle

4.2.1 Verschiedene Sepsismodelle im Vergleich

Wie bereits in der Einleitung angesprochen, ist die Bezeichnung „Sepsis“ ein Überbegriff für ein weites Spektrum von Erkrankungen deren Ursache eine Infektion ist und in deren Folge sich eine fehlgeleitete Immunreaktion manifestiert (Kapitel 1.5). Aufgrund der unterschiedlichen Ausprägungen der Sepsis, erscheint es auch sinnvoll, dass im Laufe der Zeit verschiedene Sepsismodelle etabliert wurden (128). Das jeweilige Modell ist somit immer im Kontext der untersuchten Sepsisform zu verstehen und nicht als „Universal-Sepsis-Modell“ zu sehen. Aufgrund der Komplexität ablaufender, pathologischer Mechanismen und der vielschichtigen Interaktionen zwischen unterschiedlichen Geweben während einer Sepsis, ist es vermutlich sinnvoll *in vivo* Modelle den *in vitro* Modellen vorzuziehen.

Beispiele für *in vivo* Sepsismodelle an Versuchstieren sind das *E. coli*-Modell, das LPS-Modell oder das CLP-Modell. Anhand des *E. coli*-Modells wird speziell die *E. coli*-Sepsis nach i. v. Injektion in Mäusen (150), Schweinen (139) und Primaten untersucht (141),

(191). In diesem Zusammenhang konnte im *E. coli*-Sepsismodell an Pavianen ein protektiver Effekt durch die medikamentöse Inhibition der C5-Spaltung (in C5a und C5b) gezeigt werden (192).

Im Rahmen des LPS-Modells wird Versuchstieren gereinigtes LPS i. v. appliziert, um Infektionen mit LPS-synthetisierenden (gram-negativen) Erregern zu simulieren (131). Genau genommen ist es nicht korrekt, das LPS-Modell als „Sepsismodell“ zu bezeichnen, da eine mikrobielle Infektion fehlt, welche definitionsgemäß Ursache einer Sepsis ist. Dennoch kann das stark pro-inflammatorischen LPS die systemische, dysregulierte Immunantwort (SIRS, Zytokinsturm) als Folge einer Infektion *in vivo* simulieren. Vor diesem Hintergrund gibt es Hinweise darauf, dass C5a über den C5aR1 im murinen LPS-Modell einen Zytokinsturm verstärkt (193).

Eine weitverbreitete und international anerkannte Methode zur Untersuchung der polymikrobiellen Sepsis ist das CLP-Modell (cecal ligation and puncture) an Nagern. Hierbei wird das Zäkum freipräpariert, ligiert und anschließend punktiert. Durch Manipulation wird Darminhalt ausgepresst, wodurch eine Peritonitis mit folgender polymikrobieller Sepsis durch Keime der Normalflora des Darm-Trakts induziert wird. Der Schweregrad kann durch die Länge der Zäkumligatur, die Nadeldicke und die Anzahl der Punktionen variiert werden (129), (181), (194). Das CLP-Sepsis-Modell dient der Untersuchung von Infektionen mit Fokus im Magen-Darm-Trakt, welche beim Menschen zum Beispiel im Zuge einer Darmperforation (z. B. bei Appendizitis, Sigmadivertikulitis, ischämischer Kolitis) oder als Komplikation einer abdominalen Operation auftreten können. Verschiedene Ansätze zur Blockade der C5a-C5aR1-Achse in Form von anti-C5a-Antikörpern, C5aR1-knockout-Tieren oder C5aR1-Antagonisten bzw. anti-C5aR1-Antikörpern konnten die pro-inflammatorische Rolle dieser Achse in der polymikrobiellen Sepsis zeigen (128). Ein Schwachpunkt dieses Modells ist sicherlich die Variabilität der induzierten Sepsis und damit die eingeschränkte Reproduzierbarkeit. Es bestehen relevante, interindividuelle Unterschiede, einerseits in der Ausführung der Sepsis-induzierenden Operation, andererseits in dem für die Sepsis verantwortlichen Keimspektrum des Stuhls. Eine Weiterentwicklung des CLP-Modells stellt das bisher wenig bekannte PCI-Modell (peritoneal contamination and infection) dar. Hierbei wird eine Peritonitis durch intraperitoneale Injektion einer aufbereiteten Stuhlsuspension induziert, wodurch man sich eine bessere Reproduzierbarkeit erhofft (195), (196).

Neben den genannten Sepsismodellen an Tieren existiert auch der *in vitro* Ansatz am Menschen. Durch Inkubation von *E.coli* in menschlichem Vollblut kann ein Zytokinsturm imitiert werden sowie oxidativer Burst und Phagozytose durch Granulozyten und Monozyten untersucht werden. Beide Parameter konnten durch Inhibierung der C5a-C5aR-Achse per anti-C5a-Antikörper und C5aR1-Antagonist signifikant reduziert werden (197).

4.2.2 *Nme*-Sepsismodelle

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Sepsis-Modellen sind *Nme*-Sepsis-Modelle sowohl *in vivo* als auch *in vitro* weniger gut etabliert. Der Grund hierfür ist erstens, dass der allgemeine Schwerpunkt der *Nme*-Forschung (an Mensch und Tier) bisher hauptsächlich auf der Untersuchung des Kolonisierungsverhaltens von *Nme* im Nasopharynx sowie auf der Untersuchung der *Nme*-Meningitis liegt. Zweitens ist *N. meningitidis* human-spezifisch, weshalb *in vivo* *Nme*-Tiermodelle (für Meningitis oder Sepsis) generell schwierig zu realisieren sind.

Salit *et al.* konnten durch intranasale Injektionen von *Nme*-Lösungen eine partielle, nasopharyngeale Kolonisierung in Ratten und Mäusen bewirken (179). Von entscheidender Bedeutung für die Fähigkeit zur systemischen, invasiven Ausbreitung von *Nme* scheint der Zugang zu freiem Eisen (Fe^{3+}) zu sein. Durch zusätzliche regelmäßige, intraperitoneale Gabe von Eisenquellen wie z. B. Eisendextran, humanem Transferrin bzw. humanem Laktoferrin, konnte, ausgehend von der nasopharyngealen Kolonisierung, eine systemische Infektion mit Sepsis-ähnlichem Zustand hervorgerufen werden (198), (199). Aufgrund der eingeschränkten Reproduzierbarkeit der nasopharyngealen Kolonisierung einerseits und der systemischen Infektion andererseits wurde dieses *Nme*-Sepsismodell folgendermaßen modifiziert: Durch intraperitoneale Injektion einer *Nme*-Lösung (in Kombination mit intraperitoneale Eisengabe) konnte eine zuverlässigere, systemische Infektion herbeigeführt werden als bei nasopharyngealer Applikation (163). Der Infektfokus bei diesem Ansatz liegt intraperitoneal, im Sinne einer Peritonitis. Hierbei unterscheidet sich der Infektionsweg im Mausmodell erheblich von der humanen Infektion. Der *Nme*-typische Infektionsweg im Menschen ist bekanntermaßen die nasopharyngeale Tröpfcheninfektion. Der Infektfokus ist hierbei die Schleimhaut des Nasenrachenraums.

Eine weitere Verfeinerung dieses *Nme*-Sepsis-Modells stellte der Ansatz von Taha *et al.* dar. Hierbei wurden Mäuse einer transgenen Linie, welche humanes Transferrin exprimieren, infiziert. *Nme* kann Eisen direkt vom Wirtstier beziehen und eine produktive Sepsis nach intraperitonealer Infektion kann ohne Gabe von Eisenpräparaten erzielt werden (200). Allerdings wurde in diesem Modell keine konstant steigende Menge an Bakterien im Blut nachgewiesen, sondern nur eine transient ansteigende Bakteriämie, welche nach einigen Stunden wieder abfällt.

Einen weiteren Ansatz stellte das Modell der „Faktor H humanisierten Ratte“ von Vu *et al.* dar (201). Faktor H ist ein lösliches, regulatorisches Protein, welches den alternativen Weg der Komplementkaskade inhibieren kann. *Nme* war mit Hilfe der Virulenzfaktoren fHbp (Faktor H bindendes Protein) und NspA (*Neisseria* surface protein) befähigt, Faktor H an der Oberfläche zu binden und eine lokale Hemmung der Komplementaktivierung zu erreichen (202). Durch Einbringen des humanen Faktors H in die Ratte konnte eine vorübergehende Bakteriämie nach i. p. *Nme*-Injektion erreicht werden.

Neben diesen Modellen existiert auch der Ansatz, eine *Nme*-Kolonisierung und *Nme*-Sepsis in Versuchstieren durch Superinfektion zu erreichen. Beispielsweise wurden Mäuse zunächst intranasal mit Influenzavirus A infiziert und einige Tage später zusätzlich intranasal mit *Nme* (203). Es ist fraglich, ob dieser Ansatz eine gute Grundlage für die Erforschung der *Nme*-Sepsis darstellt, da nach Erhebung verschiedener Sepsisparameter (wie z. B. Expression von Virulenzfaktoren, Bakterienlast, Zytokinkonzentrationen) unklar bleibt, welcher Erreger jeweils für Veränderungen verantwortlich ist.

Untersuchungen zur *Nme*-Sepsis am Menschen beschränken sich bislang auf *in vitro* Vollblutmodelle nach Sprong *et al.* (185). Hierbei wurden humane Blutproben mit *Nme* inkubiert und verschiedene Sepsisparameter gemessen. Im Einklang stehend mit Ergebnissen oben beschriebener Sepsismodelle zeigte sich unter anderem eine Reduktion der Sepsisparameter „Phagozytose“ und „Oxidativer Stress“ unter C5a-Inhibition mit anti-C5a-Antikörper. Dies spricht für eine pro-inflammatorische Wirkung der C5a-C5aR-Achse in der humanen *Nme*-Sepsis.

Unter kritischer Beurteilung der angewendeten Methoden in dieser Arbeit, könnten in Zukunft Verbesserungen des *Nme*-Sepsis-Modells vorgenommen werden. Zur Untersuchung der *Nme*-Sepsis am Mausmodell wurde die intraperitoneale Infektion gewählt.

Eine Supplementierung von Eisendextran durch zweimalige intraperitoneale Applikation am Versuchsanfang wurde durchgeführt (Kapitel 2.6.3). Zu Gunsten einer zuverlässigen Induktion der Sepsis durch intraperitoneale Infektion wurde hierbei ein für *Nme* untypischer Infektionsweg in Kauf genommen. Durch die i. p. Applikation von *Nme* wird vermutlich zunächst eine Peritonitis und in deren Folge eine *Nme*-Sepsis induziert. Wie *Nme* genau vom Peritoneum ins Blut gelangt ist unbekannt. Einerseits wäre eine direkte Migration durch die Wand intraabdominaler Blutgefäße, andererseits eine indirekte Migration über Lymphdrainage (Ductus thoracicus) denkbar. Um die Infektion weiter zu standardisieren, könnte versucht werden eine technisch anspruchsvollere, intravenöse Applikation von *Nme* durchzuführen.

Eine weitere Verfeinerung des Ansatzes wäre sicherlich die Verwendung der transgenen Mauslinie mit Expression humanen Transferrins von Taha *et al.* gewesen (200). Dadurch wären i. p. Applikationen von Eisendextran am Versuchsanfang nicht mehr nötig, um eine produktive Infektion zu induzieren. Leider stand diese Mauslinie jedoch nicht zur Verfügung.

4.2.3 Gegenüberstellung von CLP-Modell und *Nme*-Sepsismodell

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Rolle der C5a-C5aR1-Achse in der *Nme*-Sepsis stehen weitgehend in Einklang mit den Resultaten aus oben beschriebenen Sepsismodellen an Mensch (humane Vollblut-Modelle) und Tier (*E.coli*-, LPS- und CLP-Modell), obgleich sich alle genannten Modelle fundamental unterscheiden. Bedeutend ist an dieser Stelle der Vergleich zwischen dem verwendeten, intraperitonealen *Nme*-Sepsis- und dem weitverbreiteten CLP-Sepsis-Modell, da wichtige Erkenntnisse zur Rolle des Komplementsystems in der Sepsis daran gewonnen wurden.

Obwohl sich das i. p. *Nme*-Sepsismodell und das CLP-Modell grundlegend unterscheiden, ist in beiden Fällen von einem starken pro-inflammatorischen Effekt der C5a-C5aR1-Achse auszugehen. Beispielsweise unterscheiden sich die Sepsis-induzierenden Erreger in beiden Modellen voneinander. Im *Nme*-Modell ist die Monoinfektion durch das professionelle Pathogen *N. meningitidis* ursächlich für die Sepsis. Gerade hier ist der potentiell schädliche Effekt der C5a-C5aR-Achse auch vor dem Hintergrund des engen

(protektiven) Zusammenhangs zwischen *Nme*-Infektion und Komplementaktivierung interessant. Im CLP-Modell ist eine Mischinfektion mit Keimen der Standortflora des Magen-Darm-Trakts verantwortlich für die Sepsis, wobei der jeweilige Beitrag einzelner Erreger zur Sepsis unklar bleibt. Aus diesem Grund bleibt auch unklar, welche genaue Bedeutung die einzelnen Komplementarme (lytischer, opsonisierender, inflammatorischer Arm) in der CLP-Sepsis haben. Ein weiterer Unterschied zwischen *Nme*- und CLP-Modell ist der Infektionsweg, welcher beim *Nme*-Sepsismodell die i. p. Injektion unter Eisensubstitution mit anschließender Peritonitis und im CLP-Modell die Laparotomie mit artifizieller Darmperforation ist.

4.3 Rolle des C5aR1 in der *Nme*-Sepsis

Die Abwesenheit von C5aR1 bewirkt in der murinen *Nme*-Sepsis eine höhere Überlebensrate, geringere Bakteriämie und geringere Konzentrationen pro-inflammatorischer Mediatoren (Abb. 5-7). Interessanterweise scheint der C5aR1 keine direkte Auswirkung auf die Fähigkeit der Bakterienklärung im Blut durch Phagozyten zu haben (Abb. 11, 12). Experimente dieser Arbeit lassen vermuten, dass der C5aR1 primär eine Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren (SIRS) fördert (Abb. 13), welche dann zu einer Paralyse und einem Funktionsverlust phagozytierender Immunzellen führen. Erst sekundär könnte dadurch die hohe Bakterienlast im Blut bedingt sein.

Um die Erkenntnisse aus dem Mausmodell auf den Menschen zu übertragen, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Denkbar wäre zunächst ein *in vitro* *Nme*-Infektionsmodell nach dem Vorbild von Sprong *et al.* mit menschlichem Vollblut (185), bei dem die Effekte von C5aR1-Blockade mit Hilfe von Antikörper (z. B. anti-C5aR1-Antikörper Klon S5/1, (204)) oder Antagonisten (z. B. NDT 9513727 (205) oder PMX53 (206)) untersucht werden könnten.

Darüber hinaus könnten Wiederholungen der *in vivo* Experimente wie in Kapitel 3.4 beschrieben, zur Klärung des mechanistischen Hintergrunds bezüglich der Reihenfolge von SIRS und Bakteriämie (Hypothese: Bakteriämie folgt SIRS) beitragen. Beispielsweise sollte zunächst mit einer größeren Versuchsgruppe bestätigt werden, dass kein signifikanter Unterschied im Klärungsverhalten der Bakteriämie von WT und C5aR1^{-/-} Mäusen

nach intraperitonealer Infektion mit teilungsunfähigen *Nme* (z. B. unbekapselte oder hitzeinaktivierte Bakterien) besteht (Kapitel 3.4.1, Abb. 11, 12). Zudem könnte die Messung von zusätzlichen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren, wie z. B. IL-1 und TNF- α , im Blut infizierter WT und C5aR1^{-/-} Mäuse nach Infektion mit teilungsunfähigen *Nme* bestätigen, dass durch die Abwesenheit von C5aR1 geringere Konzentrationen von Entzündungsmediatoren entstehen (Abb. 13).

4.4 Mechanismus der zellulären Pathophysiologie in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen/Monozyten

Der C5aR1 konnte auf der Oberfläche zahlreicher Zellpopulationen, speziell auf myeloischen Zelllinien, nachgewiesen werden (Kapitel 1.4) (53). Die pro-inflammatorische Wirkung des C5aR1 äußerte sich *in vivo* in verschiedenen Sepsis-Modellen in geringeren Überlebensraten, in höheren Bakteriämien und höheren Konzentrationen pro-inflammatorischer Mediatoren (Kapitel 1.5) (128). In diesem Zusammenhang ist der genaue Beitrag distinkter Zellpopulationen auf die komplexen Mechanismen im Krankheitsbild Sepsis noch weitgehend ungeklärt.

Es wurde vermutet, dass gerade neutrophile Granulozyten eine ambivalente Rolle in der Sepsis einnehmen und hauptverantwortlich für die akute Immunreaktion sind. Einerseits sind sie mit der Fähigkeit zur Phagozytose entscheidend an der direkten Bekämpfung der Bakterien beteiligt. Andererseits können Granulozyten zahlreiche potente pro- und anti-inflammatorische Mediatoren freisetzen, welche wiederum ein Ungleichgewicht des Immunsystems fördern und ihrerseits zur Sepsis beitragen können (128).

Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit Depletionsversuche durchgeführt, um die Rolle von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen/Monozyten in der murinen *Nme*-Sepsis zu untersuchen (Kapitel 3.5). Die Ergebnisse (Abb. 14) lassen vermuten, dass die murine *Nme*-Sepsis nicht von der Aktivierung einer einzigen Zellpopulation allein dominiert wird, sondern eine komplexe zelluläre Interaktion besteht. Generell scheinen neutrophile Granulozyten und Makrophagen/Monozyten von essentieller Bedeutung für eine erfolgreiche Bewältigung der *Nme*-Sepsis zu sein, da sich die Sepsisparameter „Überlebensrate“, „Bakteriämie“ und „klinischer Score“ in Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen verschlechtern.

In Bezug auf die wichtige Bedeutung von neutrophilen Granulozyten in der *Nme*-Sepsis stimmen die Ergebnisse mit vorherigen Untersuchungen überein. Guo *et al.* (155) konnte im CLP-Modell an Ratten zeigen, dass durch hohe Konzentrationen von C5a eine Reduktion der C5aR1-Konzentrationen auf neutrophilen Granulozyten in der Initialphase der Sepsis durch Internalisierung und Reduktion der Expression stattfindet. Zudem nimmt die Fähigkeit zur Chemotaxis sowie zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Oxidativer Burst) in neutrophilen Granulozyten ab. Huber-Lang *et al.* (189) konnten zeigen, dass die durch neutrophile Granulozyten vermittelte Phagozytose durch hohe C5a-Spiegel, z. B. während einer Sepsis, gehemmt wird. Darüber hinaus wird die Fähigkeit zur Chemotaxis in der Sepsis stark reduziert (207), (208). Diese genannten Mechanismen der Paralyse von Granulozyten sind vermutlich auch während der *Nme*-Sepsis zu finden. Reduzierte Phagozytose, Chemotaxis und oxidativer Burst führen zur Hemmung der Bakterienbekämpfung mit daraus resultierender, hoher Bakteriämie. Zudem konnten eine gesteigerte Produktion von IL-1 β , IL-6 und IL-8 (aber eine geringere Produktion von TNF- α) durch neutrophile Granulozyten während einer Sepsis beobachtet werden (134), (135), (209), wodurch neutrophile Granulozyten zum SIRS während der Sepsis beitragen.

Auch in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien an Makrophagen/Monozyten konnte eine erhöhte Produktion überwiegend pro-inflammatorischer Mediatoren, wie zum Beispiel TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8, in der Sepsis dokumentiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Makrophagen während der Sepsis vermehrt Thromboplastin produzieren, wodurch pathologische Gerinnungsprozesse gefördert werden (128). Jedoch lässt sich auf Grundlage der Ergebnisse der Depletion von Makrophagen/Monozyten (Abb.14) generell eine protektive Rolle dieser Zellpopulation vermuten. Wahrscheinlich steht hier die direkte Bekämpfung der Bakterien durch Phagozytose im Vordergrund. Ausführende phagozytierende Zellen sind wahrscheinlich einerseits Monozyten im Blut und andererseits gewebständige Makrophagen des Peritonealraums, welche zur Bekämpfung einer Infektion mit intraperitonealem Fokus (nach i. p. Applikation von *Nme*) extrem wichtig erscheinen.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Zelldepletionsversuche (Abb. 14) sind kritisch zu hinterfragen, da nur geringe Gruppengrößen (3-5 Tiere pro Gruppe) verwendet wurden. Deshalb ist eine Wiederholung der Depletionsversuche auch mit verschiedenen Inokula sicherlich empfehlenswert. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die

pharmakologische Depletion der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen /Monozyten zu schwankenden Konzentrationen der Zellreihen in Blut und Geweben führen könnte. Ein eleganter Ansatz, um diese Variable auszuschließen, wäre es, *Nme*-Sepsis-Versuche an zelltypspezifischen C5aR-knockout Mäusen durchzuführen. Besonders interessant wäre hier die Kreuzung der geflochtenen C5aR-GFP-*knock-in* Maus mit einer Linie, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des LysM Promotors exprimiert, wodurch kein C5aR1 auf Neutrophilen und Makrophagen exprimiert wird (210). An dieser Mauslinie könnten dann Infektionsversuche nach dem hier verwendeten Protokoll durchgeführt werden. Überlebensrate, Bakteriämie, klinischer Score und Konzentrationen von pro-inflammatorischen Mediatoren könnten mit denen von WT Mäusen verglichen werden, um den jeweiligen Beitrag von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen/Monozyten besser zu verstehen.

Darüber hinaus wäre es interessant, Depletionsversuche im *Nme*-Sepsis-Modell an Mastzellen durchzuführen, um die Bedeutung dieser Zellpopulation zu erforschen. Mastzellen sind durch die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren, wie z. B. Histamin, maßgeblich an der Kreislaufdysregulation während anaphylaktischen Reaktionen (z. B. im anaphylaktischen Schock) beteiligt. Der spezifische Beitrag von Mastzellen in der *Nme*-Sepsis ist noch unbekannt, aber Ergebnisse aus anderen Sepsis-Modellen deuten auf eine schädliche, pro-inflammatorische Wirkung hin. Beispielsweise konnte im CLP-Modell gezeigt werden, dass Mastzellen Peritonealmakrophagen inhibieren können, wodurch schlechtere Sepsis-Parameter in Überlebensrate und Bakteriämie resultierten (211). Eine funktionelle *in vivo* Mastzelledepletion könnte beispielsweise durch die Membranstabilisierung mit Cromolyn (Cromoglicinsäure) erreicht werden (212). Um die genaue Bedeutung des C5aR1 auf Mastzellen zu erforschen, wäre es denkbar, eine geflochte Mauslinie, wie oben beschrieben, herzustellen (210). Diese Mauslinie würde keine C5aR1 auf der Mastzelloberfläche tragen und Sepsisparameter im *Nme*-Sepsis-Modell könnten im Vergleich zu WT Mäusen untersucht werden.

Neben Mastzellen wäre es auch sinnvoll den Beitrag von C5aR1 auf Endothelzellen zu untersuchen. Denn während der Sepsis hat die molekulare Integrität des Endothels bedeutenden Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Hämodynamik und damit auf das Gesamtüberleben. Einerseits droht durch die periphere Vasodilatation und die Zunahme der

Gefäßpermeabilität eine vermehrte Ödemneigung („capillary leakage“) (213). Andererseits sind Mikrozirkulationsstörungen durch „Disseminierte intravasale Gerinnung“ (DIC) gefürchtet (214). Vor diesem Hintergrund könnte die Bedeutung des C5aR1 *in vitro* auf verschiedenen murinen und humanen Endothelzelllinien z. B. von Pulmonalgefäßen (Human pulmonary artery endothelia cells, HPAEC) getestet werden (215). Endothelzellen könnten mit anti-C5aR1-Antikörper geblockt und anschließend mit *Nme* inkubiert werden. Die Konzentration verschiedener inflammatorischer Mediatoren, wie z. B. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, könnten per ELISA bestimmt werden. Zudem könnten Konzentrationen verschiedener Proteine der Gerinnungskaskade, wie z. B. Plasminogenaktivator (tPA), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) (216) oder Thrombomodulin (217), gemessen werden. Nach dem Vorbild von Angelini *et al.* könnte zusätzlich ein „Endothel Barriere Assay“ durchgeführt werden und die molekularen Strukturen der gap junctions untersucht werden (218), um Aussagen über den Einfluss des C5aR1 auf die Gefäßpermeabilität zu erhalten.

4.5 Endorganschäden während der *Nme*-Sepsis

Mehrere Publikationen konnten Organversagen im CLP-Sepsis-Modell *in vivo* an den Organen Niere, Nebenniere, Leber, Lunge, Thymus und Herz beschreiben (148), (156), (219). Die Ursachen für Organversagen während der infektiösen Sepsis sind vermutlich mannigfaltig. Allgemein scheinen jedoch folgende Faktoren bedeutend zu sein: 1) direkte toxische Wirkung der Pathogene, 2) Dysregulation des wirtseigenen Immunsystems (z. B. hohe Konzentration pro-inflammatorischer Mediatoren, einwandernde Immunzellen), 3) metabolische Entgleisung und direkt toxische Wirkung (z. B. Laktatanstieg), 4) hämodynamische Dekompensation mit Sauerstoffunterversorgung von Endorganen (Schock) (128).

Im Folgenden soll auf die Endorganschäden durch Dysregulation des wirtseigenen Immunsystems während der infektiösen Sepsis eingegangen werden. Ein zentraler Aspekt scheint hierbei die frühzeitige Migration von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut in peripheres Gewebe zu sein. Mit dem Ziel, eingewanderten Pathogenen zu folgen und diese direkt zu bekämpfen, kommt es zunächst zu einer massiv gesteigerten Neutrophilenmigration. Durch eine überschießende Immunreaktion in Form von Freisetzung der

reaktiven Sauerstoffspezies, inflammatorischen Mediatoren und Proteasen können dann Endorganschäden verursacht werden (128), (220).

Dieser Mechanismus konnte im CLP-Sepsis-Modell an Nagern beispielsweise in Lunge und Leber beobachtet werden (219), (221). Vor diesem Hintergrund wird dem inflammatorischen Arm des Komplementsystems eine aggravierende, pro-inflammatorische Rolle zugeschrieben. Es zeigte sich beispielsweise, dass unter Hemmung der C5a-C5aR1-Achse mit anti-C5a-Antikörpern im CLP-Sepsis-Modell an Ratten die Bakterienkonzentration in Leber und Milz sowie die Neutrophilenmigration in die Lunge gesenkt werden konnte (222). Darüber hinaus konnte mit anti-C5a-Antikörpern im CLP-Sepsis-Modell an Ratten eine Verbesserung der Kardiomyozytenkontraktilität *in vitro* und der Linksventrikulären Funktion *in vivo*, als Parameter des Endorganschadens, erzielt werden (148).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Kapitel 3.3) lassen vermuten, dass ein ähnlicher Zusammenhang auch in der *Nme*-Sepsis besteht. Sowohl in WT und C5aR1^{-/-} Mäusen ist eine Einwanderung von Neutrophilen in die Organe Lunge und Leber in den Stunden nach der i. p. Infektion mit *Nme* mittels Immunfluoreszenz zu beobachten (Abb. 8, 9), wohingegen in der Milz keine wesentlichen Veränderungen zu erkennen waren (Abb. 10). Hierbei führt die Abwesenheit von C5aR1 zu einer schwächeren Neutrophilenmigration in Leber und Lunge. Die beobachtete Neutrophilenmigration in die Lunge während der Infektion könnte hierbei das histologische Anzeichen eines Lungenversagens sein, dessen Endstrecke beim Menschen als „Acute respiratory distress syndrome“ (ARDS, Schocklunge) bekannt ist. Verschiedenste Trigger (zu ca. 30 % Infektionen) bewirken eine ausgeprägte Neutrophilenmigration in die Lunge gefolgt von einem schweren, diffusen Parenchymschaden mit interstitiellem Lungenödem (220), (223).

Basierend auf der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur Untersuchung der Neutrophilenmigration an Leber, Lunge und Milz von Mäusen während der *Nme*-Sepsis könnten Proben weiterer Endorgane wie z. B. von Niere, Nebenniere, Myokard und Darm untersucht werden. Das Ausmaß der Neutrophilenmigration in die genannten Organe könnte nach Infektion in WT und C5aR1^{-/-} Tieren bestimmt und mit der Bakterienanzahl korre-

liert werden. Die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten ließe sich mit Hilfe der Messung des Oxidativen Bursts (z. B. Cytochrom C Assay oder Dihydrodamin-123-Assay (224)) quantifizieren.

Darüber hinaus könnten *in vivo* während der *Nme*-Sepsis weitere Zellreihen auf ihr Migrationsverhalten hin untersucht werden. Monozyten/Makrophagen könnten, ebenso wie Neutrophile, per Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht und ihre Aktivität mittels Phagozytose-Assay gemessen werden (225), um deren Beitrag zum Endorganschaden zu klären. Die Auswirkung von Mastzellen könnte mit Hilfe eines Mastzell-Degranulations-Assays (226) zwischen WT und C5aR1^{-/-} verglichen werden.

Um das Ausmaß des Endorganschadens zu erforschen, könnten Konzentrationen verschiedener inflammatorischer Mediatoren, wie z. B. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, in Organbiopsien im Vergleich von WT und C5aR1^{-/-} Tieren gemessen werden.

Zudem könnten im Verlauf der Infektion *in vivo* organspezifische Blutwerte und physiologische Parameter ermittelt werden, um den jeweiligen Organstatus zu überwachen, Endorganschäden festzustellen und zu quantifizieren. Beispielsweise könnten mittels eines PhysioSuites® (Kent Scientific Corporation) die Herz-Kreislaufparameter Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, Atemfrequenz und endexpiratorischer CO₂-Gehalt in Mäusen gemessen werden. In Ergänzung dazu könnte der Säure-Base-Status durch Messung von pH, Lactat, Bikarbonat (HCO³⁻) und dem CO₂-Partialdruck im arteriellen Blut ermittelt werden (227). Die Herzfunktion könnte *in vivo* nach dem Vorbild von Niederbichler *et al.* durch Messung des linksventrikulären Drucks bestimmt werden (148). Durch Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) mit FITC-Inulin (228) und Messung von Kreatinin und Harnstoff im Blut (229) könnte die Nierenfunktion überwacht werden. Die Leberfunktion ließe sich durch Messung der Leberenzyme Aspartataminotransferase (AST) und Alaninaminotransferase (ALT) sowie Albumin im Blut bestimmen (229). Dieses erweiterte Monitoring der Versuchstiere könnte eine differenzierte Betrachtung der Endorganschäden ermöglichen.

4.6 C5a-C5aR1-Achse als therapeutische Zielstruktur

Wie bereits in vorherigen Kapiteln angesprochen (Kapitel 1.2), kann das Komplementsystem bei unterschiedlichen Erkrankungen des Menschen aktiviert werden. Gerade dem

inflammatorischen Teil der Komplementkaskade wird eine zunehmend wichtigere Rolle in der Pathophysiologie verschiedener Krankheiten zugesprochen. In diesem Zuge rückt die C5a-C5aR1-Achse auch als therapeutische Zielstruktur in den Fokus. Die Blockade dieser Achse könnte ein Ansatz in der Therapie entsprechender Erkrankungen darstellen. Bislang konnten bereits einige Substanzen zur Blockade der C5a-C5aR1-Achse identifiziert werden, welche interessant für die Anwendung am Menschen erscheinen. Eine pharmakologische Unterscheidung zwischen Antagonisten und Antikörpern erscheint sinnvoll.

Auf zellulärer Ebene konnte der C5aR-Antagonist W-54011 die C5a-induzierte Chemotaxis und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus menschlichen Neutrophilen reduzieren (97), (230). Weitere Untersuchungen an anderen, humanen Zellreihen sind nötig um die Bedeutung dieses Antagonists zu erforschen.

In verschiedenen, erkrankungsspezifischen Nagetier-Modellen konnte die Blockade des C5aR1 durch die zyklischen C5aR-Antagonisten PMX53 (Mensch und Ratte) und PMX205 (Maus und Ratte), sowie durch den linearen C5aR-Antagonisten JPE1375 (Maus) signifikante Ergebnisse erzielen (206). Es zeigte sich beispielsweise, dass PMX205 in der Maus eine Therapieoption bei allergischem Asthma (231), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (232), Alzheimer Demenz (233), Amyotropher Lateralsklerose (234) und Rückenmarkstraumen (235) sein könnte. PMX53 zeigte an Ratten eine signifikante Verbesserung in einem Modell zur Typ-III-Allergie (Soforttyp) (236).

Darüber hinaus wurde PMX53 am Menschen bereits in klinischen Phase-I- und Phase-II-Studien für rheumatoide Arthritis und Psoriasis getestet (237). Trotz guter Verträglichkeit und ausreichenden Konzentrationen des Peptidantagonists zeigten sich weder klinische, noch laborchemische oder histologische Verbesserungen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (238).

Der oral applizierte C5aR1-Antagonist Avacopan (CCX168) konnte am Mausmodell zur ANCA-assoziierten Glomerulonephritis eine signifikante Verbesserung des Krankheitsbildes bewirken. Einerseits zeigte sich laborchemisch eine verringerte Hämaturie, Proteinurie und Leukozyturie, andererseits zeigte sich histologisch eine geringere Ausprägung der Immunkomplexablagerung, Neutrophilenmigration und Nekrose in Nierenglo-

meruli (239). In einer klinischen Phase-I-Studie konnte eine gute Verträglichkeit bei oraler Applikation auch am Menschen berichtet werden (240). Eine klinische Phase-2-Studie (CLEAR Studie) an Patienten mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis konnte zeigen, dass Avacopan die Krankheitsaktivität reduzieren kann (241). Nach eigenen Angaben konnte die Firma ChemoCentryx diese Ergebnisse in einer weiteren klinischen Phase-2-Studie (CLASSIC Studie) reproduzieren und plant aktuell (Stand: November 2018) eine klinische Phase-3-Studie an Patienten mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis (242). In Zukunft könnte Avacopan eine Ergänzung zu der wirkungsvollen, aber nebenwirkungsreichen Dauertherapie mit Kortison bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden darstellen.

Neben den oben genannten Antagonisten wurden auch diverse Antikörper in Tier und Mensch beschrieben, welche die C5a-C5aR1-Achse an unterschiedlichen Positionen inhibieren können. Zielstrukturen der Antikörper sind beispielsweise C5a, C5aR oder C5 bzw. die C5-Konvertase.

Der bekannteste von Ihnen ist der humanisierte C5-Antikörper Eculizumab (Soliris®), welcher C5 bindet und dessen Spaltung in C5a und C5b verhindert. Ursprünglich für die Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) zugelassen, erscheinen zahlreiche weitere Indikationen interessant. Beispiele hierfür sind das atypische hämolytisch-urämisches-Syndrom (243) und die membranproliferative Glomerulonephritis (244). Unerwünschte Wirkung unter Therapie mit diesem Antikörper ist die höhere Suszeptibilität gegenüber Infektionen, speziell gegenüber *Nme*, welche sich durch die Reduktion der C5b-Konzentration und die damit verbundene gestörte Bildung des Membranangriffskomplexes erklären lässt (245).

Ein weiteres Beispiel ist der anti-C5a-Antikörper IFX-1. Mit diesem konnte das Outcome einer Influenza-induzierten Pneumonie an Affen verbessert werden. Die Parameter Virustiter, Migration verschiedener Immunzellen in die Lunge, die Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren und histopathologische Veränderungen konnten verringert werden (246). Nach eigenen Angaben der Firma inflaRx zeigte sich eine gute Verträglichkeit von IFX-1 in einer klinischen Phase-2-Studie (SCIENCE Studie) an Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock (247), sowie an einer klinischen Phase-2-Studie (SHINE Studie) an Patienten mit Akne inversa (Hidradenitis suppurativa) (248).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass PMX205 in der murinen *Nme*-Sepsis eine vielversprechende Therapieoption ist (Abb. 15). Sogar bei Therapiebeginn vier Stunden nach der Infektion konnten signifikante Verbesserungen bei verschiedenen Sepsisparametern erzielt werden. Sicherlich sind noch weitere Untersuchungen angebracht, um das therapeutische Zeitfenster von PMX205 zwischen Infektion und Behandlungsbeginn zu explorieren. Darüber hinaus könnte eine Kombinationstherapie aus Antibiotikum und C5aR1-Antagonisten im Mausmodell untersucht werden.

Vor diesem Hintergrund wäre die Blockade der C5-C5aR-Achse z. B. mit den C5aR1-Antagonisten PMX53 und Avacopan (CCX168) oder den Antikörpern Eculizumab oder IFX-1 ein möglicher Ansatz für die Therapie der humanen *Nme*-Sepsis. Es besteht dringender Forschungsbedarf, da außer der Gabe von Antibiotika momentan keine kausalen Therapieoptionen in der Behandlung des schweren, fulminanten Krankheitsbildes zur Verfügung stehen. Möglicherweise wäre die Blockade der C5a-C5aR-Achse auch eine geeignete Therapiestrategie in anderen Formen der humanen Sepsis, um Mortalität und Folgeschäden durch übermäßige Komplementaktivierung zu reduzieren.

4.7 Rolle des C5aR2 in der *Nme*-Sepsis

Es besteht weiterhin große Unsicherheit hinsichtlich des C5aR2 im Hinblick auf den molekularen Mechanismus, seine Bedeutung während Krankheitsprozessen und seine Interaktion mit dem C5aR1. Auch während der Sepsis bleibt die Bedeutung des C5aR2 völlig unklar, da widersprüchliche Ergebnisse in verschiedenen Sepsis-Modellen vorliegen. Diese Ergebnisse lassen sowohl protektive, als auch schädliche Effekte des C5aR2 vermuten (Kapitel 1.4) (128). Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen am (murinen) *Nme*-Sepsis-Modell erforderlich, um hier die Rolle des C5aR2 zu beleuchten. Denkbar wäre die Durchführung von Experimenten unter Blockade des C5aR1 und C5aR2 mit entsprechenden Antikörpern nach Vorbild von Rittirsch *et al.* (120). Zudem könnten *Nme*-Infektions-Versuche mit C5aR2-knockout-Mäusen durchgeführt werden (120), (249), um den Beitrag des C5aR2 in der Sepsis zu untersuchen.

4.8 Ausblick

Mit dieser Arbeit konnten Einblicke in die Rolle des C5aR1 in der Pathophysiologie der *Nme*-Sepsis am Mausmodell gewonnen werden. Weitere Untersuchungen in diesem Bereich sind jedoch nötig, um die komplexen Mechanismen besser zu verstehen und die Erkenntnisse aus der Maus auf den Menschen zu übertragen.

Die genaue Bedeutung des C5aR2 und dessen Interaktion mit dem C5aR1 sind immer noch weitgehend unbekannt. Zudem ist unklar, welche zellulären Mechanismen zu einem schlechteren Outcome während der *Nme*-Sepsis führen und welche Rolle der C5aR1 dabei spielt. Erkenntnisse über die individuelle Rolle der C5aR1 und C5aR2 im Allgemeinen und in der *Nme*-Sepsis könnten durch deren spezifische Blockade *in vivo* und *in vitro* gewonnen werden.

Darüber hinaus sollten zukünftige Arbeiten auch die Bedeutung der C3a-C3aR-Achse untersuchen. Vermutlich trägt diese auch zum inflammatorischen Geschehen in der *Nme*-Sepsis bei.

Höchst interessant ist außerdem der mögliche Einsatz der C5aR1-Antagonisten in der humanen *Nme*-Sepsis. In diesem Rahmen wäre ein zukünftiges Therapieregime aus Antibiotika in Verbindung mit C5aR1-Antagonisten denkbar. Mehr noch, die Anwendung der immunmodulatorischen C5aR-Antagonisten in therapeutischer Absicht könnte sogar auf andere Formen der Sepsis erweitert werden.

5 Zusammenfassung

Das bekapselte, Gram-negative, diplokokkenförmige Bakterium *Neisseria meningitidis* (*Nme*) ist ein asymptomatischer Kommensale des oberen Nasenrachenraums im Menschen. Gerade bei Kindern ist es dem humanspezifischen Pathogen in seltenen Fällen möglich, in den Blutstrom einzuwandern und lebensbedrohliche Krankheitsbilder wie Meningoenzephalitis und Sepsis auszulösen, welche als „Invasive Meningokokkenkrankung“ (IMD) zusammengefasst werden. Jährlich ereignen sich weltweit bis zu 1,2 Mio Fälle von IMD, welche aufgrund des fulminanten Verlaufs und der hohen Letalität gefürchtet sind. In der Bekämpfung der *Nme*-Sepsis ist das humane Komplementsystem von entscheidender Bedeutung. Vor diesem Hintergrund ist die protektive Rolle des lytischen (Membranangriffskomplex MAK) und opsonisierenden Arms (Opsonine iC3b und C1q) der Komplementkaskade gut dokumentiert. Dagegen ist der Beitrag des inflammatorischen Arms (Anaphylatoxine C3a und C5a) in der *Nme*-Sepsis bisher unklar. Aus diesem Grunde wurde mit dieser Arbeit die Rolle des inflammatorischen Arms anhand des Komplement C5a-Rezeptors 1 (C5aR1) in der Pathophysiologie der *Nme*-Sepsis am Mausmodell untersucht. Nach Etablierung des murinen, intraperitonealen Infektionsmodells konnte ein schädlicher Effekt des C5aR1 in der *Nme*-Sepsis beobachtet werden. Aus der Abwesenheit des C5aR1 resultierte eine höhere Überlebensrate, ein besserer klinischer Zustand, eine niedrigere Bakteriämie und niedrigere Konzentrationen der pro-inflammatorischen Mediatoren IL-6, CXCL-1 und TNF- α . Im Hinblick auf den zellulären Pathomechanismus sprechen Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass der C5aR1 primär eine gesteigerte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch verschiedene Zellpopulationen triggert (Zytokinsturm), wodurch sekundär Zellparalyse, steigende Bakteriämie und höhere Letalität bedingt sind. Durch Depletionsversuche und Immunfluoreszenzfärbungen konnte, unabhängig vom C5aR1, eine allgemein protektive Rolle von neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen in der *Nme*-Sepsis beobachtet werden. Darüber hinaus präsentierte sich der zyklische C5aR1-Antagonist PMX205 als erfolgsversprechende Therapieoption, um Parameter einer murinen *Nme*-Sepsis zu verbessern. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Wirksamkeit dieser Substanz in der humanen *Nme*-Sepsis zu erforschen. Zudem könnte das murine, intraperitoneale Infektionsmodell zur Klärung der Rolle des C5aR2 in der *Nme*-Sepsis genutzt werden.

Summary

The encapsulated, Gram-negative diplococcus *Neisseria meningitidis* (*Nme*) is an asymptomatic commensal in the human upper respiratory tract. In rare cases and especially in children, this human-specific pathogen is able to invade into the blood stream and cause life-threatening disorders like meningococcal meningitis and septicemia, which are subsumed as „invasive meningococcal disease“ (IMD). The estimated number of cases is about 1.2 mio per year worldwide. IMD is greatly feared because of its fulminant progression and its high lethality. It is very well known, that the human complement system holds an essential role to fight meningococcal sepsis. In this context, the protective effects of the lytic (membrane attack complex MAC) and opsonizing branches (opsonines iC3b and C1q) are well established. On the contrary, very little is known about the contribution of the inflammatory branch (anaphylatoxins C3a and C5a) in meningococcal sepsis. Therefore, this work focused on the role of the C5a-Receptor 1 (C5aR1) in pathophysiology of meningococcal sepsis in a murine model. After having established the paramount role of complement in murine intraperitoneal infection model, we could observe a detrimental effect of C5aR1 in Meningococcal sepsis. The absence of C5aR1 resulted in a higher overall survival, ameliorated clinical status, lower bacteremia and lower levels of the pro-inflammatory mediators IL-6, CXCL-1, TNF- α . Particularly with regard to results about the cellular pathomechanism, the C5aR1 seems to cause an increased release of pro-inflammatory mediators (cytokine storm) exerted by various cell populations. As a consequence, cellular paralysis, increasing bacterial burden and higher lethality rate seems to occur. In reference to depletion experiments and immunofluorescence stainings, we could observe protective overall effects of neutrophils and monocytes/macrophages, uncorrelated to C5aR1 presence. Ultimately, the cyclic C5aR1-antagonist PMX205 appeared to be a promising option to improve parameters in murine meningococcal sepsis. Further experiments are required to examine the potential of this compound in human meningococcal sepsis. Moreover, the murine, intraperitoneal infection model could be used to clarify the role of C5aR2 in meningococcal sepsis.

6 Literaturverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf der „67. DGHM-Tagung“ in Münster (27.-30. September 2015), auf dem „10. EUREKA Symposium der GSLS der Universität Würzburg“ (14.-15. Oktober 2015), auf dem „13. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin (KIT)“ in Würzburg (15.-18. Juni 2016) und auf der „20. und „21. International Pathogenic Neisseria Conference (IPNC)“ in Manchester (04.-09. September 2016) und in Pacific Grove (23.-28. September 2018) vorgestellt. Darüber hinaus sind Teile dieser Arbeit publiziert in „J.B. Herrmann, M. Muenstermann, L. Strobel, A. Schubert-Unkmeir, T.M. Woodruff, S.D. Gray-Owen, A. Klos, K.O. Johswich, Complement C5a Receptor 1 Exacerbates the Pathophysiology of N. meningitidis Sepsis and Is a Potential Target for Disease Treatment. MBio. 2018 Jan 23“.

1. O. B. Harrison *et al.*, Description and nomenclature of Neisseria meningitidis capsule locus. *Emerging infectious diseases* **19**, 566-573 (2013).
2. D. S. Stephens, Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium Neisseria meningitidis. *Vaccine* **27**, B71-B77 (2009).
3. K. A. Cartwright, J. M. Stuart, D. M. Jones, N. D. Noah, The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and Neisseria lactamica. *Epidemiology and Infection* **99**, 591-601 (1987).
4. R. Gold, I. Goldschneider, M. L. Lepow, T. F. Draper, M. Randolph, Carriage of Neisseria meningitidis and Neisseria lactamica in infants and children. *The Journal of infectious diseases* **137**, 112-121 (1978).
5. D. A. Caugant *et al.*, Asymptomatic carriage of Neisseria meningitidis in a randomly sampled population. *Journal of clinical microbiology* **32**, 323-330 (1994).
6. H. Christensen, M. May, L. Bowen, M. Hickman, C. L. Trotter, Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases* **10**, 853-861 (2010).
7. K. R. Neal *et al.*, Changing carriage rate of Neisseria meningitidis among university students during the first week of term: cross sectional study. *BMJ : British Medical Journal* **320**, 846-849 (2000).
8. C. C. Blackwell *et al.*, Factors affecting carriage of Neisseria meningitidis among Greek military recruits. *Epidemiol Infect* **108**, 441-448 (1992).
9. N. G. Roupael, D. S. Stephens, Neisseria meningitidis: Biology, Microbiology, and Epidemiology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **799**, 1-20 (2012).
10. S. P. Stoof *et al.*, Disease Burden of Invasive Meningococcal Disease in the Netherlands Between June 1999 and June 2011: A Subjective Role for Serogroup and Clonal Complex. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **61**, 1281-1292 (2015).

11. S. F. Cahalane, M. Waters, Fulminant meningococcal septicaemia. A hospital experience. *Lancet (London, England)* **2**, 120-121 (1975).
12. M. van Deuren, P. Brandtzaeg, J. W. M. van der Meer, Update on Meningococcal Disease with Emphasis on Pathogenesis and Clinical Management. *Clinical Microbiology Reviews* **13**, 144-166 (2000).
13. Q. Mok, W. Butt, The outcome of children admitted to intensive care with meningococcal septicaemia. *Intensive care medicine* **22**, 259-263 (1996).
14. D. van de Beek *et al.*, Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *The New England journal of medicine* **351**, 1849-1859 (2004).
15. S. Takada *et al.*, Meningococemia in Adults: A Review of the Literature. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* **55**, 567-572 (2016).
16. S. Nadel, Treatment of Meningococcal Disease. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine* **59**, S21-28 (2016).
17. U. B. Schaad, Arthritis in disease due to Neisseria meningitidis. *Reviews of infectious diseases* **2**, 880-888 (1980).
18. J. R. Morse, M. I. Oretsky, J. A. Hudson, Pericarditis as a complication of meningococcal meningitis. *Annals of internal medicine* **74**, 212-217 (1971).
19. M. van Deuren, C. Neeleman, K. J. Assmann, J. F. Wetzels, J. W. van der Meer, Rhabdomyolysis during the subacute stage of meningococcal sepsis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **26**, 214-215 (1998).
20. N. Bohm, Adrenal, cutaneous and myocardial lesions in fulminating endotoxemia (Waterhouse-Friderichsen syndrome). *Pathology, research and practice* **174**, 92-105 (1982).
21. A. Sonavane, V. Baradkar, P. Salunkhe, S. Kumar, Waterhouse-friderichsen syndrome in an adult patient with meningococcal meningitis. *Indian journal of dermatology* **56**, 326-328 (2011).
22. M. Sadarangani *et al.*, Outcomes of invasive meningococcal disease in adults and children in Canada between 2002 and 2011: a prospective cohort study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **60**, e27-35 (2015).
23. N. Nathan *et al.*, Ceftriaxone as effective as long-acting chloramphenicol in short-course treatment of meningococcal meningitis during epidemics: a randomised non-inferiority study. *Lancet (London, England)* **366**, 308-313 (2005).
24. S. G. Heckenberg *et al.*, Clinical features, outcome, and meningococcal genotype in 258 adults with meningococcal meningitis: a prospective cohort study. *Medicine* **87**, 185-192 (2008).
25. Q. Chang, Y.-L. Tzeng, D. S. Stephens, Meningococcal disease: changes in epidemiology and prevention. *Clinical Epidemiology* **4**, 237-245 (2012).
26. M. Cvetkovic *et al.*, Timing of death in children referred for intensive care with severe sepsis: implications for interventional studies. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies* **16**, 410-417 (2015).
27. R. L. Schildkamp, M. C. Lodder, H. A. Bijlmer, J. Dankert, R. J. Scholten, Clinical manifestations and course of meningococcal disease in 562 patients. *Scandinavian journal of infectious diseases* **28**, 47-51 (1996).

28. M. S. Edwards, C. J. Baker, Complications and sequelae of meningococcal infections in children. *The Journal of pediatrics* **99**, 540-545 (1981).
29. W. N. Campbell, M. Joshi, D. Sileo, Osteonecrosis following meningococemia and disseminated intravascular coagulation in an adult: case report and review. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **24**, 452-455 (1997).
30. L. J. Baraff, S. I. Lee, D. L. Schriger, Outcomes of bacterial meningitis in children: a meta-analysis. *The Pediatric infectious disease journal* **12**, 389-394 (1993).
31. S. Merkelbach, H. Sittinger, I. Schweizer, M. Muller, Cognitive outcome after bacterial meningitis. *Acta neurologica Scandinavica* **102**, 118-123 (2000).
32. S. L. Pomeroy, S. J. Holmes, P. R. Dodge, R. D. Feigin, Seizures and other neurologic sequelae of bacterial meningitis in children. *The New England journal of medicine* **323**, 1651-1657 (1990).
33. C. A. Hart, L. E. Cuevas, Meningococcal disease in Africa. *Annals of tropical medicine and parasitology* **91**, 777-785 (1997).
34. H. Campbell, R. Borrow, D. Salisbury, E. Miller, Meningococcal C conjugate vaccine: the experience in England and Wales. *Vaccine* **27 Suppl 2**, B20-29 (2009).
35. S. I. Pelton, The Global Evolution of Meningococcal Epidemiology Following the Introduction of Meningococcal Vaccines. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine* **59**, S3-s11 (2016).
36. Updated recommendations on the use of meningococcal vaccines. *Pediatrics* **134**, 400-403 (2014).
37. N. Crum-Cianflone, E. Sullivan, Meningococcal Vaccinations. *Infectious diseases and therapy* **5**, 89-112 (2016).
38. T. Folaranmi, L. Rubin, S. W. Martin, M. Patel, J. R. MacNeil, Use of Serogroup B Meningococcal Vaccines in Persons Aged ≥ 10 Years at Increased Risk for Serogroup B Meningococcal Disease: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* **64**, 608-612 (2015).
39. M. Fukusumi *et al.*, National surveillance for meningococcal disease in Japan, 1999-2014. *Vaccine* **34**, 4068-4071 (2016).
40. A. C. Cohn *et al.*, Changes in Neisseria meningitidis disease epidemiology in the United States, 1998-2007: implications for prevention of meningococcal disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **50**, 184-191 (2010).
41. G. Gabutti, A. Stefanati, P. Kuhdari, Epidemiology of Neisseria meningitidis infections: case distribution by age and relevance of carriage. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* **56**, E116-E120 (2015).
42. R. Dwilow, S. Fanella, Invasive meningococcal disease in the 21st century-an update for the clinician. *Current neurology and neuroscience reports* **15**, 2 (2015).
43. B. M. Greenwood, A. K. Bradley, R. A. Wall, Meningococcal disease and season in sub-Saharan Africa. *Lancet (London, England)* **2**, 829-830 (1985).
44. M. S. Artenstein, J. H. Rust, Jr., D. H. Hunter, T. H. Lamson, E. L. Buescher, Acute respiratory disease and meningococcal infection in army recruits. *Jama* **201**, 1004-1007 (1967).
45. P. Makras, S. Alexiou-Daniel, A. Antoniadis, D. Hatzigeorgiou, Outbreak of meningococcal disease after an influenza B epidemic at a Hellenic Air Force

- recruit training center. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **33**, e48-50 (2001).
46. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Invasive-bacterial-diseases-surveillance-2011.pdf> (Zugriff am 13.08.2016)
 47. S. Ram, L. A. Lewis, P. A. Rice, Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clin Microbiol Rev* **23**, 740-780 (2010).
 48. D. Ricklin, G. Hajishengallis, K. Yang, J. D. Lambris, Complement - a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology* **11**, 785-797 (2010).
 49. L. A. Lewis, S. Ram, Meningococcal disease and the complement system. *Virulence* **5**, 98-126 (2014).
 50. M. K. Pangburn, H. J. Muller-Eberhard, Initiation of the alternative complement pathway due to spontaneous hydrolysis of the thioester of C3. *Annals of the New York Academy of Sciences* **421**, 291-298 (1983).
 51. R. B. Sim, T. M. Twose, D. S. Paterson, E. Sim, The covalent-binding reaction of complement component C3. *The Biochemical journal* **193**, 115-127 (1981).
 52. S. R. Barnum, C4a: An Anaphylatoxin in Name Only. *Journal of innate immunity* **7**, 333-339 (2015).
 53. A. Klos *et al.*, The Role of the Anaphylatoxins in Health and Disease. *Molecular immunology* **46**, 2753-2766 (2009).
 54. J. E. Figueroa, P. Densen, Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev* **4**, 359-395 (1991).
 55. M. Nagata *et al.*, Inherited deficiency of ninth component of complement: an increased risk of meningococcal meningitis. *The Journal of pediatrics* **114**, 260-264 (1989).
 56. A. E. Platonov, V. B. Beloborodov, I. V. Vershinina, Meningococcal disease in patients with late complement component deficiency: studies in the U.S.S.R. *Medicine* **72**, 374-392 (1993).
 57. J. Figueroa, J. Andreoni, P. Densen, Complement deficiency states and meningococcal disease. *Immunologic research* **12**, 295-311 (1993).
 58. I. Goldschneider, E. C. Gotschlich, M. S. Artenstein, Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *The Journal of experimental medicine* **129**, 1327-1348 (1969).
 59. S. Ram, L. A. Lewis, S. Agarwal, Meningococcal group W-135 and Y capsular polysaccharides paradoxically enhance activation of the alternative pathway of complement. *The Journal of biological chemistry* **286**, 8297-8307 (2011).
 60. M. J. Uria *et al.*, A generic mechanism in *Neisseria meningitidis* for enhanced resistance against bactericidal antibodies. *The Journal of experimental medicine* **205**, 1423-1434 (2008).
 61. G. A. Jarvis, N. A. Vedros, Sialic acid of group B *Neisseria meningitidis* regulates alternative complement pathway activation. *Infection and immunity* **55**, 174-180 (1987).
 62. U. Vogel *et al.*, Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Infection and immunity* **65**, 4022-4029 (1997).

63. M.-C. Geoffroy, S. Floquet, A. Métais, X. Nassif, V. Pelicic, Large-Scale Analysis of the Meningococcus Genome by Gene Disruption: Resistance to Complement-Mediated Lysis. *Genome Research* **13**, 391-398 (2003).
64. A. M. Blom, T. Hallstrom, K. Riesbeck, Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond. *Mol Immunol* **46**, 2808-2817 (2009).
65. L. A. Lewis *et al.*, The meningococcal vaccine candidate neisserial surface protein A (NspA) binds to factor H and enhances meningococcal resistance to complement. *PLoS Pathogens* **6**, e1001027 (2010).
66. G. Madico *et al.*, The meningococcal vaccine candidate GNA1870 binds the complement regulatory protein factor H and enhances serum resistance. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **177**, 501-510 (2006).
67. H. Jarva, S. Ram, U. Vogel, A. M. Blom, S. Meri, Binding of the complement inhibitor C4bp to serogroup B Neisseria meningitidis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174**, 6299-6307 (2005).
68. K. Hubert *et al.*, Opc expression, LPS immunotype switch and pilin conversion contribute to serum resistance of unencapsulated meningococci. *PloS one* **7**, e45132 (2012).
69. N. J. Griffiths *et al.*, Meningococcal surface fibril (Msf) binds to activated vitronectin and inhibits the terminal complement pathway to increase serum resistance. *Molecular microbiology* **82**, 1129-1149 (2011).
70. V. A. Bokisch, H. J. Muller-Eberhard, Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *The Journal of clinical investigation* **49**, 2427-2436 (1970).
71. K. W. Matthews, S. L. Mueller-Ortiz, R. A. Wetsel, Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. *Mol Immunol* **40**, 785-793 (2004).
72. S. Sayah *et al.*, Two different transduction pathways are activated by C3a and C5a anaphylatoxins on astrocytes. *Brain research. Molecular brain research* **112**, 53-60 (2003).
73. D. K. Lee *et al.*, Identification of four novel human G protein-coupled receptors expressed in the brain. *Brain research. Molecular brain research* **86**, 13-22 (2001).
74. H. C. Wilken, O. Gotze, T. Werfel, J. Zwirner, C3a(desArg) does not bind to and signal through the human C3a receptor. *Immunology letters* **67**, 141-145 (1999).
75. T. Crass *et al.*, Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U-937 cells. *European journal of immunology* **26**, 1944-1950 (1996).
76. R. S. Ames *et al.*, Molecular cloning and characterization of the human anaphylatoxin C3a receptor. *The Journal of biological chemistry* **271**, 20231-20234 (1996).
77. A. Klos *et al.*, C3a receptor on dibutyryl-cAMP-differentiated U937 cells and human neutrophils: the human C3a receptor characterized by functional responses and 125I-C3a binding. *Biochemistry* **31**, 11274-11282 (1992).
78. M. M. Glovsky, T. E. Hugli, T. Ishizaka, L. M. Lichtenstein, B. W. Erickson, Anaphylatoxin-induced histamine release with human leukocytes: studies of C3a leukocyte binding and histamine release. *The Journal of clinical investigation* **64**, 804-811 (1979).

79. P. J. Daffern, P. H. Pfeifer, J. A. Ember, T. E. Hugli, C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *The Journal of experimental medicine* **181**, 2119-2127 (1995).
80. J. Zwirner *et al.*, The human mast cell line HMC-1 binds and responds to C3a but not C3a(desArg). *Scandinavian journal of immunology* **47**, 19-24 (1998).
81. J. Zwirner, T. Werfel, H. C. Wilken, E. Theile, O. Gotze, Anaphylatoxin C3a but not C3a(desArg) is a chemotaxin for the mouse macrophage cell line J774. *European journal of immunology* **28**, 1570-1577 (1998).
82. R. Gutzmer *et al.*, Human monocyte-derived dendritic cells are chemoattracted to C3a after up-regulation of the C3a receptor with interferons. *Immunology* **111**, 435-443 (2004).
83. N. Davoust, J. Jones, P. F. Stahel, R. S. Ames, S. R. Barnum, Receptor for the C3a anaphylatoxin is expressed by neurons and glial cells. *Glia* **26**, 201-211 (1999).
84. T. Monsinjon *et al.*, Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 1003-1014 (2003).
85. L. Fregonese *et al.*, Expression of the anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR is increased in fatal asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* **115**, 1148-1154 (2005).
86. T. Werfel *et al.*, Activated human T lymphocytes express a functional C3a receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **165**, 6599-6605 (2000).
87. N. P. Gerard, C. Gerard, The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* **349**, 614-617 (1991).
88. D. E. Chenoweth, T. E. Hugli, Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3943-3947 (1978).
89. S. Eglite, K. Pluss, C. A. Dahinden, Requirements for C5a receptor-mediated IL-4 and IL-13 production and leukotriene C4 generation in human basophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **165**, 2183-2189 (2000).
90. D. E. Chenoweth, M. G. Goodman, The C5a receptor of neutrophils and macrophages. *Agents and actions. Supplements* **12**, 252-273 (1983).
91. T. Werfel, M. Oppermann, G. Begemann, O. Gotze, J. Zwirner, C5a receptors are detectable on mast cells in normal human skin and in psoriatic plaques but not in weal and flare reactions or in urticaria pigmentosa by immunohistochemistry. *Archives of dermatological research* **289**, 83-86 (1997).
92. A. Morelli, A. Larregina, I. Chuluyan, E. Kolkowski, L. Fainboim, Expression and modulation of C5a receptor (CD88) on skin dendritic cells. Chemotactic effect of C5a on skin migratory dendritic cells. *Immunology* **89**, 126-134 (1996).
93. S. Nataf, N. Davoust, R. S. Ames, S. R. Barnum, Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **162**, 4018-4023 (1999).
94. I. J. Laudes *et al.*, Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **169**, 5962-5970 (2002).

95. P. Gasque, S. K. Singhrao, J. W. Neal, O. Gotze, B. P. Morgan, Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *The American journal of pathology* **150**, 31-41 (1997).
96. I. Farkas, L. Baranyi, Z. S. Liposits, T. Yamamoto, H. Okada, Complement C5a anaphylatoxin fragment causes apoptosis in TGW neuroblastoma cells. *Neuroscience* **86**, 903-911 (1998).
97. P. N. Monk, A. M. Scola, P. Madala, D. P. Fairlie, Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *British journal of pharmacology* **152**, 429-448 (2007).
98. R. A. Wetsel, Expression of the complement C5a anaphylatoxin receptor (C5aR) on non-myeloid cells. *Immunology letters* **44**, 183-187 (1995).
99. S. A. Cain, P. N. Monk, The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *The Journal of biological chemistry* **277**, 7165-7169 (2002).
100. M. Ohno *et al.*, A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol Immunol* **37**, 407-412 (2000).
101. J. V. Sarma, P. A. Ward, New developments in C5a receptor signaling. *Cell health and cytoskeleton* **4**, 73-82 (2012).
102. J. Kohl, Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol Immunol* **38**, 175-187 (2001).
103. R. Baelder *et al.*, Pharmacological targeting of anaphylatoxin receptors during the effector phase of allergic asthma suppresses airway hyperresponsiveness and airway inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174**, 783-789 (2005).
104. J. R. Pratt, S. A. Basheer, S. H. Sacks, Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med* **8**, 582-587 (2002).
105. F. Gueler *et al.*, Complement 5a receptor inhibition improves renal allograft survival. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **19**, 2302-2312 (2008).
106. M. M. Markiewski *et al.*, Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol* **9**, 1225-1235 (2008).
107. C. W. Cotman, A. J. Tenner, B. J. Cummings, beta-Amyloid converts an acute phase injury response to chronic injury responses. *Neurobiology of aging* **17**, 723-731 (1996).
108. P. L. McGeer, E. G. McGeer, Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* **10 Suppl 1**, S3-7 (2004).
109. S. K. Singhrao, J. W. Neal, B. P. Morgan, P. Gasque, Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease. *Experimental neurology* **159**, 362-376 (1999).
110. G. S. Hageman *et al.*, A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7227-7232 (2005).
111. C. W. Strey *et al.*, The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *The Journal of experimental medicine* **198**, 913-923 (2003).
112. M. Benard *et al.*, Characterization of C3a and C5a receptors in rat cerebellar granule neurons during maturation. Neuroprotective effect of C5a against

- apoptotic cell death. *The Journal of biological chemistry* **279**, 43487-43496 (2004).
113. J. Ratajczak *et al.*, Mobilization studies in mice deficient in either C3 or C3a receptor (C3aR) reveal a novel role for complement in retention of hematopoietic stem/progenitor cells in bone marrow. *Blood* **103**, 2071-2078 (2004).
 114. S. Okinaga *et al.*, C5L2, a non-signaling C5A binding protein. *Biochemistry* **42**, 9406-9415 (2003).
 115. K. Johswich *et al.*, Ligand specificity of the anaphylatoxin C5L2 receptor and its regulation on myeloid and epithelial cell lines. *The Journal of biological chemistry* **281**, 39088-39095 (2006).
 116. M. Locati *et al.*, Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines. *Cytokine & growth factor reviews* **16**, 679-686 (2005).
 117. N. P. Gerard *et al.*, An anti-inflammatory function for the complement anaphylatoxin C5a-binding protein, C5L2. *The Journal of biological chemistry* **280**, 39677-39680 (2005).
 118. H. Gao *et al.*, Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 1003-1005 (2005).
 119. N. J. Chen *et al.*, C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature* **446**, 203-207 (2007).
 120. D. Rittirsch *et al.*, Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nature medicine* **14**, 551-557 (2008).
 121. M. J. Rabiet, E. Huet, F. Boulay, Complement component 5a receptor oligomerization and homologous receptor down-regulation. *The Journal of biological chemistry* **283**, 31038-31046 (2008).
 122. C. E. Bamberg *et al.*, The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction. *The Journal of biological chemistry* **285**, 7633-7644 (2010).
 123. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical care medicine* **20**, 864-874 (1992).
 124. Herold G: Innere Medizin. Gerd Herold (Verlag), Köln 2015, S. 324-327
 125. P. A. Ward, Role of C5 activation products in sepsis. *TheScientificWorldJournal* **10**, 2395-2402 (2010).
 126. D. C. Angus *et al.*, Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine* **29**, 1303-1310 (2001).
 127. M. Singer *et al.*, The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* **315**, 801-810 (2016).
 128. C. Yan, H. Gao, New insights for C5a and C5a receptors in sepsis. *Frontiers in Immunology* **3**, 368 (2012).
 129. L. Dejager, I. Pinheiro, E. Dejonckheere, C. Libert, Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends in microbiology* **19**, 198-208 (2011).
 130. H. Nakae, S. Endo, K. Inada, M. Yoshida, Chronological changes in the complement system in sepsis. *Surgery today* **26**, 225-229 (1996).

131. G. Smedegard, L. X. Cui, T. E. Hugli, Endotoxin-induced shock in the rat. A role for C5a. *The American journal of pathology* **135**, 489-497 (1989).
132. M. Huber-Lang *et al.*, Generation of C5a by phagocytic cells. *The American journal of pathology* **161**, 1849-1859 (2002).
133. R. F. Guo, P. A. Ward, Role of C5a in inflammatory responses. *Annual review of immunology* **23**, 821-852 (2005).
134. N. C. Riedemann *et al.*, Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 370-372 (2004).
135. C. D. Wrann *et al.*, The phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway exerts protective effects during sepsis by controlling C5a-mediated activation of innate immune functions. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 5940-5948 (2007).
136. R. Schindler, J. A. Gelfand, C. A. Dinarello, Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself. *Blood* **76**, 1631-1638 (1990).
137. W. Scholz *et al.*, C5a-mediated release of interleukin 6 by human monocytes. *Clinical immunology and immunopathology* **57**, 297-307 (1990).
138. R. M. Strieter *et al.*, Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8. *The American journal of pathology* **141**, 397-407 (1992).
139. U. Hopken *et al.*, Inhibition of interleukin-6 synthesis in an animal model of septic shock by anti-C5a monoclonal antibodies. *European journal of immunology* **26**, 1103-1109 (1996).
140. M. Bosmann *et al.*, MyD88-dependent production of IL-17F is modulated by the anaphylatoxin C5a via the Akt signaling pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 4222-4232 (2011).
141. J. H. Stevens *et al.*, Effects of anti-C5a antibodies on the adult respiratory distress syndrome in septic primates. *The Journal of clinical investigation* **77**, 1812-1816 (1986).
142. B. J. Czermak *et al.*, Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat Med* **5**, 788-792 (1999).
143. T. W. Muhlfelder *et al.*, C5 chemotactic fragment induces leukocyte production of tissue factor activity: a link between complement and coagulation. *The Journal of clinical investigation* **63**, 147-150 (1979).
144. I. J. Laudes *et al.*, Anti-c5a ameliorates coagulation/fibrinolytic protein changes in a rat model of sepsis. *The American journal of pathology* **160**, 1867-1875 (2002).
145. A. Jacob, B. Hack, P. Chen, R. J. Quigg, J. J. Alexander, C5a/CD88 signaling alters blood-brain barrier integrity in lupus through nuclear factor-kappaB. *Journal of neurochemistry* **119**, 1041-1051 (2011).
146. M. A. Flierl *et al.*, The complement anaphylatoxin C5a induces apoptosis in adrenomedullary cells during experimental sepsis. *PloS one* **3**, e2560 (2008).
147. H. U. Simon, Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunological reviews* **193**, 101-110 (2003).

148. A. D. Niederbichler *et al.*, An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction. *The Journal of experimental medicine* **203**, 53-61 (2006).
149. G. Atefi *et al.*, Complement dependency of cardiomyocyte release of mediators during sepsis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 2500-2508 (2011).
150. M. E. Fusakio *et al.*, C5a regulates NKT and NK cell functions in sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **187**, 5805-5812 (2011).
151. T. J. Hollmann, S. L. Mueller-Ortiz, M. C. Braun, R. A. Wetsel, Disruption of the C5a receptor gene increases resistance to acute Gram-negative bacteremia and endotoxic shock: Opposing roles of C3a and C5a. *Molecular immunology* **45**, 1907-1915 (2008).
152. N. C. Riedemann *et al.*, Increased C5a receptor expression in sepsis. *The Journal of clinical investigation* **110**, 101-108 (2002).
153. M. S. Huber-Lang *et al.*, Protection of innate immunity by C5aR antagonist in septic mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 1567-1574 (2002).
154. N. C. Riedemann *et al.*, Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **170**, 503-507 (2003).
155. R. F. Guo *et al.*, Neutrophil C5a receptor and the outcome in a rat model of sepsis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 1889-1891 (2003).
156. N. C. Riedemann *et al.*, C5a receptor and thymocyte apoptosis in sepsis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 887-888 (2002).
157. M. R. Wessels *et al.*, Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11490-11494 (1995).
158. U. E. Hopken, B. Lu, N. P. Gerard, C. Gerard, The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature* **383**, 86-89 (1996).
159. J. Guillen, FELASA guidelines and recommendations. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* **51**, 311-321 (2012).
160. B. T. McGuinness *et al.*, Point mutation in meningococcal por A gene associated with increased endemic disease. *Lancet (London, England)* **337**, 514-517 (1991).
161. M. Virji *et al.*, The role of pili in the interactions of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells. *Molecular microbiology* **5**, 1831-1841 (1991).
162. M. Virji, J. E. Heckels, Antigenic cross-reactivity of *Neisseria* pili: investigations with type- and species-specific monoclonal antibodies. *Journal of general microbiology* **129**, 2761-2768 (1983).
163. K. O. Johswich *et al.*, In Vivo Adaptation and Persistence of *Neisseria meningitidis* within the Nasopharyngeal Mucosa. *PLoS Pathogens* **9**, (2013).
164. B. E. Holbein, Enhancement of *Neisseria meningitidis* infection in mice by addition of iron bound to transferrin. *Infection and immunity* **34**, 120-125 (1981).
165. S. L. Mueller-Ortiz *et al.*, Targeted Disruption of the Gene Encoding the Murine Small Subunit of Carboxypeptidase N (CPN1) Causes Susceptibility to C5a

- Anaphylatoxin-Mediated Shock(). *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **182**, 6533-6539 (2009).
166. R. O. Webster, G. L. Larsen, P. M. Henson, In vivo clearance and tissue distribution of C5a and C5a des arginine complement fragments in rabbits. *Journal of Clinical Investigation* **70**, 1177-1183 (1982).
 167. J. A. Herrick, J. E. Kempf, A Study of the Fungistatic and Fungicidal Properties and of the Toxicity for Mice of Sodium Azide. *Journal of Bacteriology* **48**, 331-336 (1944).
 168. A. M. Finch *et al.*, Low-molecular-weight peptidic and cyclic antagonists of the receptor for the complement factor C5a. *Journal of medicinal chemistry* **42**, 1965-1974 (1999).
 169. N. J. Paczkowski *et al.*, Pharmacological characterization of antagonists of the C5a receptor. *British journal of pharmacology* **128**, 1461-1466 (1999).
 170. <https://www.apexbt.com/pmx-205.html> (Zugriff am 02.08.2018)
 171. C. R. Brown, V. A. Blaho, C. M. Loiacono, Treatment of mice with the neutrophil-depleting antibody RB6-8C5 results in early development of experimental lyme arthritis via the recruitment of Gr-1- polymorphonuclear leukocyte-like cells. *Infection and immunity* **72**, 4956-4965 (2004).
 172. C. J. Czuprynski, J. F. Brown, N. Maroushek, R. D. Wagner, H. Steinberg, Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **152**, 1836-1846 (1994).
 173. T. M. Tumpey, S. H. Chen, J. E. Oakes, R. N. Lausch, Neutrophil-mediated suppression of virus replication after herpes simplex virus type 1 infection of the murine cornea. *Journal of virology* **70**, 898-904 (1996).
 174. J. W. Conlan, R. J. North, Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *The Journal of experimental medicine* **179**, 259-268 (1994).
 175. N. van Rooijen, R. van Nieuwmegen, Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study. *Cell and tissue research* **238**, 355-358 (1984).
 176. N. van Rooijen, R. van Nieuwmegen, E. W. Kamperdijk, Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. Ultrastructural aspects of elimination of marginal zone macrophages. *Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology* **49**, 375-383 (1985).
 177. N. Van Rooijen, The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *Journal of immunological methods* **124**, 1-6 (1989).
 178. <https://clodronateliposomes.com> (Zugriff am 02.08.2018)
 179. I. E. Salit, E. Van Melle, L. Tomalty, Experimental meningococcal infection in neonatal animals: models for mucosal invasiveness. *Canadian journal of microbiology* **30**, 1022-1029 (1984).
 180. I. E. Salit, L. Tomalty, Experimental meningococcal infection in neonatal mice: differences in virulence between strains isolated from human cases and carriers. *Canadian journal of microbiology* **30**, 1042-1045 (1984).

181. C. C. Baker, I. H. Chaudry, H. O. Gaines, A. E. Baue, Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* **94**, 331-335 (1983).
182. P. A. Ward, Role of the complement in experimental sepsis. *Journal of leukocyte biology* **83**, 467-470 (2008).
183. P. A. Ward, The harmful role of c5a on innate immunity in sepsis. *Journal of innate immunity* **2**, 439-445 (2010).
184. K. Høgåsen, T. E. Mollnes, P. Brandtzaeg, Low levels of vitronectin and clusterin in acute meningococcal disease are closely associated with formation of the terminal-complement complex and the vitronectin-thrombin-antithrombin complex. *Infection and immunity* **62**, 4874-4880 (1994).
185. T. Sprong *et al.*, Inhibition of C5a-induced inflammation with preserved C5b-9-mediated bactericidal activity in a human whole blood model of meningococcal sepsis. *Blood* **102**, 3702-3710 (2003).
186. N. K. Banda, K. Takahashi, Analysis of the complement activation in mice. *Methods Mol Biol* **1100**, 365-371 (2014).
187. I. Celik *et al.*, Role of the Classical Pathway of Complement Activation in Experimentally Induced Polymicrobial Peritonitis. *Infection and immunity* **69**, 7304-7309 (2001).
188. M. J. Krisinger *et al.*, Thrombin generates previously unidentified C5 products that support the terminal complement activation pathway. *Blood* **120**, 1717-1725 (2012).
189. M. S. Huber-Lang *et al.*, Complement-induced impairment of innate immunity during sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **169**, 3223-3231 (2002).
190. A. Bengtson, M. Heideman, Anaphylatoxin formation in sepsis. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* **123**, 645-649 (1988).
191. D. H. Hangen *et al.*, Adult respiratory distress syndrome. A live E coli septic primate model. *The American journal of pathology* **126**, 396-400 (1987).
192. R. S. Keshari *et al.*, Inhibition of complement C5 protects against organ failure and reduces mortality in a baboon model of Escherichia coli sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, E6390-E6399 (2017).
193. M. Bosmann, J. V. Sarma, G. Atefi, F. S. Zetoune, P. A. Ward, Evidence for anti-inflammatory effects of C5a on the innate IL-17A/IL-23 axis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 1640-1651 (2012).
194. S. Ruiz *et al.*, Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. *Intensive Care Medicine Experimental* **4**, 22 (2016).
195. A. Bauhofer *et al.*, Granulocyte colony-stimulating factor but not peritoneal lavage increases survival rate after experimental abdominal contamination and infection. *The British journal of surgery* **89**, 1457-1464 (2002).
196. S. Seemann, F. Zohles, A. Lupp, Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *Journal of biomedical science* **24**, 60 (2017).

197. T. E. Mollnes *et al.*, Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood* **100**, 1869-1877 (2002).
198. F. G. Mackinnon, A. R. Gorringer, S. G. Funnell, A. Robinson, Intranasal infection of infant mice with Neisseria meningitidis. *Microbial pathogenesis* **12**, 415-420 (1992).
199. K. Yi, D. S. Stephens, I. Stojiljkovic, Development and evaluation of an improved mouse model of meningococcal colonization. *Infection and immunity* **71**, 1849-1855 (2003).
200. M. L. Zarantonelli *et al.*, Transgenic mice expressing human transferrin as a model for meningococcal infection. *Infection and immunity* **75**, 5609-5614 (2007).
201. D. M. Vu *et al.*, Enhanced Bacteremia in Human Factor H Transgenic Rats Infected by Neisseria meningitidis. *Infection and immunity* **80**, 643-650 (2012).
202. V. P. Ferreira, M. K. Pangburn, C. Cortés, Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Molecular immunology* **47**, 2187-2197 (2010).
203. J. M. Alonso *et al.*, A model of meningococcal bacteremia after respiratory superinfection in influenza A virus-infected mice. *FEMS Microbiol Lett* **222**, 99-106 (2003).
204. T. Werfel *et al.*, CD88 antibodies specifically bind to C5aR on dermal CD117+ and CD14+ cells and react with a desmosomal antigen in human skin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **157**, 1729-1735 (1996).
205. R. M. Brodbeck *et al.*, Identification and characterization of NDT 9513727 [N,N-bis(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-1-butyl-2,4-diphenyl-1H-imidazole-5-methanamine], a novel, orally bioavailable C5a receptor inverse agonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **327**, 898-909 (2008).
206. H. Qu, D. Ricklin, J. D. Lambris, Recent Developments in Low Molecular Weight Complement Inhibitors. *Molecular immunology* **47**, 185-195 (2009).
207. M. Huber-Lang *et al.*, Role of C5a in multiorgan failure during sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **166**, 1193-1199 (2001).
208. M. A. Flierl, H. Schreiber, M. S. Huber-Lang, The role of complement, C5a and its receptors in sepsis and multiorgan dysfunction syndrome. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research* **19**, 255-265 (2006).
209. N. C. Riedemann *et al.*, Regulation by C5a of neutrophil activation during sepsis. *Immunity* **19**, 193-202 (2003).
210. C. M. Karsten *et al.*, Monitoring and cell-specific deletion of C5aR1 using a novel floxed GFP-C5aR1 reporter knock-in mouse. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **194**, 1841-1855 (2015).
211. A. Dahdah *et al.*, Mast cells aggravate sepsis by inhibiting peritoneal macrophage phagocytosis. *The Journal of clinical investigation* **124**, 4577-4589 (2014).
212. M. Djaldetti, E. van der Lijn, I. Notti, Ultrastructural observations on mast cell degranulation and its prevention. *Nouvelle revue française d'hématologie* **21**, 185-196 (1979).
213. E. Siddall, M. Khatri, J. Radhakrishnan, Capillary leak syndrome: etiologies, pathophysiology, and management. *Kidney international* **92**, 37-46 (2017).

214. S. Madoiwa, Recent advances in disseminated intravascular coagulation: endothelial cells and fibrinolysis in sepsis-induced DIC. *Journal of Intensive Care* **3**, 8 (2015).
215. H. Muth *et al.*, Pro- and antifibrinolytic properties of human pulmonary microvascular versus artery endothelial cells: impact of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *Critical care medicine* **32**, 217-226 (2004).
216. Y. Suzuki, H. Mogami, H. Ihara, T. Urano, Unique secretory dynamics of tissue plasminogen activator and its modulation by plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells. *Blood* **113**, 470-478 (2009).
217. M. W. Boehme *et al.*, Release of thrombomodulin from endothelial cells by concerted action of TNF-alpha and neutrophils: in vivo and in vitro studies. *Immunology* **87**, 134-140 (1996).
218. D. J. Angelini *et al.*, TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **291**, L1232-1245 (2006).
219. K. Dahlke *et al.*, Distinct Different Contributions of the Alternative and Classical Complement Activation Pathway for the Innate Host Response during Sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **186**, 3066-3075 (2011).
220. R. L. Castillo, R. Carrasco Loza, C. Romero-Dapueto, Pathophysiological Approaches of Acute Respiratory Distress syndrome: Novel Bases for Study of Lung Injury. *The Open Respiratory Medicine Journal* **9**, 83-91 (2015).
221. M. J. Scott *et al.*, Vaccinia virus complement control protein increases early bacterial clearance during experimental peritonitis. *Surgical infections* **4**, 317-326 (2003).
222. J. A. Buras *et al.*, Inhibition of C5 or absence of C6 protects from sepsis mortality. *Immunobiology* **209**, 629-635 (2004).
223. V. M. Ranieri *et al.*, Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *Jama* **307**, 2526-2533 (2012).
224. Y. Chen, W. G. Junger, Measurement of Oxidative Burst in Neutrophils. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **844**, 115-124 (2012).
225. L. Spötl, A. Sarti, M. P. Dierich, J. Most, Cell membrane labeling with fluorescent dyes for the demonstration of cytokine-induced fusion between monocytes and tumor cells. *Cytometry* **21**, 160-169 (1995).
226. H. S. Kuehn, M. Radinger, A. M. Gilfillan, Measuring Mast Cell Mediator Release. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* CHAPTER, Unit7.38-Unit37.38 (2010).
227. N. K. Iversen, H. Malte, E. Baatrup, T. Wang, The normal acid-base status of mice. *Respiratory physiology & neurobiology* **180**, 252-257 (2012).
228. Z. Qi *et al.*, Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *American journal of physiology. Renal physiology* **286**, F590-596 (2004).
229. I. Fernández, A. Peña, N. D. Teso, V. Pérez, J. Rodríguez-Cuesta, Clinical Biochemistry Parameters in C57BL/6J Mice after Blood Collection from the Submandibular Vein and Retroorbital Plexus. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* **49**, 202-206 (2010).

230. H. Sumichika *et al.*, Identification of a potent and orally active non-peptide C5a receptor antagonist. *The Journal of biological chemistry* **277**, 49403-49407 (2002).
231. E. B. Staab, S. D. Sanderson, S. M. Wells, J. A. Poole, Treatment with the C5a Receptor/CD88 Antagonist PMX205 Reduces Inflammation in a Murine Model of Allergic Asthma. *International immunopharmacology* **21**, 293-300 (2014).
232. U. Jain, T. M. Woodruff, A. W. Stadnyk, The C5a receptor antagonist PMX205 ameliorates experimentally induced colitis associated with increased IL-4 and IL-10. *British journal of pharmacology* **168**, 488-501 (2013).
233. M. I. Fonseca *et al.*, Treatment with a C5aR Antagonist Decreases Pathology and Enhances Behavioral Performance in Murine Models of Alzheimer's Disease(). *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **183**, 1375-1383 (2009).
234. T. M. Woodruff *et al.*, The complement factor C5a contributes to pathology in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **181**, 8727-8734 (2008).
235. K. D. Beck *et al.*, Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain* **133**, 433-447 (2010).
236. A. J. Strachan, T. M. Woodruff, G. Haaima, D. P. Fairlie, S. M. Taylor, A new small molecule C5a receptor antagonist inhibits the reverse-passive Arthus reaction and endotoxic shock in rats. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **164**, 6560-6565 (2000).
237. J. Kohl, Drug evaluation: the C5a receptor antagonist PMX-53. *Current opinion in molecular therapeutics* **8**, 529-538 (2006).
238. C. E. Vergunst *et al.*, Blocking the receptor for C5a in patients with rheumatoid arthritis does not reduce synovial inflammation. *Rheumatology (Oxford, England)* **46**, 1773-1778 (2007).
239. H. Xiao *et al.*, C5a receptor (CD88) blockade protects against MPO-ANCA GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **25**, 225-231 (2014).
240. P. Bekker *et al.*, Characterization of Pharmacologic and Pharmacokinetic Properties of CCX168, a Potent and Selective Orally Administered Complement 5a Receptor Inhibitor, Based on Preclinical Evaluation and Randomized Phase 1 Clinical Study. *PloS one* **11**, e0164646 (2016).
241. D. R. W. Jayne *et al.*, Randomized Trial of C5a Receptor Inhibitor Avacopan in ANCA-Associated Vasculitis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **28**, 2756-2767 (2017).
242. <http://ir.chemocentryx.com/static-files/3cf691b5-dfd9-4aa4-b398-41e31fa6bdb6> (Zugriff am 13.11.2018)
243. M. Cao *et al.*, Eculizumab Modifies Outcomes in Adults with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome with Acute Kidney Injury. *American journal of nephrology* **48**, 225-233 (2018).
244. J. Holle *et al.*, Outcome of membranoproliferative glomerulonephritis and C3-glomerulopathy in children and adolescents. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **33**, 2289-2298 (2018).
245. E. Benamu, J. G. Montoya, Infections associated with the use of eculizumab: recommendations for prevention and prophylaxis. *Current opinion in infectious diseases* **29**, 319-329 (2016).

246. S. Sun *et al.*, Treatment with anti-C5a antibody improves the outcome of H7N9 virus infection in African green monkeys. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **60**, 586-595 (2015).
247. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02246595> (Zugriff am 13.11.2018)
248. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03487276> (Zugriff am 13.11.2018)
249. S. Paglialunga *et al.*, Reduced adipose tissue triglyceride synthesis and increased muscle fatty acid oxidation in C5L2 knockout mice. *The Journal of endocrinology* **194**, 293-304 (2007).

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|--|
| AK | Antikörper |
| AG | Antigen |
| BHI | Brain Heart Infusion, Nährmedium |
| CFU/KBE | colony forming unit / koloniebildende Einheit |
| C3 ^{-/-} | C3-knockout-Maus (B6.129S4-C3 ^{tm1Crr} /J) |
| C3a | Komplementspaltfragment und Anaphylatoxin |
| C3aR | C3a-Rezeptor |
| C5a | Komplementspaltfragment und Anaphylatoxin |
| C5aR1 | C5a-Rezeptor 1 (Synonym: CD88) |
| C5aR2 | C5a-Rezeptor 2 (Synonyme: C5L2, GPR77) |
| C5aR1 ^{-/-} | C5a-Rezeptor-knockout-Maus (B6.129S4-C5ar1 ^{tm1Cge} /J) |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| EtOH | Ethanol |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff |
| HE | Hämatoxylin-Eosin-Färbung |
| IF | Immunofluoreszenzfärbung |
| IMD | Invasive Meningokokkenerkrankungen |
| i. p. | intraperitoneal |
| i. v. | intavenös |
| IVC | individuell ventiliertes Käfigsystem |
| KG | Körpergewicht |
| MAK | Membranangriffskomplex |
| MeOH | Methanol |
| <i>Nme</i> | <i>Neisseria meningitidis</i> |
| PBS | 1x phosphate buffered saline, Pufferlösung |
| PBS/T | 0,05% Tween-20 in 1xPBS (pH 7,4) |
| PL | Peritoneallavage |
| PMN | Polymorphonuclear leukocytes, Granulozyten |
| rpm | revolutions per minute (Drehzahl/Minute) |
| RT | Raumtemperatur (ca. 22°C) |
| SIRS | Systemic Inflammatory Response Syndrom, „Zytokinsturm“ |
| WT | Wildtyp Maus |

7.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Laborgeräte | 17 |
| Tabelle 2: Erworbene Verbrauchsmaterialien | 18 |
| Tabelle 3: Chemikalien | 19 |
| Tabelle 4: Reaktionskits | 20 |
| Tabelle 5: Antikörper | 20 |
| Tabelle 6: Lösungen aus Eigenherstellung | 20 |
| Tabelle 7: Seren | 21 |
| Tabelle 8: Scoring Schema | 26 |
| Tabelle 9: Puffer und Proben für C3a- und C5a-ELISA | 29 |
| Tabelle 10: Puffer und Proben für in TNF-α-, IL-6- und KC/CXCL1-ELISA | 30 |
| Tabelle 11: Puffer und Proben für ELISA des „C5a in vivo capture assay“ | 31 |

7.3 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---------------------------|----|
| Abbildung 1 | 5 |
| Abbildung 2 | 32 |
| Abbildung 3 | 38 |
| Abbildung 4 | 40 |
| Abbildung 5 | 42 |
| Abbildung 6 | 44 |
| Abbildung 7 | 46 |
| Abbildung 8 | 49 |
| Abbildung 9 | 50 |
| Abbildung 10 | 51 |
| Abbildung 11 | 53 |
| Abbildung 12 | 54 |
| Abbildung 13 | 55 |
| Abbildung 14 | 57 |
| Abbildung 15 | 60 |

Danksagung

Viele Menschen haben ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet. An dieser Stelle möchte ich einigen von ihnen meinen besonderen Dank aussprechen. Zuallererst bedanke ich mich herzlich bei Herrn Professor Dr. med. Matthias Frosch, welcher mir, in seiner Position als Vorstand des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie ein hervorragendes Forschungsumfeld ermöglicht hat.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei meiner Doktormutter Frau Professor Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir bedanken, welche mich für die Mikrobiologie begeistern konnte und welche die Entwicklung dieser Arbeit stets überwachte.

Große Wertschätzung gilt zudem meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Kay Johswich für die enge Begleitung, die stete Motivation, die wertvollen Gedankenanstöße und die unendliche Geduld mit mir. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Lea Strobel danke ich von ganzem Herzen für ihre Hilfsbereitschaft, ihre kreativen Ideen und ihre Begleitung im Laboralltag. Allen Mitgliedern der AG Johswich danke ich außerdem für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre, es war eine wunderbare Zeit mit Euch. Herzlicher Dank gilt auch den Tierpflegern Rainer Brandner und Günter Troll, welche immer ein Auge auf unsere Versuchstiere hatten.

Darüber hinaus danke ich meinen Eltern von ganzem Herzen, die mir das Studium ermöglichten und welche mich während der Promotion in jeder Situation unterstützten.

Schließlich gilt mein aufrichtiger Dank der Graduiertenschule für Lebenswissenschaften (GSLs) der Universität Würzburg, welche mich in meinem Promotionsvorhaben mit einem Stipendium unterstützt hat. In Ihrer Funktion als GSLs-Betreuer bin ich Frau Professor Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir, Herrn Dr. rer. nat. Kay Johswich, Herrn Dr. rer. nat. Martin Fraunholz und Herrn Professor Dr. med. Hartwig Klinker für deren hilfreichen Anregungen sehr dankbar.

Publikationsliste

- 09/2015 J. Herrmann, L. Strobel, T. Woodruff, A. Klos, M. Frosch, K. Johswich
The detrimental role of C5aR in meningococcal sepsis
67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Münster (Vortrag)
- 10/2015 J. Herrmann, L. Strobel, S. Herrmann, T. Woodruff, A. Klos, M. Frosch, K.O. Johswich
Role of complement C5a-Receptor 1 in pathophysiology of meningococcal sepsis
Posterbeitrag, 10. Internationales EUREKA Symposium, Würzburg
- 06/2016 J. Herrmann, M. Münstermann, L. Strobel, T. Woodruff, A. Klos, M. Frosch, K. Johswich
The detrimental role of C5aR in meningococcal sepsis
13. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin (KIT), Würzburg (Vortrag)
- 09/2016 J. Herrmann, M. Münstermann, L. Strobel, T. Woodruff, A. Klos, M. Frosch, K. Johswich
The detrimental role of C5aR in meningococcal sepsis
20. International Pathogenic Neisseria Conference (IPNC), Manchester (Vortrag)
- 01/2018 J.B. Herrmann, M. Muenstermann, L. Strobel, A. Schubert-Unkmeir, T.M. Woodruff, S.D. Gray-Owen, A. Klos, K.O. Johswich
Complement C5a Receptor 1 Exacerbates the Pathophysiology of N. meningitidis Sepsis and Is a Potential Target for Disease Treatment.
MBio. 2018 Jan 23
- 09/2018 M. Muenstermann, J.B. Herrmann, L. Strobel, A. Schubert-Unkmeir, T. Woodruff, A. Klos, R. Wetsel, C. Gerard, J. Köhl, K. Johswich
The distinct roles of the anaphylatoxin receptors C5aR1, C5aR2 and C3aR during experimental meningococcal disease. 21. International Pathogenic Neisseria Conference (IPNC), Pacific Grove (Vortrag)

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Role of complement C5a-Receptor 1 in Pathophysiology of Meningococcal Sepsis“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of an other examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, December 13, 2018

Johannes Bernd Herrmann

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Rolle des Komplement C5a-Rezeptors 1 in der Pathophysiologie der Meningokokken-Sepsis" eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 13.12.2018

Johannes Bernd Herrmann