

Die Rolle der löslichen Glykosaminoglykane bei akuten Lungenerkrankungen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sauer, Agnes

aus Görlitz

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

„Center for Infection and Genomics of the Lung“ (CIGL)

Gutachterin: Prof. Dr. Małgorzata Wygrecka

Gutachter: Apl. Prof. Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation:

06.06.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Pneumonie	1
1.1.1 Einteilung der Pneumonie	1
1.1.2 Pathogenese der Pneumonie	3
1.1.3 Therapie der Pneumonie	4
1.2 Acute Respiratory Distress Syndrome	5
1.2.1 Die Berlin Definition	5
1.2.2 Pathogenese des ARDS	6
1.2.3 Therapie des ARDS	7
1.3 Die endotheliale Glykokalyx	8
1.3.1 Aufbau und Bestandteile der endothelialen Glykokalyx	8
1.3.2 Funktion der endothelialen Glykokalyx	9
1.3.3 Hyaluronan	10
1.4 Veränderungen der endothelialen Glykokalyx bei Inflammation	12
1.5 Endotheliale Glykokalyx der Lungengefäße	13
2. Fragestellung	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Material	16
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
3.1.2 Reagenzien	18
3.1.3 Puffer	21
3.1.4 Kits	22

3.2 Methoden	23
3.2.1 Probenmaterial	23
3.2.1.1 Humanes EDTA-Plasma	23
3.2.1.2 Eigenschaften der Patienten- und Kontrollkohorten	25
3.2.1.3 Humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge und Zellkultur	27
3.2.2 Stimulation der HPMEC mit Pneumolysin	27
3.2.3 Behandlung von HPMEC mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	27
3.2.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	28
3.2.4.1 ELISA Hyaluronan.....	28
3.2.4.2 ELISA Tumornekrosefaktor- α	29
3.2.5 Analyse der Hyaluronan-Fragmente im EDTA-Plasma und Zellmedium	31
3.2.5.1 Hyaluronan Reinigung.....	31
3.2.5.2 Dünnschichtchromatographie.....	31
3.2.6 Multiplex Assay.....	32
3.2.7 Laktatdehydrogenase-Aktivität	33
3.2.8 Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)	33
3.2.9 Realtime-Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	34
3.2.9.1 Isolierung der RNA aus humanen Endothelzellen.....	34
3.2.9.2 Synthese der cDNA.....	35
3.2.9.3 Realtime-Polymerasekettenreaktion	36
3.2.10 Hyaluronidase Activity Assay	38
3.2.11 Fluoreszenz Mikroskopische Darstellungen der HPMEC	39
3.2.11.1 VE-Cadherin Färbung	39
3.2.11.2 Färbung von Hyaluronan.....	39

3.2.11.3 MitoSOX Red Färbung und Messung der reaktiven Sauerstoffspezies in HPMEC	40
3.2.11.4 Mikroskopische Darstellung	40
3.2.11.5 Verarbeitung und Analyse der Bilder.....	41
3.2.12 Elektronenmikroskopie (EM)	42
3.2.13 Statistik	43
4. Ergebnisse	44
4.1 HA-Plasmakonzentration bei CAP und ARDS erhöht - Korrelation mit Schweregrad und Outcome der Erkrankung.....	44
4.2 Die Größe der HA-Fragmente ist mit dem Schweregrad der Lungenerkrankung assoziiert	48
4.3 Die HA-Plasmakonzentration korreliert mit IL-6 und Proteinen der Endothelzellaktivierung und Basalmembraninstabilität.....	50
4.4 Pneumolysin hat Einfluss auf die HA-Konzentration und Länge der HA-Fragmente im Zellmedium von HPMEC	52
4.5 Pneumolysin hat keinen Einfluss auf die Endothelbarriere/Zellintegrität von HPMEC	55
4.6 Die HA-Freisetzung durch Pneumolysin erfolgt nicht-enzymatisch	58
4.7 Pneumolysin verursacht HA-Abbau aus der Glykokalyx von HPMEC.....	62
5. Diskussion	64
5.1 Gelöstes HA im Plasma von CAP- und ARDS-Patienten.....	64
5.2 Der Einfluss von Pneumolysin auf den HA-Abbau	67
5.3 Limitation der Arbeit	70
6. Schlussfolgerung	72
7. Zusammenfassung.....	74

8. Summary	76
9. Abkürzungsverzeichnis	78
10. Tabellenverzeichnis	80
11. Abbildungsverzeichnis	81
12. Literaturverzeichnis	82
13. Publikationsverzeichnis	96
14. Ehrenwörtliche Erklärung	97
15. Danksagung	98

1. Einleitung

1.1 Pneumonie

Eine akute Entzündung der unteren Atemwege oder des Lungenparenchyms wird als Pneumonie bezeichnet. Die klinischen Symptome reichen von Fieber und allgemeinem Unwohlsein bis hin zu Husten und Dyspnoe ^{76,77,101}. Der häufigste Erreger der bakteriellen Lungenentzündung ist *Streptococcus pneumoniae* (*S.p.*) ¹⁰⁹. Pneumokokken sind grampositive Diplokokken, welche neben Pneumonie auch Otitis media, Bakteriämie und Meningitis verursachen ¹³. Die Virulenz von *S.p.* wird durch verschiedene Faktoren, wie beispielsweise seine Polysaccharidkapsel, verschiedene Oberflächenproteine und -enzyme und das Toxin Pneumolysin (PLY), bestimmt ⁸⁶. Einen wichtigen Einfluss auf die Pathogenese der Pneumonie scheint dabei insbesondere PLY zu haben, das eine frühe Zerstörung der Alveolar-Kapillar-Barriere bewirkt ¹⁰⁷. Weitere bakterielle Erreger der Pneumonie sind unter anderem *Mycoplasma pneumoniae* (*M.p.*), *Haemophilus influenzae* (*H.i.*), *Chlamydophila pneumoniae* (*C.p.*), *Staphylococcus aureus* (*S.a.*) und *Legionella spp.* ^{11,76,137}. Häufige virale Erreger sind Influenza-, Respiratory Syncytial-, Adeno-, Parainfluenza- und Corona-Viren ^{58,73}. Bei der Diagnostik der Pneumonie spielen neben der typischen Klinik und laborchemischen Parametern die Röntgen-Diagnostik eine wichtige Rolle. Typische Komplikationen einer Pneumonie können Pleuraergüsse, bis hin zur Entstehung eines Pleuraempyems, und Lungenabszesse sein ¹⁰⁴. Bei besonders schweren Fällen kann es durch die akute Schädigung des Lungengewebes zu einem akuten Atemnotsyndrom kommen, dem sogenannten Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) ^{115,130}.

1.1.1 Einteilung der Pneumonie

Es gibt verschiedene Varianten nach denen die Pneumonie klassifiziert wird. So kann zum einen nach dem Ort der Entzündung beziehungsweise der radiologischen Erscheinungsform in Lobär-, Broncho- und interstitielle Pneumonie eingeteilt werden ^{104,124}. Die Lobärpneumonie entsteht in den distalen Lufträumen und breitet sich von da über Kollateralen in die benachbarten Lungenabschnitte aus. Ihr homogenes Muster erstreckt sich teilweise oder ganz über ein Lungensegment, gelegentlich auch über einen ganzen Lungenlappen. Typisch für die Lobärpneumonie ist, dass die Atemwege primär nicht betroffen sind und im radiologischen Bild so ein positives Bronchopneumogramm erkennbar ist ^{39,61}. Typischerweise wird sie durch eine ambulant

erworbene Infektion mit *S.p.* ausgelöst¹²⁴. Die Bronchopneumonie wird häufig durch Aspiration hervorgerufen und ist somit mit nosokomialen Infektionen durch *S.a.* und gramnegative Bakterien assoziiert. Lokalisiert ist sie typischerweise in mehreren Krankheitsherden, insbesondere jedoch in den distalen Atemwegen. Radiologisch präsentiert sich die Bronchopneumonie dadurch mit mehreren heterogenen Trübungen über den Atemwegen. Da diese betroffen sind, ist kein Bronchopneumogramm erkennbar^{39,116}. Eine interstitielle Pneumonie wird beispielsweise durch Mycoplasmen, Viren oder Pneumocystis hervorgerufen. Das typische Muster entsteht durch Ödeme und zelluläre Infiltrate im interstitiellen Gewebe. Im Röntgenbild erkennt man retikuläre und retikonoduläre Muster^{39,124}. Die interstitielle Pneumonie spiegelt das röntgenologische Bild der atypischen Pneumonie wider¹²⁴.

Nach dem Erregertyp und der vorherrschenden Klinik kann zudem in typische und atypische Pneumonie eingeteilt werden. Eine atypische Pneumonie ist durch das Vorhandensein einer interstitiellen Pneumonie, durch atypische Erreger, wie Viren, Mycoplasmen, Chlamydien und Legionellen, sowie durch schwächere klassische Symptome geprägt⁸⁷. Die typische Pneumonie erfolgt charakteristischerweise durch eine Infektion mit klassischen bakteriellen Erregern, welche sich mittels Gram-Färbung darstellen und durch Standardmethoden in Kultur anzüchten lassen. *S.p.* ist dabei der häufigste Erreger. Des Weiteren ist eine typische Pneumonie durch klassische Symptome und Untersuchungsbefunden bei der Auskultation und Perkussion gekennzeichnet⁷⁶.

Die für die Behandlung und Prognose wichtigste Aufteilung erfolgt jedoch nach dem Ort des Erwerbens. Hierbei wird in ambulant erworbene Pneumonie (community-acquired pneumonia, CAP), nosokomial erworbene Pneumonie (hospital-acquired pneumonia, HAP), beatmungs-assoziierte Pneumonie (ventilator-associated pneumonia, VAP), und zum Teil auch in Pflege-assoziierte Pneumonie (healthcare-associated pneumonia, HCAP) unterschieden^{60,65}. Für den klinischen Alltag hat die Trennung in CAP und HAP hierbei die größte Bedeutung. Von einer HAP spricht man definitionsgemäß, wenn die Infektion frühestens 48 Stunden nach Hospitalisierung auftritt. Neben *S.p.* kommen vor allem gramnegative Erreger, wie Enterobacteriaceae und *Pseudomonas aeruginosa*, sowie Staphylokokken als häufige Erreger der HAP vor⁴³. CAP-Patienten haben ihre Lungenentzündung außerhalb des Krankenhauses erworben. Hier spielen die klassischen Pneumonie-Erreger wie *S.p.*, *M.p.* und *H.i.* eine Rolle⁸⁴. Zur Entscheidung über die Notwendigkeit einer stationären Behandlung dieser Patienten wird der CRB-65 oder CURB-65 Score verwendet^{24,71}. Es wird jeweils ein Punkt für das Vorhandensein

von Bewusstseinstäubung, den Anstieg des Serum-Harnstoffs über 7 mmol/l (19,6 mg/dl), den Anstieg der Atemfrequenz über 30 /min, die Senkung des diastolischen Blutdrucks unter 60 mmHg oder des systolischen Blutdrucks unter 90 mmHg und das Alter des Patienten über 65 Jahre vergeben. Trifft keiner der genannten Punkte zu, so kann die Behandlung der Pneumonie ambulant erfolgen. Ab einem Punkt ist eine stationäre Behandlung indiziert. Je höher die erreichte Gesamtpunktzahl, desto mehr steigt das Komplikationsrisiko. Ab drei Punkten sollte zudem die Behandlung auf einer Intensivstation (ITS) erwogen werden ⁵⁹.

1.1.2 Pathogenese der Pneumonie

Für die Pathogenese der Pneumonie müssen die Erreger in die Alveolen der Lunge gelangen. Dies kann über Inhalation, Aspiration, direkte Inokulation oder hämatogene Ausbreitung geschehen. Im Nasenrachenraum werden die Pathogene durch Nasenhaare, die Nasenmuscheln und intakte Würge- und Hustenreflexe vom weiteren Eindringen in den Organismus abgehalten. Die verzweigten Tracheobronchialbäume mit ihrer mukoziliären Clearance stellen ebenfalls effiziente Schutzmechanismen dar ⁷⁶. Beim Eintritt in die Alveolen werden die Pathogene zudem meist durch residente Alveolarmakrophagen und Surfactant A und D abgewehrt ^{67,79}. Scheitern diese Abwehrmechanismen, so kommt es zur Entzündungsreaktion ⁷⁶. Ob es zu einer Progression kommt, hängt insbesondere von der Virulenz des eingedrungenen Pathogens, der Immunlage des Wirts und der Aspirationsmenge sowie -frequenz ab ¹¹⁰. Die wichtigsten Risikofaktoren einer Pneumonie stellen ein hohes Alter und das Vorhandensein von Komorbiditäten, wie chronische respiratorische, kardiovaskuläre oder renale Vorerkrankungen, dar. Ebenso sind Nikotin- und Alkoholabusus, Mangelernährung und schlechte Zahnhygiene Risikofaktoren bei der Entstehung einer Lungenentzündung ^{23,35,129}. Die Entzündungsreaktion ist vor allem charakterisiert durch Zytokinausschüttung und führt zu den typischen Symptomen der Pneumonie. So tragen Entzündungsmediatoren wie Interleukin (IL) 1 und 8, Tumornekrosefaktor (TNF) und Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor zu der Entstehung von Fieber und der Freisetzung und Anheftung von Neutrophilen in der Lunge bei. Es kann zur Bildung eines alveolärkapillären Lecks kommen, was durch den Einstrom von Flüssigkeit in die Alveolen zu Hypoxämie führt ^{20,32,76}. Man unterscheidet vier Phasen der Pneumonie, je nach vorliegenden Veränderungen des Lungenparenchyms. Zuerst kommt es zur Entstehung eines Lungenödems, welches durch proteinreiche Exsudate in den Alveolen hervorgerufen wird. Nach der sogenannten Phase der roten Hepatisierung, welche durch

das Vorhandensein vieler Erythrozyten gekennzeichnet ist, folgt die Phase der grauen Hepatisierung. Hier kommt es zur Lyse und Abbau der Erythrozyten sowie zur vermehrten Ablagerung von Fibrin und Neutrophilen. In der letzten Phase, der Auflösungsphase, beseitigen Makrophagen alle Überbleibsel der Entzündungsreaktion und die Inflammation geht allmählich zurück^{76,81}.

1.1.3 Therapie der Pneumonie

Bei der Therapie der Pneumonie spielt, neben supportiven Maßnahmen, wie körperliche Schonung, Physiotherapie, Flüssigkeitsaufnahme, Gabe von Antipyretika und Antitussiva, sowie Sauerstoffgabe bei Hypoxie, insbesondere die Antibiotikatherapie eine wichtige Rolle³⁴. Die Wahl des richtigen Antibiotikums ist dabei von entscheidender Bedeutung. Sie richtet sich sowohl nach der Schwere als auch der Ursache der Erkrankung¹². Für die Auswahl ist insbesondere die Differenzierung zwischen CAP und HAP entscheidend. Die Unterteilung des Schweregrades erfolgt durch den CURB-65 bzw. CRB-65 Score und das Vorhandensein einer ausreichenden Oxygenierung. Bei CAP wird, je nach Schweregrad, vor allem auf Aminopenicillin mit oder ohne β -Lactamase Inhibitor, Cephalosporine der zweiten oder dritten Generation oder Piperacillin/Tazobactam zurückgegriffen. Makrolide, insbesondere Azithromycin, können zusätzlich atypische Erreger abdecken und durch ihre immunmodulatorischen Effekte von Nutzen sein³⁴. Bei nosokomialen Pneumonien ist die kalkulierte Antibiotikatherapie durch das Wissen über wahrscheinliche Erregerspektren von besonders hoher Bedeutung, um der Entstehung neuer gefährlicher Resistenzen entgegenzuwirken. Patienten ohne Risikofaktoren für multiresistente Keime werden entweder mit Aminopenicillinen mit β -Lactamase-Inhibitor oder Cephalosporinen der Gruppe 3a oder Fluorchinolonen der Gruppe 3 oder 4 therapiert. Liegt jedoch der Verdacht auf das Vorhandensein von multiresistenten Erregern oder ein Patient mit septischen Schock vor, so wird auf pseudomonaswirksame β -Lactame, wie Piperacillin + Tazobactam, Meropenem oder Cefepim, zurückgegriffen. Bei lebensbedrohlichen nosokomialen Pneumonien wird zudem ein zusätzlicher Kombinationspartner je nach vermutetem multiresistentem Erreger gegeben. Bei Verdacht auf Pseudomonas oder multiresistente gramnegative Erreger handelt es sich dabei um Fluorchinolone der Gruppe 2 oder 3, alternativ Aminoglykoside. Bei Verdacht auf Methicillin resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) wird zusätzliche mit Linezolid oder Vancomycin therapiert²⁵.

1.2 Acute Respiratory Distress Syndrome

ARDS ist eine vielschichtige Erkrankung, bei der es durch die Reaktion der Lunge auf schädliche Faktoren zu einer akuten Lungenschädigung kommt. Diese ist gekennzeichnet durch schwere Hypoxämie und verminderte Compliance der Lunge⁵. Die Symptome eines ARDS sind klinisch durch die zunehmende Hypoxie und verminderter Compliance der Lunge gekennzeichnet⁸⁵. Beginnend mit subjektiver Luftnot, Unruhe und Tachykardie kann sich binnen weniger Tage eine zunehmende Erschöpfung durch die übermäßige Atemarbeit entwickeln. Die Patienten sind geprägt von Zyanose, ausgeprägter Dyspnoe und auskultatorisch feinblasigen Rasselgeräuschen über der Lunge¹⁰⁸. In fortgeschrittenerem Stadium ist die alveoläre Gasaustauschfläche schließlich, aufgrund des Vorhandenseins von Mikrothromben in den Lungenkapillaren, massiv reduziert und es kommt zunehmend zur Totraumventilation⁵. Eine maschinelle Beatmung ist meistens unumgänglich³⁶. ARDS ist eine schwerwiegende Erkrankung mit hoher Letalität⁹⁶. Auch Überlebende tragen oft beachtliche physische und psychische Spätfolgen mit sich^{26,42,53,95}.

1.2.1 Die Berlin Definition

Die gebräuchlichste Definition des ARDS ist die Berlin Definition¹⁰². Sie wurde 2012 von der European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) veröffentlicht. Vier Punkte sind für diese Definition von Bedeutung: zeitlicher Verlauf, radiologisches Bild, Ursache der pulmonalen Infiltrate und Oxygenierung. Für den zeitlichen Verlauf gilt, dass die Lungenschädigung akut innerhalb einer Woche nach einem bekannten Ereignis aufgetreten sein muss oder vorherige respiratorische Symptome sich verschlimmert haben müssen. Im typischen radiologischen Bild eines ARDS sind beidseitige diffuse Infiltrate im Röntgen-Thorax sichtbar. Diese Infiltrate dürfen sich jedoch nicht durch Pleuraergüsse, Atelektasen oder Raumforderungen erklären lassen. Als Ursache der respiratorischen Insuffizienz müssen zudem kardiale Ursachen mittels Diagnostik ausgeschlossen werden. Für die Ermittlung der Oxygenierung dient der Horowitz Quotient. Dies ist der Quotient aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck ($p\text{aO}_2$) und inspiratorischer Sauerstofffraktion (F_{iO_2}), wobei der positive endexpiratorische Druck (PEEP) bei mindestens 5 cm H_2O liegen muss. Hierdurch lässt sich ARDS in drei Schweregrade einteilen. Bei einem Horowitz Quotienten zwischen 200 und 300 mmHg spricht man von mildem ARDS, zwischen 100 und 200 mmHg von moderatem und unter 100 mmHg von schwerem ARDS^{5,102}.

1.2.2 Pathogenese des ARDS

Die Ursachen für ARDS können in direkte und indirekte Lungenverletzungen eingeteilt werden. Zu den direkten Risikofaktoren zählen typischerweise Pneumonie, Lungenembolie, Aspiration, Lungenkontusion, Inhalationsverletzungen oder auch beinahe Ertrinken. Indirekte Risikofaktoren für eine Lungenverletzung stellen beispielsweise Sepsis mit extrapulmonalem Fokus, hämorrhagischer Schock, Pankreatitis, Verbrennungen oder auch Transfusionszwischenfälle dar ^{5,80}.

Der Krankheitsverlauf kann dabei in drei Phasen gegliedert werden. Die ersten sieben bis zehn Tage sind durch die Exsudative Phase geprägt. Sie kennzeichnet makroskopisch ödematöses Lungengewebe mit massiver Gewichtszunahme der Lunge und Abnahme des Luftgehalts ¹²⁷. Mikroskopisch ist diese Phase durch das zunehmende Vorhandensein von Neutrophilen, proteinreichen interstitiellen und intraalveolären Ödemen und den Verlust der Basalmembran (BM) bestimmt ^{80,136}. Bei einer alveolaren Schädigung durch oben genannte Risikofaktoren, werden Alveolarmakrophagen aktiviert und setzen proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8, frei ⁸⁰. Die Zytokine locken vermehrt Neutrophile und andere Immunzellen in die Lunge, welche durch die Freisetzung von toxischen Mediatoren das alveoläre und kapilläre Endothel zerstören und die vaskuläre Permeabilität erhöhen ¹⁰⁸. Die Steigerung der vaskulären endothelialen Permeabilität scheint hierbei insbesondere durch die Zerstörung der endothelialen Glykokalyx bedingt zu sein. Der Abbau dieser entsteht durch die freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren und Zytokine ⁴⁹. Große Proteine, und mit ihnen Flüssigkeit, strömen vermehrt durch das geschädigte Endothel in die Alveolen ein. Dies führt dazu, dass sich die Alveolen zunehmend mit blutiger, proteinreicher Flüssigkeit füllen – Lungenödeme entstehen ^{80,126,136}. Auch das Surfactant kann seiner schützenden Funktion den Alveolen gegenüber nicht mehr nachgehen ⁸⁰. Durch intravaskuläre Koagulation entstehen in den alveolären Kapillaren zunehmend Mikrothromben. Es kommt zur Nekrose von Pneumozyten Typ I und II ¹⁰⁸. Im Endeffekt führt diese massive Schädigung der Alveolen und die vorhandenen Lungenödeme dazu, dass der Gasaustausch und die Compliance der Lunge vermindert wird. Dies sind typische Zeichen von ARDS ^{80,126,127,136}. In den darauffolgenden zwei bis drei Wochen bildet sich makroskopisch ein diffus graues und festes Lungengewebe, welches mikroskopisch kapilläre Mikrothromben und eine beginnende Fibrosierung vorweist. Dies ist die Proliferative Phase ^{108,127}. Sie kennzeichnet den beginnenden Reparaturprozess der Lunge ¹⁰⁸. Verschiedene anti-inflammatorische Zytokine führen durch die Inaktivierung von Neutrophilen zur Apoptose und deren Phagozytose. Die

zuvor zerstörte epitheliale Auskleidung wird allmählich wiederhergestellt. Hierfür proliferieren vermehrt Pneumozyten Typ II und differenzieren sich zu Typ-I-Zellen⁸⁰. Die Ionenkanäle und Aquaporine der Alveolen regenerieren und transportieren die zuvor hineingeströmte Flüssigkeit aus den Alveolen zurück in die pulmonale Mikrozirkulation und Lymphbahnen. Durch Alveolarzellen und Makrophagen werden Zelltrümmer und andere Überreste entfernt und die Lunge regeneriert sich allmählich¹⁰⁸. Dieser Phase kann die Fibrotische Phase folgen. Sie ist gekennzeichnet durch anhaltende Inflammation, extreme Zerstörung der BM, permanente Lungenödeme, Fibrosierung und mikrovaskuläre Zerstörung^{80,127}. Es beginnt die sogenannte „Hepatisation“ der Lunge. Durch fibrinreiches Exsudat wird die Lunge derb und dunkelrot, und erhält somit eine leberartige Konsistenz. Das Lungengewebe ist mikroskopisch von verdickten Kapillarmembranen und einer generalisierten und irreversiblen Fibrose durchzogen. Es ist möglich, dass Scherkräfte, welche durch eine massive maschinelle Lungenbeatmung zustande kommen, der Entstehung dieser Phase zugrunde liegen. Bei einem weiteren Vorschreiten der Fibrotischen Phase, müssen die Patienten verlängert maschinell beatmet werden und sind zudem einer erhöhten Mortalität ausgesetzt¹⁰⁸.

1.2.3 Therapie des ARDS

Die Therapie dieser Erkrankung besteht fundamental aus zwei Säulen. Zum einen bedarf es der Behandlung der zugrundeliegenden Ursache und zum anderen einer Beatmungstherapie. Bei letzterem kann entweder eine High-Flow-Sauerstofftherapie oder Nicht-Invasive-Ventilation bei mildereren Verläufen sowie eine invasive Beatmung bei schweren Verläufen zum Einsatz kommen. Für die invasive Beatmung gilt das Grundprinzip der lungenprotektiven Beatmung. Hierbei werden beatmungsbedingte Lungenschäden, durch die Begrenzung des Atemhubvolumens und Beatmungsdrucks, sowie durch die Verwendung eines adäquaten PEEP, vermieden³⁷. Begleitende Therapien können die Lagerungstherapie, die Unterstützung des Herz-Kreislauf-Systems, zum Beispiel durch Katecholamin-Therapie, oder auch die Flüssigkeitstherapie mittels Entwässerung sein^{9,15,18}.

1.3 Die endotheliale Glykokalyx

Die luminalen Seite von Endothelzellen (EC) ist von einer gelartigen, kohlenhydratreichen Schicht überzogen – der endothelialen Glykokalyx (EG) ¹³⁸. Die Dicke der humanen EG reicht von 0,5 bis 5 µm. Ihre Komponenten interagieren stetig mit den verschiedenen Bestandteilen des Blutes und dessen Scherkräften. Je nach Organ, Gefäßbett und Blutflussrate unterscheidet sich die Schicht in ihrem Aufbau und ihrer Dicke ^{94,98,131}.

1.3.1 Aufbau und Bestandteile der endothelialen Glykokalyx

Das Grundgerüst der EG bilden Proteoglykane (PG) und Glykoproteine (GP) ¹⁰³. Diese sind mit dem Endothel fest verbunden und binden verschiedene lösliche Moleküle. Zum Großteil stammen diese Moleküle aus dem Plasma, aber auch aus den EC selbst ^{78,103}. Die löslichen Plasmakomponenten können direkt oder indirekt, entweder über PG oder über Glykosaminoglykane (GAG), miteinander verbunden sein ⁷⁰. Durch die Interaktion der löslichen Bestandteile mit dem fließenden Blut entsteht ein dynamisches Gleichgewicht, welches eine stetige Veränderung der Zusammensetzung und Dicke der EG bewirkt. Auch enzymatischer und scherinduzierter Abbau spielt dabei eine Rolle. Aus diesem Grund wird unter der EG, weniger eine statisch, geometrisch fest definierte Schicht, als vielmehr dynamische, sich ständig im Wechsel befindende membrangebundene Moleküle verstanden ⁷².

Die GPs der EG sind durch kleine und verzweigte Kohlenhydratseitenketten gekennzeichnet. Es spielen drei Familien eine Rolle: Selectin, Integrin und Immunglobuline. Sie bilden einen Bestandteil des Grundgerüsts ^{103,119}. Der wichtigste Baustein sind jedoch die PGs. Die Gruppe der Syndecane und Glypicane sind fest mit der Zellmembran verbunden ^{17,38}. Andere PGs, wie Mimecan, Perlecan oder Biglycan, werden hingegen als lösliche PGs sezerniert, und befinden sich dann entweder in der EG oder werden in das Blut freigesetzt ^{52,62}. Über ihre Kernproteine können membrangebundene PGs ein oder mehrere GAG-Ketten kovalent binden ⁷⁰. GAG, welche von PGs gebunden werden, sind: Heparansulfat (HS), Chondroitinsulfat (CS), Dermatansulfat (DS) und Keratinsulfat (KS) ¹⁴. Sie zählen zu den sulfatierten GAG und sind negativ geladen. Dies ermöglicht ihnen zusätzlich eine elektrostatische Interaktion mit löslichen Plasmaproteinen, wie beispielsweise Albumin ¹⁹. Als ungeladenes und unsulfatiertes GAG ist Hyaluronan (HA) nicht an den Kernproteinen der PGs gebunden. HA kann entweder über elektrostatische Interaktionen zwischen anderen Molekülen oder

nicht-kovalente Bindungen an Rezeptoren in der EG verankert sein ⁹³. Den Hauptrezeptor für HA stellt CD44 dar, welcher in der Plasmamembran sitzt ^{93,131}. Andere HA-bindende Proteine sind Versican und der HA-Rezeptor für Endozytose Stabilin-2 ^{46,128}. Zudem bildet HA Komplexe mit anderen sulfatierten GAG und erhält so die gelartige Beschaffenheit der EG, indem es über die negative Ladung Wasser bindet ¹⁴. Durch die Vernetzung untereinander bildet HA zudem fibrinöse Netzwerke, welche zur Integration von HA in die EG beitragen ¹¹⁴. Allen GAG gemeinsam ist, dass sie aus unverzweigten Disaccharidpolymeren bestehen. Die Disaccharide setzen sich aus einer Uronsäure und einem Hexosamin zusammen ².

Je nach Dichte und Zusammensetzung lässt sich die EG in zwei Schichten teilen - eine innere und äußere Schicht. Die innere Schicht ist dichter, besteht vor allem aus PGs und ist stark mit der Plasmamembran assoziiert. GAG, welche in dieser Schicht hauptsächlich vertreten sind, sind CS und HA. Durch ihre Dichte bildet die innere Schicht primär eine Barriere für Makromoleküle aus dem Plasma. Die äußere Schicht stellt sich weniger dicht dar, und besteht aus GAG, insbesondere HS, und Plasmaproteinen. Sie dient dazu, eine nicht gewollte Adhäsion von Blutzellen an die EC zu verhindern ^{28,123}.

1.3.2 Funktion der endothelialen Glykokalyx

So vielfältig die Zusammensetzung der EG ist, so vielfältig sind auch ihre Aufgaben und Funktionen. Durch die Präsenz der sulfatierten GAG besitzt die EG eine negative Ladung. Diese ermöglicht es ihr eine zusätzliche Barriere für die Gefäßpermeabilität darzustellen. Transvaskuläre Bewegungen von negativgeladenen Molekülen und Molekülen größer als 70 kDa sind aufgrund dessen eingeschränkt. Durch den so geschaffenen Albumin Gradient, kann der transvaskuläre Fluss durch die EG reguliert und der kolloidosmotische Druck in den Zellen aufrechterhalten werden ^{3,7,50}. Auch die Leukozyten Adhäsion kann durch die EG gesteuert werden, und somit zu einer Beeinflussung der inflammatorischen Antwort beitragen ²¹. Zudem können Scherkräfte des Blutes über die EG gemessen und entsprechende Signale an die EC weitergegeben werden. So ist es möglich, bei besonders starken Scherkräften die Stickoxid-vermittelte (NO) Vasodilatation der EC zu aktivieren, und den Kräften entsprechend entgegenzuwirken ⁷⁸.

Durch die Interaktion mit den verschiedensten Plasmamolekülen übernimmt die EG weitere Funktionen. So führt die Wechselwirkung zwischen HS und Antithrombin III und zwischen DS und Heparin Kofaktor II zur Aktivierung der beiden Kofaktoren, und ist

damit ein wichtiger Bestandteil bei der Vermittlung anti-koagulativer Effekte. Auch auf den Fett-Stoffwechsel hat die EG, durch ihre Interaktion mit LPL und LDL, einen wichtigen Einfluss. Zudem werden unterschiedliche Wachstumsfaktoren, wie VEGF, TGF- β 1/2 und FGF, mit Hilfe von Komponenten der EG aktiviert und können so ihre Effekte auf die Angiogenese und Zellproliferation ausüben¹⁰³. Die EG übernimmt darüber hinaus anti-adhesive Funktionen, schützt die EC vor oxidativem Stress und bindet Entzündungsmediatoren wie Chemokine und Zytokine¹³¹.

1.3.3 Hyaluronan

Als einziges unsulfatiertes GAG nimmt HA eine besondere Stellung ein. Es ist ein Polysaccharid mit sich wiederholenden Disacchridketten aus N-Acetyl-D-glucosamin und D-Glucuronsäure, welche durch β 1-3 bzw. β 1-4 glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind⁶³. HA ist einer der wichtigsten Bestandteile der extrazellulären Matrix und überall im Körper zu finden. Es ist an zahlreichen Prozessen beteiligt. So spielt es sowohl eine Rolle bei der Zellmotilität, der Proliferation von Zellen, der Wundheilung und Angiogenese, als auch bei malignen Prozessen und Metastasierung³³. In der EG ist HA einer der Hauptbestandteile und bestimmt bis zu 20 % aller darin vertretenden GAG²⁸. Die Aufgabe des HAs in der EG ist es, die Diffusion von kleineren Molekülen und die Permeabilität zu kontrollieren⁴⁷.

Insbesondere ist die Funktion des HAs jedoch von seiner Kettenlänge abhängig. Je nach Größe kann es pro- oder antiinflammatorisch wirken²⁸. Hauptsächlich wird HA als High-molecular-weight HA (HMW HA) synthetisiert und liegt dann mit einer Größe von 1000 bis 6000 kDa vor. Medium-molecular-weight HA (MMW HA) und Low-molecular-weight HA (LMW HA) findet sich vor allem in Körperflüssigkeiten und -geweben. Die Masse des MMW HA liegt bei etwa 250 bis 1000 kDa und die des LMW HA bei 10 bis 250 kDa¹²⁵. HMW HA ist vor allem unter nicht-inflammatorischen Bedingungen vorzufinden. Es wirkt supprimierend auf die Angiogenese, die Phagozytose und die Synthese von HA, sowie immunmodulatorisch und anti-fibrotisch^{33,125}. So wird beispielsweise das Tumornekrosefaktor-stimulierende-Gen-6-Protein (TSG-6) durch Entzündungen und hohe Glukosespiegel stimuliert. TSG-6 ist in der Lage, schwere Ketten von Inter- α -Trypsin-Inhibitor an HA zu übertragen. An diesen modifizierten Kabelstrukturen, welche hauptsächlich von HMW HA gebildet werden, können Entzündungszellen haften. Auf diese Weise wird die Bindung proinflammatorischer Zellen an das Endothel verhindert⁸⁹. Kürzere HA-Fragmente, insbesondere LMW HA, sind im Gegenzug überwiegend unter

inflammatorischen Bedingungen vorzufinden. Bei LMW HA überwiegen die entzündlichen, immunstimulierenden und angiogenen Eigenschaften²⁸. Kurze HA-Fragmente wurden mit dem Abbau von CD44 und der Förderung von Tumorzellmigration in Verbindung gebracht¹²². Die insbesondere durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstandenen HA-Fragmente bewirken eine Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen⁵⁷. Zudem tragen sowohl LMW HA als auch HA-Fragmente zur Entstehung endothelialer Dysfunktion bei. Über Interaktion mit dem CD44-Rezeptor steigert LMW HA die Bildung von Aktin-Stress-Fasern⁶⁹. Darüber hinaus erhöhen HA-Fragmente die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) und vaskulären Zelladhäsionsmoleküls 1 (VCAM-1), welche typische Marker endothelialer Dysfunktion darstellen⁵¹. So tragen die genannten Mechanismen zur Zerstörung der EC-Barriere bei. Während HMW HA das Endothel schützt, haben HA geringerer Größe eine schädliche Wirkung auf das Endothel²⁸.

Für die Synthese von HA ist eine Transferase, die sogenannte HA-Synthase (HAS), verantwortlich. Im Menschen kodieren drei Gene, HAS1, HAS2 und HAS3, die drei homologen Isoformen des Enzyms. Schritt für Schritt werden UDP-Glucuronsäure und UDP-N-Acetylglucosamin zu dem Substrat zusammengeführt. Hierfür müssen die zuvor im Endoplasmatischen Retikulum gebildeten, und über den Golgi-Apparat in die Plasmamembran gebrachten inaktiven Formen der Enzyme, aktiviert werden. Die Enzyme sind Proteine der Plasmamembran und befinden sich an deren Innenfläche³³. HAS1 und HAS2 sind für die Produktion von HMW HA verantwortlich. Sie wirken somit indirekt antiinflammatorisch und antifibrotisch. Für die Synthese von LMW HA ist hauptsächlich HAS3 zuständig. Sie verursacht dadurch überwiegend Inflammation und Fibrose¹³⁵.

Der Abbau von HA kann sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch erfolgen²⁸. Für den enzymatischen Katabolismus sorgen sogenannte Hyaluronidasen (HYAL). Im menschlichen Genom gibt es sechs Sequenzen, welche für Hyaluronidasen kodieren. Diese sind HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, PH-20 und HYAL-P1 - wobei es sich bei letzterem um ein Pseudogen handelt, welches für kein funktionelles Protein kodiert. Bei HYAL handelt es sich um eine Endoglycosidase. Diese spalten die β -Endo-N-Acetylglucosamin-Bindungen^{83,121}. Ein kleiner Teil des HA-Abbaus findet nicht-enzymatisch, durch oxidative Reaktionen, statt. Die Spaltung erfolgt dabei durch ROS, freie Radikale oder instabile Moleküle^{118,121}.

1.4 Veränderungen der endothelialen Glykokalyx bei Inflammation

Unter inflammatorischen Bedingungen, wie beispielsweise bei einer Sepsis, kommt es zu Abbauprozessen in der EG ^{28,78,131}. Hierbei spielen die unterschiedlichsten Mechanismen eine Rolle. Als Folge dieses Prozesses kann die EG ihren zahlreichen Funktionen kaum oder überhaupt nicht mehr nachgehen. So kommt es beispielsweise durch das Aufheben der Barriere für große und negativ geladene Moleküle zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Dies führt wiederum zur Entstehung von Gewebsödemen. Leukozyten können vermehrt an die EC adhären und Thrombozyten aggregieren, wodurch Mikrothromben entstehen. Ebenso kommt es zu Fehlregulationen der Vasodilatation ^{6,8}.

Größtenteils wird HS, Syndecan-1 und HA abgebaut. Hierfür scheinen vier Komponenten verantwortlich zu sein: Heparanase, Matrix Metalloproteasen (MMP), ROS und der Tumornekrosefaktor TNF- α . MMP und Heparanase zählen zu der Familie der sogenannten Sheddase. Dies sind Enzyme, welche den direkten Abbau der EG initiieren und die einzelnen Bausteine in das Plasma freigeben. Heparanase spaltet dabei spezifisch HS aus den Kernen der PGs. Sie wird von zahlreichen Zelltypen sezerniert und übernimmt den Hauptteil des EG-Abbaus ²⁸. MMP spalten hauptsächlich PGs. Die wichtigsten Vertreter sind dabei: MMP-2, MMP-9, MMP-13 und MMP-15, wobei letztere in der Lage ist, den HA-Rezeptor CD44 zu spalten ^{28,140}. Neuere Studien geben einen Hinweis darauf, dass auch eine dritte Enzymgruppe von Bedeutung sein kann - die Hyaluronidasen. Hierbei scheint vor allem HYAL1, aber auch HYAL2 eine Funktion übernehmen zu können ^{29,30}. ROS und TNF- α spielen eine indirekte Rolle für den EG-Abbau. So regt das Zytokin TNF- α Immunzellen zur Freisetzung von Enzymen, wie Heparanase, sowie freien Radikalen, Histamin und anderen Zytokinen an. Des Weiteren können TNF- α und ROS auch eigenständig Heparanase und MMP-9 aktivieren. Ebenso können ROS GAG, insbesondere HA, depolymerisieren und so zusätzlich zum EG-Abbau beitragen ²⁸.

Parallel dazu tritt ein Schutzmechanismus der EG unter inflammatorischen Bedingungen außer Kraft. Im gesunden Organismus werden über die Aktivierung des Tie2-Rezeptors durch den Ligand Angpoe-1 Schutz- und Reparaturmechanismen der EG aktiviert. EC sezernieren unter Inflammation vermehrt Angpoe-2, der als Antagonist Angpoe-1 aus dessen Rezeptor verdrängt und somit die Reparatur der EG verhindert ⁷⁴.

In der Vergangenheit sind auch Virulenzfaktoren zunehmend in den Fokus der Forschung geraten. Vorherige Studien haben gezeigt, dass Pathogene in der Lage sind,

das Oberflächenproteom ihrer Wirtszellen modellieren zu können, um so ihre Virulenz zu steigern^{133,134}. Ebenso scheinen sie auch den Abbau der Glykokalyx zu induzieren. So sorgen beispielsweise Salmonellen durch ihre Glykosidasen dafür, dass die Glykokalyx der Epithelzellen im Dickdarm abgebaut wird, um besser in diese eindringen zu können⁴. Die Veränderungen der EG durch Pathogene und ihre Virulenzfaktoren müsste hierfür noch weiter erforscht werden.

1.5 Endotheliale Glykokalyx der Lungengefäße

Die EG im alveolären Kapillarbett besitzt mit durchschnittlich 1,6 µm eine deutlich größere Dicke im Vergleich zu EGs in extrapulmonalen Kapillarbetten mit 0,6 µm¹¹³. Den größten Anteil daran macht hier vor allem HS aus. Die Lunge verfügt die höchste Konzentration an HS von allen Organen⁶⁸. Aufgrund der EG kann dem transvaskulären Fluss der Gefäßkapillaren mehr entgegengewirkt werden. So wird die Entstehung eines Lungenödems verhindert, welches den Gasaustausch in der Lunge erschweren würde. Zum anderen besteht durch die verbesserte Kontrolle der Neutrophilen Transmigration durch die EG eine höhere Toleranz gegenüber den ständig inhalieren Mikroorganismen⁶⁶. Die EG übernimmt demzufolge eine wichtige Schlüsselrolle des Organs.

Ähnlich wie im Rest des Körpers, kommt es auch in der Lunge unter inflammatorischen Bedingungen zu Abbauprozessen der EG. So konnte gezeigt werden, dass Sepsis-assoziiertes ARDS unter anderem aus der Aktivierung der pulmonalen Heparanase hervorgeht. Dieses Enzym baut HS ab, und sorgt damit für die Zerstörung der pulmonalen EG¹¹³. Hierdurch kommt es zu der Entstehung von Lungenödem, Neutrophilen Adhäsion in alveolären Kapillaren und fehlerhaftem NO-Tonus in den Kapillaren der Lunge. Dies sind typische Eigenschaften von akuten Lungenerkrankungen (ALIs)⁶⁶. Die Mechanismen, welche hinter dem EG-Abbau stecken, scheinen sich jedoch zu unterscheiden, je nachdem, ob die vorliegende Lungenerkrankung direkt oder indirekt ausgelöst wurde. ALIs, welche durch eine direkte Verletzung des alveolären Epithels bedingt sind, werden beispielsweise durch eine Pneumonie oder Aspiration ausgelöst. Von indirekten Lungenerkrankungen spricht man, wenn die alveoläre Endothelschädigung durch Ereignisse außerhalb der Lungen zustande kommen, wie nicht-pulmonale Sepsis oder Transfusionszwischenfälle⁶⁶. Bei diesen indirekten ALIs spielt vor allem der Abbau von HS durch aktivierte Heparinase-III eine Rolle. Bei Patienten mit indirekter ALIs konnten erhöhte Plasmalevel von

HS-Fragmenten und eine Steigerung der Heparinase-Aktivität festgestellt werden ^{22,113}. Auch MMP scheinen einen kleinen Anteil an dem EG-Abbau bei indirekten ALIs auszumachen ⁹⁰. Ganz anders sieht es bei den direkten ALIs aus. Hier lassen sich kaum HS-Fragmente im Plasma finden ^{44,112}. Stattdessen findet sich eine erhöhte Menge an zirkulierendem HA im Plasma der Erkrankten ¹¹². Die Prozesse des EG-Abbaus bei direkten Lungenerkrankungen sollten noch weiter erforscht werden.

2. Fragestellung

Der Abbau der EG spielt in zahlreichen pathologischen Prozessen eine Rolle. Insbesondere für die Pathogenese von ALIs nimmt dieser Mechanismus einen besonderen Stellenwert ein^{112,113}. Mit der Zerstörung der EG gehen zahlreiche Folgen einher, welche die Funktion der Lunge massiv beeinflussen und inflammatorische Prozesse weiter vorantreiben⁶⁶. Die in das Plasma freigesetzten GAG waren dabei bereits Gegenstand vorheriger Studien und scheinen einen Einfluss auf den Verlauf von ALIs zu nehmen^{10,112}. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Rolle der löslichen GAG bei ALIs näher zu untersuchen. Der Fokus lag dabei auf HA, welches bei direkten Lungenerkrankung von großer Bedeutung ist¹¹². Folgende Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit im Detail untersucht:

- Ist die Plasmakonzentration von HA in CAP- und ARDS-Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöht?
- Gibt es eine Korrelation zwischen der Höhe der HA-Plasmaspiegel und klinischen Parametern bzw. dem Outcome von Patienten mit akuten Lungenerkrankungen?
- Welche Größe haben die gelösten HA-Fragmente im Plasma von Patienten mit akuten Lungenerkrankungen?
- Spielt der Virulenzfaktor PLY eine Rolle beim Abbau von HA?
- Welcher Mechanismus könnte zum PLY-induzierten HA-Abbau führen?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Firma
8W10E+ ECIS-Chips	Applied Biophysics Inc., New York, NY, USA
Aluminiumplatten ALUGRAM SIL G UV254; 4 x 8 cm	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
BD FACS Aria III	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CO ₂ -Inkubator CB 170	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Deckgläschen Nr. 1,5; 0,17 mm	VWR, Hannover, Deutschland
Dichtungshaftfolie	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
ECIS [®] Z-Theta Gerät	Applied Biophysics Inc., New York, NY, USA
F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plate (96-Well-Mikrotiterplatte)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Glaspipetten 5 ml; 10 ml; 20 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glasspritze	Hamilton Company, Reno, NV, USA
Laser-Scanning Mikroskop SP8	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Micro Centrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate (96-Well-PCR-Mikrotiterplatte)	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Mikro 185 Zentrifuge	Hettich, Kirchlingern, Deutschland
MinUVIS Labor Duo-UV Strahler f. Chromatographie Lampe LW254+LW 366 nm	Desaga GmbH, Wiesloch, Deutschland
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
PCR Reaktionsgefäße PP	nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen (Luhe), Deutschland
pH-Meter FiveEasy	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, OH, USA
Pipetboy 2	INTEGRA Biosciences, Biebertal, Deutschland
Pipetten P2, 10, 20, 100, 200, 1000	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
RF Vacuum Filtration Units 180C2-E; 0,22 µm	Sartorius, Göttingen, Deutschland
S-Monovette; EDTA; 7,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Reaktionsgefäß 500 µl, 1500 µl, 2000 µl (Eppendorf-Gefäße)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Safety Multifly-Kanülen 21 G	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Spark 10 M Fluoreszenzplattenlesegerät	Tecan, Männedorf, Schweiz
SpectraMax190-Mikrotiterplatten-Lesegerät	Molecular Devices, San José, CA, USA
StepOnePlus Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TPersonal Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Transmissions-Elektronenmikroskop EM902	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
TRS 2K-CCD-Kamera	Tröndle, Moorenweis, Deutschland
Ultramikrotom UC7	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Vortex Genie 2 G56OE Mixer	Electro Scientific Industries Inc., Portland, OR, USA
Zellkultur Platten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

3.1.2 Reagenzien

Reagenzien	Firma
10 x RT Puffer	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
10 x RT Random Primers	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazinyl)-ethanolsulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agar 100	Agar Scientific Ltd., Essex, Großbritannien
Aggrecan	Invitrogen, Waltham, MA, USA
Alexa Fluor 488 Streptavidin	Biolegend, San Diego, CA, USA
AlexaFluor 555	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Ammoniumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ascorbinsäure	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Basic Fibroblasten-Wachstumsfaktor	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Cetylpyridiniumchlorid (CPC)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Honeywell International Inc., Morristown, NJ, USA
Complete protease inhibitor cocktail	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland
Cystein	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DAKO Fluorescent Mounting Medium	Dako, Glostrup, Dänemark
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Endothelzell-Wachstumsmedium MV2	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Epidermaler Wachstumsfaktor	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Invitrogen, Waltham, MA, USA
Fetales Kälberserum	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Fluorescein-HA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gelatine	Merck Milipore, Billerica, MA, USA
Glutaraldehyd EM-Qualität (GDA)	Electron Microscopy Sciences (EMS), Hatfield, PA, USA
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Guanidinthiocyanat (GTC)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hank´s Balanced Salt Solution (HBSS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Hyaluronan-Binding-Protein (HABP)	Amsbio, Abingdon, Großbritannien
Hyaluronan-Standards (HMW HA, MMW HA, LMW HA)	R&D Systems, Minneapolis, MN, US
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hydrocortison	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Insulinähnlicher Wachstumsfaktor	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
Lanthannitrat	Altmann Analytik GmbH & Co. KG, München, Deutschland
MitoSOX Red	Invitrogen, Waltham, MA, USA
MitoTEMPOL	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Multi Scribe Reverse Transkriptase	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
N-Lauroylsarcosine	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Osmiumtetroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Platinum [®] Sybr Green qPCR Super Mix	Invitrogen, Waltham, MA, USA
Propanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Protector RNase Inhibitor 3, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland
Proteinase K	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Rinderalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RNase-freies Wasser (Ampuwa)	Fresenius Kabi, Bad Homburg von der Höhe, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tetrachlorogoldsäure (HAuCl ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Thrombin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Todd-Hewott-Medium	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRizol	Invitrogen, Waltham, MA, USA
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Uranylacetat	Electron Microscopy Sciences (EMS), Hatfield, PA, USA
Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor 165	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Ziegen-Anti-VE-Cadherin-Antikörper	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

3.1.3 Puffer

Puffer	Komponenten
Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Guanidinthiocyanatpuffer (GTC-Puffer)	4 M GTC 0,18 M N-Lauroylsarcosine 25 mM Natriumacetat pH 7
Radioimmunopräzipitations-Assay-Puffer (RIPA)	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton X-100 1 % Natriumdeoxycholat 0,1 % SDS 1 mM PMSF 1 mM Natriumorthovanadat 1 µg/ml complete protease inhibitor cocktail

3.1.4 Kits

Kits	Firma
Cytotoxicity Detection Kit	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland
Hyaluronan DuoSet ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Protein Assay Kits	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Rapid Gold BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TNF- α DuoSet ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
TMB Substrate Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Probenmaterial

Als Probenmaterial standen humanes EDTA-Plasma, sowie mikrovaskuläre Endothelzellen der menschlichen Lunge (HPMEC) zur Verfügung. Die Gewinnung und Untersuchung des Plasmas war durch die Bewilligung der Probanden oder deren Angehörigen sowie durch entsprechendes Ethikkommissionsvotum legitimiert (Ethikkomitee der Justus-Liebig-Universität: ethische Zustimmung Nummer 05/00; Ethikkomitee der Medizinischen Hochschule Hannover: SEPSIS/ARDS Register Nummer 8146_BO_K_2018).

3.2.1.1 *Humanes EDTA-Plasma*

Alle BRISQ-Meldekriterien der Plasmaproben sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Es wurde humanes EDTA-Plasma von lebenden Patienten mit CAP und ARDS, sowie von gesunden Spendern (Donor) entnommen. CAP-Patienten wurde das Blut innerhalb von 72 Stunden nach der Hospitalisierung entnommen. Bei ARDS-Patienten erfolgte die Entnahme innerhalb von 48 Stunden nach Aufnahme auf der ITS. Die Blutentnahme wurde entweder durch periphere venöse Punktion (CAP und Donor) oder mittels arteriellem Zugang (ARDS) durchgeführt. Nach Entnahme wurden die Proben bei $4.000 \times g$ und $4^\circ C$ für 20 Minuten zentrifugiert. Der entnommene Überstand wurde bei $-80^\circ C$ gelagert.

Die Plasma Proben der CAP-Patienten (n=118) wurden von dem Kompetenznetzwerk *CAPNETZ* zur Verfügung gestellt. Alle ARDS-Proben (n=39) stammten von Patienten, welche in der Klinik für Pneumologie der Medizinischen Hochschule Hannover in Behandlung waren. Gesunde Kontrollen (n=241) wurden Blutspendern im Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikum Gießen/Marburg entnommen. Die Entnahme des Plasmas erfolgte in den Zeiträumen von Februar 2007 bis März 2017 (CAP), Januar 2019 bis März 2020 (ARDS) und Januar 2019 bis Mai 2020 (Donor).

Tabelle 3.1: BRISQ-Melde Kriterien der Studienkohorte

Probentyp	EDTA-Plasma
Anatomischer Entnahmeort	Antekubitaler Bereich des Armes (CAP, Donor) oder arterieller Zugang über A. femoralis/A. radialis (ARDS)
Klinische Merkmale der Patienten/Donoren	Klinische Daten der Patienten enthielten Alter, Geschlecht, BMI, Rauchstatus, CRB-65 Score, Horowitz Quotient, Blutbild, CRP, Lactat, Komorbiditäten (Diabetes mellitus, Hypertonie, Hyperlipidämie, COPD), Länge des Krankenhausaufenthaltes, Aufenthalt auf ITS, Katecholamin-Therapie und 28-Tage-Mortalität. Klinische Daten der gesunden Kontrolle enthielten Alter und Geschlecht.
Vitaler Zustand	Alle Proben wurden von lebenden Patienten/Donoren gesammelt.
Diagnosestellung	Die Diagnose der CAP-Patienten wurde durch typische klinische Symptome, körperliche Untersuchung und Nachweis von Infiltraten im Röntgen-Thorax gestellt. ARDS wurde durch die Kriterien, beruhend auf der Berlin Definition 2012 ¹⁰² , diagnostiziert. Die gesunden Kontrollen wurden mittels Anamnese, körperlicher und laborchemischer Untersuchung bewertet.
Probengewinnung	Die Proben wurden mittels peripherer Venenpunktion (CAP, Donor) oder über einen arteriellen Zugang (ARDS) gewonnen.
Arten der Stabilisierung	Alle Proben wurden bei Raumtemperatur in EDTA-Blutröhrchen gesammelt, innerhalb von 5 Stunden nach Entnahme verarbeitet und bis zur Verarbeitung bei 4 °C gelagert.
Art der Langzeitkonservierung	Einfrieren. Für verarbeitetes Plasma wurde kein Reagenz zur Langzeitstabilisierung verwendet.
Lagerungstemperatur	-80 °C
Lagerungsdauer	1 bis 10 Jahre
Versandtemperatur	Alle Proben wurden auf Trockeneis versandt.

Bewertung und Auswahl	Plasmaproben wurden basierend auf ihrer Farbe auf Hämolyse untersucht und hämolysierte Proben wurden von der Studie ausgeschlossen.
Auftau-Zyklen	Alle Proben wurden der gleichen Anzahl von Auftau-Zyklen unterzogen.

3.2.1.2 Eigenschaften der Patienten- und Kontrollkohorten

Alle klinisch und demographisch relevanten Eigenschaften der Kohorten sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Die Diagnose CAP wurden durch klinische Symptome, körperliche Untersuchung und Bildgebung mittels Röntgen-Thorax gestellt. Die Diagnose ARDS wurde nach der im Jahr 2012 etablierten Berlin Definition gestellt¹⁰². Die Ursache des ARDS war entweder eine CAP (n=35) oder eine HAP (n=4). Die Kontrollgruppe wurde im Vorfeld anamnestisch, klinisch und laborchemisch untersucht und zeigte dabei keine Hinweise für das Vorliegen von akuten Lungenerkrankungen. Die Gruppe der Gesunden war in Bezug auf Alter und Geschlecht mit den Patientengruppen vergleichbar.

Tabelle 3.2: Klinische und demographische Eigenschaften der Patienten- und Kontrollkohorten

Variable	CAP	ARDS	Donor
Anzahl, n (%)	118 (100)	39 (100)	241 (100)
Alter (Jahre)	68 [46-88]	54,8 [20-86]	56,7 [19-76]
Geschlecht, männl./weibl., n (%)	59/59 (50/50)	28/11 (71,8/28,2)	159/82 (66/34)
BMI (kg/m ²)	27,7 [15,6-47,0]	27,3 [19,6-52,5]	
CRB-65 Score ^a , n (%)			
0	27 (22,9)	0 (0)	
1	60 (50,8)	0 (0)	
2	24 (20,3)	3 (7,7)	
3	4 (3,4)	28 (71,8)	
4	1 (0,8)	8 (20,5)	
Horovitz Quotient ^b , n (%)			

1		9 (23,1)
2		20 (51,3)
3		10 (25,6)
Raucherstatus, n (%)		
Raucher	32 (27,1)	17 (43,6)
Ex-Raucher	32 (27,1)	6 (15,4)
Nicht-Raucher	54 (45,8)	7 (17,9)
Komorbiditäten, n (%)		
Diabetes mellitus	27 (22,9)	8 (20,5)
Hypertonie	25 (21,2)	16 (41,0)
Hyperlipidämie	4 (3,4)	k. A.
COPD	35 (29,7)	7 (17,9)
CRP (mg/l)	144,25 [0,14-587]	260,41 [31-652]
Leukozyten (Zellen / μ l)	13.670 [1.600-48.300]	13.200 [700-30.500]
Lactat (mmol/l)	k. A.	2,44 [0,5-15]
LOS Krankenhaus (Tage)	16 [4-79]	22 [2-73]
Aufenthalt ITS, n (%)	58 (49,2)	39 (100)
Katecholamin-Therapie ^c , n (%)	25 (43,1)	26 (66,7)
28-Tage-Mortalität, n (%)	6 (5,1)	12 (30,8)

^aCRB-65 Score, confusion (Verwirrtheit), respiratory rate (Atemfrequenz) ≥ 30 /min, blood pressure (Blutdruck) systolisch ≤ 90 mmHg oder diastolisch ≤ 60 mmHg, >65 (über 65 Jahre); ^bHorovitz Quotient, Verhältnis paO_2 und F_iO_2 ; ^cKatecholamin-Therapie: diese Information betrifft nur Patienten mit Aufenthalt auf ITS. Einige klinische Daten waren nicht von allen Patienten verfügbar (Anzahl nicht verfügbarer Daten/Gesamtpatienten): CAP: BMI (1/118), CRB-65 Score (2/118), Diabetes mellitus (41/118), COPD (31/118), CRP (2/118), Leukozyten (1/118), LOS (14/118) und 28-Tage-Mortalität (2/118); ARDS: Raucherstatus (9/39), Diabetes mellitus (12/39), Hypertonie (8/39), COPD (9/39), Lactat (2/39) und Katecholamin-Therapie (1/39). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung].

3.2.1.3 Humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge und Zellkultur

Die HPMEC stammten von PromoCell. Sie wurden auf einer 1 % Gelatine-beschichteten Platte bei 37 °C unter 5 % CO₂ in Kultur gebracht. Als Zellmedium diente das Endothelzell-Wachstumsmedium MV2 (PromoCell), versetzt mit folgenden Zusätzen: 0,05 ml/ml fetales Kälberserum, 5 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor (rekombinant human), 10 ng/ml Basic Fibroblasten-Wachstumsfaktor (rekombinant human), 20 ng/ml Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (Long R3 IGF), 0,5 ng/ml vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor 165 (rekombinant human), 1 µg/ml Ascorbinsäure und 0,2 µg/ml Hydrocortison (alle von PromoCell).

3.2.2 Stimulation der HPMEC mit Pneumolysin

PLY wurde von Prof. Dr. med. T. Chakraborty (Institut für medizinische Mikrobiologie, German Center for Infection Research, Standort Gießen-Marburg-Langen, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die HPMEC wurden auf 1 % Gelatine-beschichteten 6-Well-Platten gesät und mit Endothelzell-Wachstumsmedium (PromoCell) bei 37 °C unter 5 % CO₂ inkubiert. Nachdem die Zellen die Platte ausreichend bedeckten, wurden sie mit 50 bis 200 ng/ml PLY für 1 bis 24 Stunden bei 37 °C und unter 5 % CO₂ stimuliert. In einigen Experimenten wurden die Zellen vor der Stimulation mit PLY (200 ng/ml) für 30 Minuten mit 20 µM MitoTEMPO (MT; Biomol GmbH) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen und ihr Zellmedium gesammelt, um für die HA-Reinigung, RNA-Isolierung und ELISA weiter verwendet zu werden.

3.2.3 Behandlung von HPMEC mit *Streptococcus pneumoniae*

Die folgenden Experimente erfolgten im Rahmen einer Kollaboration mit der AG Kübler (Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Kübler, Institut für Physiologie, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Deutschland).

S.p. Wildtyp (*S.p.* WT) des Stammes D39 Serotyp 2 und dessen isogene PLY-negative Mutante (*S.p.* ΔPLY) wurden in Todd-Hewott-Medium (BD Biosciences) zusammen mit 0,5 % Hefeextrakt (BD Biosciences) bei 37 °C unter 5 % CO₂ bis zur Mid-Log-Phase (A₆₀₀ = 0,3-0,4) gezüchtet. HPMEC wurden auf einer mit 2 % Gelatine beschichteten 12-Well-Platte ausgesät und bis zur Konfluenz gezüchtet. Die Zellen wurden daraufhin

in Endothelzell-Medium (PromoCell) bei 37 °C unter 5 % CO₂ in Kultur gebracht. Anschließend wurden diese mit 1 x 10⁵ cfu/ml *S.p.* WT oder *S.p.* ΔPLY infiziert und für 1 bis 24 Stunden bei 37 °C unter 5 % CO₂ inkubiert. Das Kulturmedium wurde gesammelt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die infizierten HPMEC wurden in 4 % Paraformaldehyd (PFA; Carl Roth GmbH & Co. KG) fixiert.

3.2.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.2.4.1 ELISA Hyaluronan

Die quantitative Bestimmung der HA-Konzentration im EDTA-Plasma der Erkrankten und Gesunden, im Zellmedium von HPMEC mit und ohne PLY-Stimulation und im Zellmedium von HPMEC mit und ohne Infektion mit *S.p.* WT bzw. *S.p.* ΔPLY wurde mittels ELISA durchgeführt. Hierzu wurde das humane Hyaluronan DuoSet ELISA Kit (R&D Systems) verwendet. Die Reagenzien stammen, wenn nicht anders angegeben, aus diesem Kit.

Zur Vorbereitung der 96-Well-Mikrotiterplatte wurde in jede Proben tasche 100 µl Fängerreagenz, welches zuvor in einer Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS; 0,2 µm filtriert) in seine Arbeitskonzentration gebracht wurde (500 ng/ml), pipettiert. In diesem Reagenz befand sich rekombinantes humanes Aggrecan, ein PG welches über seine G1-Domäne an HA bindet. Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur gecoatet. Am Folgetag wurde das Reagenz aus den Taschen aspiriert und diese dreimal mit 400 µl Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS, pH 7,4; Carl Roth GmbH & Co. KG) gewaschen. Nicht gebundenes Aggrecan wurde somit aus den Wells entfernt. Anschließend wurde die Platte mit 300 µl Reagenzlösung (5 % Tween 20 in PBS, pH 7,4; Carl Roth GmbH & Co. KG), bei einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur, geblockt. Nachfolgend wurde erneut dreimal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen. Die Plasmaproben wurden mit Reagenzlösung verdünnt (Gesunde: 1:5, CAP-Patienten: 1:20, ARDS-Patienten: 1:50). Aus einer Standardlösung mit bekannter Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe mittels Reagenzlösung hergestellt (50 ng/ml; 25 ng/ml; 12,5 ng/ml; 6,25 ng/ml; 3,125 ng/ml; 1,5625 ng/ml; 0,78125 ng/ml). Es wurden je 100 µl des Zellmediums, Plasma- und Standardproben in die entsprechenden Taschen gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschschrift wurde erneut wiederholt. Die Platte wurde mit je 100 µl Biotin versetztem Aggrecan pro Well, verdünnt in Reagenzlösung (400 ng/ml Arbeitskonzentration), für zwei Stunden bei

Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Streptavidin-Peroxidase wurde 40-fach in Reagenzlösung verdünnt und 100 µl zu jedem Well für 20 Minuten im Dunkeln und bei Raumtemperatur gegeben. Über das Biotin konnte sich das Enzym an das Aggrecan binden. Die nicht gebundene Streptavidin-Peroxidase wurde durch dreimaliges Waschen entfernt. Im nächsten Schritt wurden je 100 µl Substratlösung (1:1 Mischung von H₂O₂ und Tetramethylbenzidin) aus dem TMB Substrate Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) in die Wells pipettiert und die Platte vor direktem Lichteinfall geschützt. Diese Lösung wurde durch die Streptavidin-Peroxidase umgesetzt, wodurch eine bläuliche Färbung der Proben entstand. Nach 20 Minuten wurde diese Reaktion durch eine Stopp-Lösung (2 N H₂SO₄; Carl Roth GmbH & Co. KG) beendet. Dabei trat ein Farbumschlag von Blau zu Gelb auf. Die Intensität dieser Farbreaktion wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 540 nm mit dem *SpectraMax190-Mikrotiterplatten-Lesegerät* (Molecular Devices, San José, CA, USA) photometrisch gemessen. Mit Hilfe der Standardverdünnungsreihe wurde eine Standardkurve erstellt, anhand welcher die HA-Konzentrationen der Proben ermittelt wurde.

3.2.4.2 ELISA Tumornekrosefaktor- α

Die quantitative Bestimmung der Konzentration des TNF- α im Zellmedium von HPMEC mit und ohne PLY-Stimulation wurde mittels ELISA durchgeführt. Hierzu wurde das humane TNF- α DuoSet ELISA Kit (R&D Systems) verwendet. Die Reagenzien stammen, wenn nicht anders angegeben, aus diesem Kit.

Zur Vorbereitung der 96-Well-Mikrotiterplatte wurde in jede Proben tasche 100 µl Fänger-Antikörper (mouse Anti-human TNF- α), welches zuvor mit 0,5 ml PBS (0,2 µm filtriert) versetzt wurde, pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur gecoatet. Am Folgetag wurde das Reagenz aus den Taschen aspiriert und diese dreimal mit 400 µl Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS, pH 7,4; Carl Roth GmbH & Co. KG) gewaschen. Anschließend wurde die Platte mit 300 µl Reagenzlösung (1 % Rinderalbumin (BSA) in PBS, pH 7,4; 0,2 µm filtriert; Sigma-Aldrich), bei einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur, geblockt. Nachfolgend wurde erneut dreimal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen. Aus einer Standardlösung mit bekannter Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe mittels Reagenzlösung hergestellt (1000 pg/ml, 500 pg/ml; 250 pg/ml; 125 pg/ml; 62,5 pg/ml; 31,3 pg/ml; 15,6 pg/ml). Es wurden je 100 µl des unverdünnten Zellmediums und der

Standardproben in die entsprechenden Taschen gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschschrift wurde erneut wiederholt. Die Platte wurde mit je 100 µl biotinyliertem Hyaluronan pro Well, welches zuvor mit 1 ml Reagenzlösung versetzt wurde, für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Streptavidin-Peroxidase wurde 40-fach in Reagenzlösung verdünnt und 100 µl zu jedem Well für 20 Minuten im Dunkeln und bei Raumtemperatur gegeben. Über das Biotin konnte sich das Enzym an die Antikörper binden. Die nicht gebundene Streptavidin-Peroxidase wurde durch dreimaliges Waschen entfernt. Im nächsten Schritt wurden je 100 µl Substratlösung (1:1 Mischung von H₂O₂ und Tetramethylbenzidin) aus dem TMB Substrate Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) in die Wells pipettiert und die Platte vor direktem Lichteinfall geschützt. Diese Lösung wurde durch die Streptavidin-Peroxidase umgesetzt, wodurch eine bläuliche Färbung der Proben entstand. Nach 20 Minuten wurde diese Reaktion durch eine Stopp-Lösung (2 N H₂SO₄; Carl Roth GmbH & Co. KG) beendet. Dabei trat ein Farbumschlag von Blau zu Gelb auf. Die Intensität dieser Farbreaktion wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 540 nm mit dem *SpectraMax190-Mikrotiterplatten-Lesegerät* (Molecular Devices, San José) photometrisch gemessen. Mit Hilfe der Standardverdünnungsreihe wurde eine Standardkurve erstellt, anhand welcher die TNF-α -Konzentrationen im Zellmedium ermittelt wurde.

3.2.5 Analyse der Hyaluronan-Fragmente im EDTA-Plasma und Zellmedium

3.2.5.1 Hyaluronan Reinigung

Die Aufreinigung des HAs erfolgte aus EDTA-Plasma von Patienten und Gesunden, aus Zellmedium von HPMEC mit und ohne vorherige PLY-Stimulation und aus Zellmedium von HPMEC mit und ohne vorherige Infektion mit *S.p.* WT bzw. *S.p.* ΔPLY.

Zu Beginn wurden die Proben bei 55 °C mit 1,8 U/ml Proteinase K (Thermo Fischer Scientific Inc.) für 16 Stunden proteolysiert. Nach dem Verdau wurden die Proben für 16 Stunden mit Aggrecan (Invitrogen) bei 4 °C inkubiert. Dies geschah mithilfe einer Aggrecan gecoateten 96-Well-Mikrotiterplatte. Das HA wurde an das Aggrecan gebunden und konnte so aus dem Protease-verdauten Plasma gereinigt werden. Im Anschluss erfolgte ausgiebiges Waschen mit 0,5 % Tween 20 in PBS (Carl Roth GmbH & Co.). Das gebundene HA wurde durch Inkubation mit 100 bis 200 µl 0,1 M Glycin in PBS (pH 3; Carl Roth GmbH & Co. KG) freigesetzt. Das gesammelte HA wurde nun durch die Zugabe von Wasser auf 1 ml gebracht und durch die Zugabe von 20 µl 5 % Cetylpyridiniumchlorid (CPC; Merck) ausgefällt. Nach 24 Stunden Inkubation bei 4 °C und Zentrifugation bei 11.000 x g für 20 Minuten bei Raumtemperatur, wurden die Proben mit 96 % Ethanol (Sigma-Aldrich) gewaschen und erneut bei 11.000 x g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss in 20 bis 80 µl Wasser gelöst. Das endgültige Produkt wurde bei -20 °C bis zur weiteren Analyse mittels Dünnschichtchromatographie (DC) gelagert. Die Proben wurden mithilfe des Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) sowie durch Coomassie- und Silber-Färbung einer SDS-PAGE auf Kontamination mit Restproteinen untersucht. Die HA-Reinheit wurde zu dem durch Inkubation mit 1 mg/ml Hyaluronidase (Sigma-Aldrich) für drei Stunden bei 37 °C verifiziert.

3.2.5.2 Dünnschichtchromatographie

Zur Analyse der HA-Fragmente wurde eine DC-Aluminiumplatte (40 x 80 mm) beschichtet mit Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator (0,2 mm Schichtdicke) von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Es wurden je 5 µl Probe mithilfe einer Glasspritze nebeneinander und etwa 5 mm oberhalb des unteren Randes der DC-Platte aufgetragen. Die Platte wurde anschließend für 20 Minuten an der Raumluft getrocknet. In den DC-Behälter wurden 2 ml des mobilen Systems, welches aus

Ammoniumhydroxid-n-Propanol-Wasser (60/40/5, v/v/v; Carl Roth GmbH & Co. KG; Sigma-Aldrich) bestand, gegeben und dieser für 30 Minuten vor der Verwendung luftdicht abgeschlossen und bei Raumtemperatur mit dem Dampf der mobilen Phase vorgetränkt. Anschließend wurde die getrocknete Platte in den DC-Behälter gestellt und so lang belassen, bis eine Wanderungsdistanz der mobilen Phase von mindestens 7 cm entlang der Platte ab der Startlinie erreicht wurde. Nach Entnahme wurde die Platte erneut für 20 Minuten an der Raumluft getrocknet und die Proben danach unter einer UV-Lampe (MinUVIS Labor Duo-UV, Desaga GmbH, Wiesloch, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und deren Wanderungslänge ausgemessen. Die Ermittlung der molekularen Länge erfolgte durch den Vergleich mit Standardproben. Hierfür wurde gereinigtes LMW HA von etwa 38 kDa, MMW HA von etwa 309 kDa und HMW HA von etwa 1560 kDa verwendet (alle von R&D Systems).

3.2.6 Multiplex Assay

Diese Experimente wurden im Rahmen einer Kollaboration mit Dr. hum. biol. Nelli Baal (Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland) durchgeführt.

Verschiedene Plasmaproteine aus dem EDTA-Plasma von ARDS-Patienten wurden mithilfe von Multiplex Assays der Luminex-Technologie quantifiziert. Hierfür wurden Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific Inc.; Kollagen IV: R&D Systems) verwendet. Folgende Protein-Konzentrationen wurden analysiert: IL-1 β , -6, -8, -10, TNF- α , chemoattraktives Monozytenprotein-1 (MCP-1), Chemokine Ligand 5 (RANTES), Endothel Selektin (CD62e) und Kollagen IV (Koll. IV). Die Reagenzien stammen aus den verwendeten Kits.

Mit Antikörpern beschichtete Kügelchen wurden in die Taschen einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Die Platte wurde manuell gewaschen. Die Plasma-Proben wurden folgendermaßen verdünnt: für die Analyse von MCP-1, RANTES und CD62e 1:10 und für die Analyse von Koll. IV 1:30. Zur Analyse von IL-1 β , -6, -8, -10 und TNF- α wurden die Proben unverdünnt belassen. Anschließend wurde der Inkubationspuffer zusammen mit den vorbereiteten Plasma-Proben oder Standardlösungen mit bekannter Konzentration in die Taschen der Platte gegeben und für zwei Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde gewaschen, der Nachweis-Antikörper hinzu pipettiert und für 30 Minuten erneut auf dem Schüttler bei

Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde Streptavidin Phycoerythrin in jede Tasche gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach Wiederholung des Waschschriffs, wurde die verbliebene Flüssigkeit resuspendiert und die Daten konnten detektiert werden. Hierfür wurde ein *BD FACS Canto II* und *BD FACS Aria III* (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Zur Analyse der Daten wurde die *BD FACS Diva Software* Version 8.0.1 benutzt.

3.2.7 Laktatdehydrogenase-Aktivität

Die Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) aus HPMEC mit und ohne PLY-Stimulation und mit und ohne *S.p.* Infektion wurde mithilfe des Cytotoxicity Detection Kit (Roche Applied Science) quantifiziert. Als Positiv-Kontrolle wurden HPMEC für 5 Minuten in 1 % Triton X-100 (Carl Roth GmbH & Co. KG) inkubiert.

Zur Herstellung des Reaktionsgemisches wurden Reagenz 1 (Katalysator, Diaphorase) und Reagenz 2 (Farbstofflösung, alpha-(4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl)-omega-hydroxypoly(oxy-1,2-ethanediyl)) des Cytotoxicity Detection Kits im Verhältnis 1:46 gemischt. Als Probelösung diente das zellfreie Zellmedium der HPMEC (PromoCell). In eine 96-Well- Mikrotiterplatte wurden je 50 µl Reaktionsgemisch und Probelösung in die Taschen pipettiert. Die Platte wurde anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Intensität der auftretenden Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von 500 nm mit dem *SpectraMax190-Mikrotiterplatten-Lesegerät* (Molecular Devices, San José, CA, USA) photometrisch gemessen.

3.2.8 Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)

Diese Experimente erfolgten im Rahmen einer Kollaboration mit der AG Kwapiszewska (Priv.-Doz. Dr. Grazyna Kwapiszewska-Marsh, Ludwig Boltzmann Institut für Lungengefäßforschung und Otto Loewi Forschungszentrum, Lehrstuhl für Physiologie und Pathophysiologie, Medizinische Universität Graz, Österreich).

Zur Analyse der Zellbeschaffenheit von HPMEC nach Stimulation mit 200 ng/ml PLY wurde eine ECIS durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurden HPMEC mit 0,5 U/ml Thrombin (Sigma-Aldrich) behandelt.

Zur Vorbereitung wurden *8W10E+ ECIS-Chips* (Applied Biophysics Inc., New York, NY, USA) mit 10 mM L-Cystein in sterilem Wasser (Sigma-Aldrich) beschichtet, gefolgt von einer Beschichtung mit 1 % Gelatinelösung (Merck Millipore). HPMEC wurden mit einer Dichte von 80.000 bis 100.000 Zellen /400 µl Zellmedium auf den ECIS-Chips ausgesät und für 24 Stunden inkubiert, bis sich eine Monoschicht bildete. Am nächsten Tag erfolgte der Wechsel des Zellmediums und der Anschluss des *ECIS® Z-Theta* Gerätes (Applied Biophysics Inc., New York, NY, USA). Zur Aufzeichnung der Integrität der Zell-Monoschicht wurde eine stabile Basislinie für mindestens eine Stunde aufgezeichnet.

3.2.9 Realtime-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

3.2.9.1 Isolierung der RNA aus humanen Endothelzellen

Die Isolierung der RNA erfolgte aus HPMEC. Diese wurden zuvor für vier Stunden mit 200 ng/ml PLY stimuliert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 300 µl GTC-Puffer gelöst. Die Proben wurden auf Eis gegeben und mit 300 µl TRIzol (Invitrogen) gemischt. Nach der Zugabe von 90 µl Chloroform (Honeywell International Inc.) wurden die Reaktionsgefäße für fünf bis zehn Sekunden gevortext. Die Proben wurden anschließend für zehn Minuten auf Eis inkubiert, zwischendurch mehrfach mittels Umdrehens durchmischt und danach für 15 Minuten bei 14.300 x g und 4 °C zentrifugiert. In neue Eppendorf-Gefäße wurden je 600 µl kaltes Isopropanol (Sigma-Aldrich) pipettiert und der klare Überstand der zentrifugierten Proben wurde bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach vortexen der Proben wurden diese erneut für 15 Minuten bei 14.300 x g und 4 °C zentrifugiert. Den Pellets wurde je 500 µl gekühlter 70 % Ethanol (Sigma-Aldrich) hinzugegeben und die Proben für drei Minuten bei 16.600 x g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Nach der letzten Wiederholung wurden die Überstände mit einer Pipette entfernt und die Eppendorf-Gefäße für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Das Pellet wurde in 12 µl Nuklease-freiem Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi) gelöst. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.9.2 Synthese der cDNA

Zur Synthese der cDNA wurde eine reverse Transkriptions (RT)-Reaktion durchgeführt.

Für die Umwandlung der RNA zu cDNA wurde im Vorfeld die Konzentration der isolierten RNA mittels *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) bestimmt. Die Reaktionsvorbereitungen wurden auf Eis durchgeführt. Es wurden dazu 10 µl eines Master Mix hergestellt, dessen Zusammensetzung in Tabelle 3.3 dargestellt ist.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Master Mix zur cDNA Synthese

Reagenzien	Volumen (µl)
10 x Reverse Transkriptase Puffer (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc.)	2,0
10 x RT Random Primer (25 µM; Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc.)	2,0
dNTP (25 mM; Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc.)	0,8
RNase Inhibitor (20 U/µl; Roche Applied Science)	0,5
Reverse Transkriptase (50 U/µl; Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc.)	1,0
Rnase freies Wasser (Ampuwa)	3,7
Total	10,0

Anschließend wurde diesem Master Mix 1 µg RNA in einem maximalen Volumen von 10 µl hinzugegeben. Die RT-Reaktion erfolgt mit Hilfe des *Tpersonal Thermocycler* (Biotetra, Göttingen, Deutschland). Folgende Bedingungen der Zyklen waren dabei festgelegt: zehn Minuten bei 25 °C, zwei Stunden bei 37 °C, fünf Minuten bei 85 °C und anschließend Abkühlung auf 4 °C. Die cDNA-Proben wurden bis zur weiteren Versuchsdurchführung bei -20 °C gelagert.

3.2.9.3 Realtime-Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation der spezifischen cDNA-Sequenzen wurde mithilfe des *StepOnePlus Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) durchgeführt. Hierfür wurde der *Platinum® Sybr Green qPCR Super Mix* (Invitrogen) verwendet.

Folgende Primer wurden für die qPCR verwendet: human HYAL1 forward: 5'-CCT GGG GTC AGG AAA TTT GGA-3'; human HYAL1 reverse: 5'-GGG TTG GCT ACC ACA TCG AA-3' (HYAL1 Accession Number: NM_033159.4; PCR Produkt: 253 Nukleotide); human HYAL2 forward: 5'-GGA CTC CCA CAC AGT TCC TGA G-3'; human HYAL2 reverse: 5'-CGT CCC ACG CTA CCA CAA AG-3' (HYAL2 Accession Number: NM_003773.5; PCR Produkt: 184 Nukleotide); human HYAL3 forward: 5'-AGA GGT GGC TGA TGC AGG TTT C-3'; human HYAL3 reverse: 5'-GAG GGT ACA TTC CAC AGC ACA-3' (HYAL3 Accession Number: NM_001200029; PCR Produkt: 150 Nukleotide); human HAS1 forward: 5'-TGT ATC CTG CAT CAG CGG TC-3'; human HAS1 reverse: 5'-TGC CGG TCA TCC CCA AAA G-3' (HAS1 Accession Number: NM_001523.4; PCR Produkt: 120 Nukleotide); human HAS2 forward: 5'-GGT CCC GGT GAG ACA GAT GA-3'; human HAS2 reverse: 5'-GAG GCT GGG TCA AGC ATA GT-3' (HAS2 Accession Number: NM_005328.3; PCR Produkt: 197 Nukleotide); human HAS3 forward: 5'-GGC GAT TCG GTG GAC TAC AT-3'; human HAS3 reverse: 5'-CCA TGA GTC GTA CTT GTT GAG G-3' (HAS3 Accession Number: NM_005329.3; PCR Produkt: 150 Nukleotide); human TNF- α forward: 5'-CTG CTG CAC TTT GGA GTG ATC-3'; human TNF- α reverse: 5'-CAA CAT GGG CTA CAG GCT TG-3' (TNF- α Accession Number: NM_000594.4; PCR Produkt: 130 Nukleotide); human β 2M forward: 5'-CCT GGA GGC TAT CCA GCG TAC TCC-3'; human β 2M reverse: 5'-TGT CGG ATG GAT GAA ACC CAG ACA-3' (β 2M Accession Number: NM_004048.4; PCR Produkt: 113 Nukleotide); human PBGD forward: 5'-ACC CTA GAA ACC CTG CCA GAG AA-3'; human PBGD reverse: 5'-GCC GGG TGT TGA GGT TTC CCC-3' (PBGD Accession Number: NM_000190.4; PCR Produkt: 124 Nukleotide); β 2M und PBGD wurden als Referenzgene verwendet. Es wurden je 24 μ l eines Master Mix, dessen Zusammensetzung in Tabelle 3.4 dargestellt ist, in die Wells einer 96-Well-PCR-Mikrotiterplatte pipettiert.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Master Mix zur qPCR

Reagenzien	Volumen (µl)
Sybr Green Mix (Invitrogen)	12,5
Nuklease-freies Wasser (Ampuwa)	10,5
Forward Primer (10 µM)	0,5
Reverse Primer (10 µM)	0,5
Total	24

Diesem Reaktionsgemisch wurde 1 µl cDNA hinzugegeben. Als Kontrollen dienten RNA -RT (ohne Reverse Transkriptase; entspricht Probe vor der cDNA Synthese) sowie Nuklease-freies Wasser. Die Platte wurde mit einer Dichtungshaftfolie fest abgedichtet und für einige Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurde der qPCR-Prozess im oben genannten Gerät durchgeführt. Die einzelnen Temperaturprofile der jeweiligen Phasen sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Reaktionszyklen der qPCR

	Denaturierungsphase	Denaturierung-, Hybridisierungs- und Elongationsphase (40 x Wiederholungen)	
Temperatur (°C)	95	95	60
Zeitdauer (s)	600	15	60

Mithilfe der Schmelzkurvenanalyse wurden unspezifische Amplifikationen und Kontaminationen der Proben erschlossen. Des Weiteren wurden die Produkte der qPCR auf Agarose Gel aufgetrennt und hinsichtlich ihrer Spezifität geprüft. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die ΔC_T -Werte bestimmt. Hierfür wurde die Differenz aus den jeweiligen C_T -Werten von HYAL/HAS/TNF- α und des Referenzgens $\beta 2M$ bzw. PBDG ermittelt.

3.2.10 Hyaluronidase Activity Assay

Die Analyse der Hyaluronidase Aktivität in HPMEC mit und ohne PLY-Stimulation wurde mithilfe von fluoreszierenden Nanosonden durchgeführt.

Zur Vorbereitung der fluoreszierenden HA-Gold-Nanosonden (FITC-HA-AuNPs), wurden 2,5 nmol Fluorescein-HA (Sigma-Aldrich) in 1,5 ml 0,01 M PBS unter Rühren gelöst und langsam auf 60 °C erwärmt. Anschließend wurden zu dieser Lösung 50 μ l einer 1 % Tetrachlorogoldsäure (Carl Roth GmbH & Co. KG) hinzugegeben und auf 80 °C erwärmt, bis ein Farbumschlag auf rosa erfolgte. Das entstandene Produkt wurde nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die HPMEC wurden in Radioimmunopräzipitations-Assay-Puffer (RIPA) vorbereitet. Diese Lösungen wurden mit FITC-HA-AuNPs (60 nM) für drei Stunden bei 37 °C in 0,01 M PBS und im Dunkeln inkubiert. Als Referenz-Standard diente der Verdau mit 0,1 mU/ml Hyaluronidase (Sigma-Aldrich) für drei Stunden bei 37 °C. Die Fluoreszenz Intensität jeder Lösung wurde im Anschluss mithilfe des *Spark 10M Fluoreszenzplattenlesegeräts* (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei einer Absorptionswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen.

3.2.11 Fluoreszenz Mikroskopische Darstellungen der HPMEC

3.2.11.1 VE-Cadherin Färbung

Für die Färbung mit VE-Cadherin, wurden HPMEC auf 2 % Gelatine-beschichteten Deckgläschen Nr. 1,5 (0,17 mm; VWR, Hannover, Deutschland) ausgesät und bis zur vollständigen Bedeckung dieser gezüchtet. Daraufhin wurden die Zellen mit 200 ng/ml PLY für sechs Stunden stimuliert oder für sechs Stunden bei 37 °C unter 5 % CO₂ mit *S.p.* WT oder *S.p.* ΔPLY infiziert. Nach Fixierung der Zellen mit 4 % PFA (Carl Roth GmbH & Co. KG), wurden diese mit PBS gewaschen und mit 3 % BSA in PBS (Sigma-Aldrich) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Im nächsten Schritt wurden die HPMEC mit Ziegen-Anti-VE-Cadherin-Antikörper (1:500 in 1 % BSA in PBS; Katalognummer: AF938; R&D Systems) bei 4 °C über Nacht inkubiert, mit PBS gewaschen und mit Anti-Ziegen-Antikörper, markiert mit AlexaFluor 555 (1:500 in 1 % BSA in PBS; Thermo Fisher Scientific Inc.), für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 150 nM 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; verdünnt in 1 % BSA in PBS; Sigma-Aldrich) gefärbt und in DAKO Fluorescent Mounting Medium (Dako) eingeschlossen.

3.2.11.2 Färbung von Hyaluronan

Für die Färbung von HA in der Glykokalyx von Endothelzellen, wurden HPMEC auf 2 % Gelatine-beschichteten Deckgläschen Nr. 1,5 (0,17 mm; VWR, Hannover, Deutschland) ausgesät und bis zur vollständigen Bedeckung dieser gezüchtet. Daraufhin wurden die Zellen für eine Stunden bei 37 °C unter 5 % CO₂ mit *S.p.* WT oder *S.p.* ΔPLY infiziert. Nach Fixierung der Zellen mit 4 % PFA (Carl Roth GmbH & Co. KG), wurden diese mit PBS gewaschen und mit 3 % BSA in PBS (Sigma-Aldrich) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Im nächsten Schritt wurden die HPMEC mit Hyaluronan-Binding-Protein (HABP), welches mit Biotin markiert war (1:500 in 1 % BSA in PBS; Katalognummer: AMS.HKD-BC41; Amsbio), über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen mit PBS wurden die Proben mit Alexa Fluor 488 Streptavidin (1:500 in 1 % BSA in PBS; Katalognummer: 405235; Biolegend) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Proben, nach dem erneuten Waschen mit PBS, mit 150 nM DAPI (verdünnt in 1 % BSA in PBS; Sigma-Aldrich) gefärbt und in DAKO Fluorescent Mounting Medium (Dako) eingeschlossen.

3.2.11.3 MitoSOX Red Färbung und Messung der reaktiven Sauerstoffspezies in HPMEC

Auf einer 0,1 % Gelatine-beschichteten 96-Well Platte wurden HPMEC ausgesät und in Endothelzell-Wachstumsmedium (PromoCell) in Kultur gebracht, bis 80 bis 90 % der Oberfläche bewachsen waren. Die Zellen wurden anschließend mit Hank's Balanced Salt Solution (Carl Roth GmbH & Co. KG) gewaschen und das vorherige Zellmedium wurde durch Serum-freies Endothelzellmedium (PromoCell) ersetzt. MitoSOX Red (Invitrogen) wurde mit vorgewärmten Serum-freiem Endothelzellmedium in eine finale Konzentration von 3,5 μM gebracht und auf die zuvor mit 200 ng/ml PLY stimulierten HPMEC gegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert und anschließend mit 4 % PFA (Carl Roth GmbH & Co. KG) fixiert und mit 150 nM DAPI (verdünnt in 1 % BSA in PBS; Sigma-Aldrich) gefärbt. Als Indikator für die Produktion der mitochondrialen Sauerstoffspezies (mROS) wurde die Fluoreszenz von MitoSOX Red im Zellmedium bei einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 510 nm bzw. 580 nm gemessen. Wells ohne Färbung wurden auf MitoSOX Red im Hintergrund untersucht. Die mROS-Produktion wurde unter Verwendung des *Spark 10 M Fluoreszenzplattenlesegeräts* (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen.

3.2.11.4 Mikroskopische Darstellung

Alle Bilder wurden mit einem inversen konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (SP8, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), gesteuert mit der *LASX-Software* (Version 3.5.7) aufgenommen. Die Fluoreszenzmissionen wurden unter Verwendung von zwei Hybriddetektoren, welche auf 100 % - Standardmodus eingestellt wurden, Zeile für Zeile nacheinander durch zweifache Zeilenmittelung erfasst.

Die Darstellung der VE-Cadherin Färbung von HPMEC mit und ohne PLY-Stimulation wurde unter der Verwendung eines 20 x NA 0,75 Plan-Apochromat Air-Objektivs, mit einer Voxel Größe von 70 x 70 x 500 nm, vorgenommen. DAPI wurde mit einem 405 nm Laser (1,3 %) angeregt. Für die Anregung von Alexa Fluor 555 hingegen wurde eine 499 nm Laserlinie (7 %) eines Weißlichtlasers (WLL) verwendet, dessen nominale Laserleistung auf 50 % eingestellt wurde. Die Pinhole-Größe wurde auf 1 AU eingesetzt, berechnet für eine Wellenlänge von 535 nm.

Die konfokale Darstellung der VE-Cadherin Färbung von HPMEC mit und ohne *S.p.* Infektion wurde mit einer Voxel Größe von 70 x 70 x 500 nm dargestellt. DAPI wurde mit

einem 405 nm Laser (1,4 %) angeregt. Für die Anregung von Alexa Fluor 555 hingegen wurde eine 553 nm Laserlinie (1,9 %) eines WLL verwendet, dessen nominale Laserleistung auf 70 % eingestellt wurde. Die Pinhole-Größe wurde auf 0,8 AU eingesetzt, berechnet für eine Wellenlänge von 535 nm.

Die Färbung von HA in der Glykokalyx der HPMEC mit und ohne *S.p.* Infektion wurde unter der Verwendung eines 20 x NA 0,75 Plan-Apochromat Air-Objektivs quantifiziert. Die Voxel der Bilder hatten eine laterale Größe von 0,284 μm und eine Tiefe von 0,632 μm . DAPI wurde mit einem 405 nm Laser (3,3 %) angeregt. Für die Anregung von Alexa Fluor 488 hingegen wurde eine 499 nm Laserlinie (5 %) eines WLL verwendet, dessen nominale Laserleistung auf 50 % eingestellt wurde. Die Pinhole-Größe wurde auf 1 AU eingesetzt, berechnet für eine Wellenlänge von 535 nm.

Die konfokale Darstellung der MitoSOX Red Färbung von HPMEC mit und ohne PLY-Stimulation wurde unter der Verwendung eines 63 x 1,4 NA Öl-Immersion Objektivs, mit einer Voxel Größe von 59 x 59 x 297 nm, vorgenommen. DAPI wurde mit einem 405 nm Laser (0,8 %) angeregt. Für die Anregung von MitoSOX Red wurde eine 510 nm Laserlinie (15,4 %) eines WLL verwendet, dessen nominale Laserleistung auf 50 % eingestellt wurde. Die Pinhole-Größe wurde auf 1 AU eingesetzt, berechnet für eine Wellenlänge von 580 nm.

3.2.11.5 Verarbeitung und Analyse der Bilder

Die Verarbeitung und Analyse der Bilder erfolgte mit der Hilfe von Dr. rer. nat. Ioannis Alexopoulos (Multiscale Imaging Platform, Institut for Lung Health, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland).

Die erfassten Bilddaten der HA-Färbung wurden durch das Softwaremodul *Leica Lightning* (Leica, Wetzlar, Deutschland) entfaltet. Diese Daten wurden nun zur Quantifizierung der Größe der HA-Moleküle verwendet. Das Quantifizierungsmakro ist online frei verfügbar ⁵⁴. Zur Ermittlung der HA-Höhe wurde die eigens erstellte *ImageJ/Fiji* Makro verwendet ¹¹¹. Diese erzeugte mehrere horizontale Linien über den HA-Signalen. Für jede dieser Linien wurde eine Seitenansicht des damit definierten Stapels mit dem Reslice Plugin des *ImageJ/Fiji* erzeugt. Jedes Seitenansicht-Bild wurde unter Verwendung des Huang-Algorithmus einem Schwellenwert unterzogen. Mithilfe des „Watershed“-Plugin wurden sich berührende Objekte gespalten und anschließend alle binären Objekte mit einer Größe zwischen 0,35 und 4 μm^2 analysiert. Für jedes

dieser Objekte wurde dafür die Option „Ellipse anpassen“ angewandt, und so die Fläche und Hauptachse der Ellipse gemessen. Zur Auswertung wurden repräsentative Maximalintensitätsprojektionen der erfassten konfokalen Stapel verwendet.

3.2.12 Elektronenmikroskopie (EM)

Die Aufnahme der elektronenmikroskopischen Bilder wurde am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität (Gießen, Deutschland) unter PD Dr. Ulrich Gärtner durchgeführt.

HPMEC mit und ohne vorheriger Stimulation mit 200 ng/ml PLY für vier Stunden, wurden in 2 % Glutaraldehyd EM-Qualität (GDA; Electron Microscopy Sciences (EMS)), 30 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazinyl)-ethanolsulfonsäure (HEPES; Sigma-Aldrich) und 2 % Lanthannitrat (Altmann Analytik GmbH & Co. KG) für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen in 2 % GDA und 30 mM HEPES gelagert. Die Proben wurden anschließend in 1 % Osmiumtetroxid in Aqua Bidest (Carl Roth GmbH & Co. KG) nachfixiert, in halbgesättigtem wässrigem Uranylacetat (Electron Microscopy Sciences (EMS)) gefärbt, in einer aufsteigenden Ethanol Reihe (Sigma-Aldrich) dehydriert und schließlich in Agar 100 (Agar Scientific Ltd.) eingebettet. Mithilfe eines Ultramikrotoms (*UC7 Ultramikrotom*, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) wurden die Proben in dünne Schnitte zugeschnitten und diese durch ein Transmissions-EM (*Zeiss EM902*, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) dargestellt. Digitale Bilder der Zellen wurden mit einer 2K-CCD-Kamera (TRS, Tröndle, Moorenweis, Deutschland) aufgenommen.

3.2.13 Statistik

Die statistische Auswertung der ELISA-Daten und der Multiplex Assay Experimente erfolgte unter der Mithilfe von Dr. rer. nat. Jochen Wilhelm (Center for Infection and Genomics of the Lung (CIGL), Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland).

Die Daten und Korrelationen der durch ELISA ermittelten Konzentrationen von HA im Plasma der CAP-, ARDS-Patienten und Donoren wurden in *R 4.1.1* analysiert¹⁰⁰. Zur Analyse der logarithmierten HA-Konzentrationen (logHA) wurden lineare Modelle verwendet. Da Alter und Geschlecht der Probanden als mögliche Einflussfaktoren gesehen wurden, wurde deren Interaktion, wenn nicht anders angegeben, in das Model mit einberechnet. Hierbei wurde der Einfluss des Alters durch einen natürlichen Spline mit zwei Freiheitsgraden eingebracht. So wurde die Darstellung der nichtlinearen Beziehung zwischen dem Alter und logHA ermöglicht. Folgende Parameter wurden mit logHA in Beziehung gesetzt: Alter, Geschlecht, Body Mass Index (BMI), Raucherstatus, Kohorte (CAP, ARDS, Donor), CRB-65 Score, ITS Aufenthalt, Krankenhausaufenthalt (LOS), Katecholamin-Therapie, 28-Tage-Überleben. LOS wurde logarithmiert in das Model eingebracht. Für die Analyse des 28-Tage-Überlebens wurden binominale Modelle verwendet (logarithmische Regression). Lineare Korrelationen wurden zwischen logarithmisch transformierten Variablen analysiert.

Das Korrelationsdiagramm zeigt den Korrelationskoeffizienten kodiert nach Farbe und Größe. Die Größe der Punkte ist proportional zum Absolutwert des Korrelationskoeffizienten. Die Korrelationen zwischen HA und allen anderen Variablen werden als Streuwerte angegeben.

Alle anderen Experimente wurden in *GraphPad Prism 9.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) analysiert. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mithilfe eines T-Tests durchgeführt. Für Vergleiche zwischen mehreren Gruppen erfolgte eine Varianzanalyse, gefolgt von einem Tukey-Test. Als statistisch signifikant werden p-Werte $<0,05$ angesehen. Sofern nicht anders angegeben, werden in den Diagrammen alle einzelnen Datenpunkte gezeigt. Gruppenmittelwerte werden zudem durch horizontale Linien dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 HA-Plasmakonzentration bei CAP und ARDS erhöht - Korrelation mit Schweregrad und Outcome der Erkrankung

Die HA-Konzentration wurde mittels ELISA im EDTA-Plasma von Gesunden, CAP- und ARDS-Patienten ermittelt und mit verschiedenen klinischen Parametern korreliert. Alle Ergebnisse sind in den Abb. 4.1 und 4.2 dargestellt. Hierbei sind die untersuchten klinischen Parameter jeweils gegen logHA aufgetragen. Alle Donoren sind durch schwarze, alle CAP-Patienten durch rote und alle ARDS-Patienten durch blaue Punkte repräsentiert.

Alter, Geschlecht, BMI und Raucherstatus können einen Einfluss auf inflammatorische Prozesse und somit auch auf den Abbau der EG haben^{31,40,82,106}. Deswegen wurde zunächst der Einfluss dieser Parameter auf die Höhe der HA-Plasmakonzentration geprüft. In allen drei Gruppen zeigt sich ein Anstieg der HA-Konzentration mit dem Alter (Abb. 4.1a, $p < 0,001$). Es gibt jedoch keine Unterschiede in den Plasmaspiegeln zwischen männlichen und weiblichen Probanden (Abb. 4.1b, $p = 0,6$). Informationen zum Raucherstatus und BMI der Donoren lagen nicht vor, weswegen sich folgende Aussagen lediglich auf CAP- und ARDS-Patienten beziehen. Es zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede der HA-Konzentration zwischen Rauchern und Nicht-Rauchern, mit höherer Konzentration im Plasma von Rauchern im Vergleich zu Nicht-Rauchern ($p = 0,04$; kontrolliert nach Alter und Geschlecht). Diese Unterschiede zeigen sich jedoch nicht, nachdem, neben dem Alter und Geschlecht, auch nach den Gruppen (Donor, CAP, ARDS) kontrolliert wird ($p = 0,1$). Ebenso ist keine Interaktion zwischen der HA-Konzentration und dem Raucherstatus von CAP- und ARDS-Patienten sichtbar (Abb. 4.1c, $p = 0,5$; kontrolliert nach Alter und Geschlecht). Zwischen dem BMI und den HA-Plasmaspiegeln ergibt sich keine statistisch signifikante Assoziation (Abb. 4.1d, $p = 0,8$; kontrolliert nach Alter und Geschlecht).

Im Vergleich zwischen den drei Gruppen Donor, CAP und ARDS zeigt sich eine Differenz in der Höhe der HA-Plasmakonzentration. Hierbei haben die Donoren die niedrigsten Konzentrationen, gefolgt von CAP-Patienten, und ARDS-Patienten mit den höchsten Konzentrationen von HA im Plasma (Abb. 4.2a, $p < 0,001$ für alle paarweisen Vergleiche; kontrolliert nach Alter und Geschlecht). Im Folgenden wurde die Korrelation zwischen der HA-Konzentration im Plasma von CAP- und ARDS-Patienten und verschiedenen klinischen Parametern, welche die Krankheitsschwere und das Outcome der Patienten

widerspiegeln, untersucht. Hierbei zeigt sich eine positive Korrelation zwischen den HA-Plasmaspiegeln und der Höhe des CRB-65 Scores (Abb. 4.2b, $p < 0,001$; Spearman's $\rho = 0,88$; kontrolliert nach Alter und Geschlecht). Zudem haben CAP-Patienten, welche auf der ITS behandelt werden müssen, ebenfalls höhere HA-Werte als jene CAP-Patienten, welche lediglich auf Normal-Station behandelt werden (Abb. 4.2c, $p < 0,001$; kontrolliert nach Alter und Geschlecht). Da alle ARDS-Patienten auf ITS behandelt wurden, wurde diese Analyse bei ihnen nicht durchgeführt. ITS-Patienten, bei welchen eine Therapie mit Katecholaminen notwendig ist, haben eine höhere HA-Plasmakonzentration als jene, bei welchen diese Therapie nicht notwendig ist (Abb. 4.2d, $p = 0,007$; kontrolliert nach Alter und Geschlecht). Eine negative Korrelation zwischen den HA-Spiegeln im Plasma und dem 28-Tage-Überleben kann ebenfalls dargestellt werden, nachdem, neben Alter und Geschlecht, auch nach der Krankheitsgruppe kontrolliert wird (Abb. 4.2e, $p = 0,03$). Es zeigt sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Länge des Krankenhausaufenthaltes und der Höhe der HA-Konzentration (Abb. 4.2f, $p = 0,9$; kontrolliert nach Alter und Geschlecht).

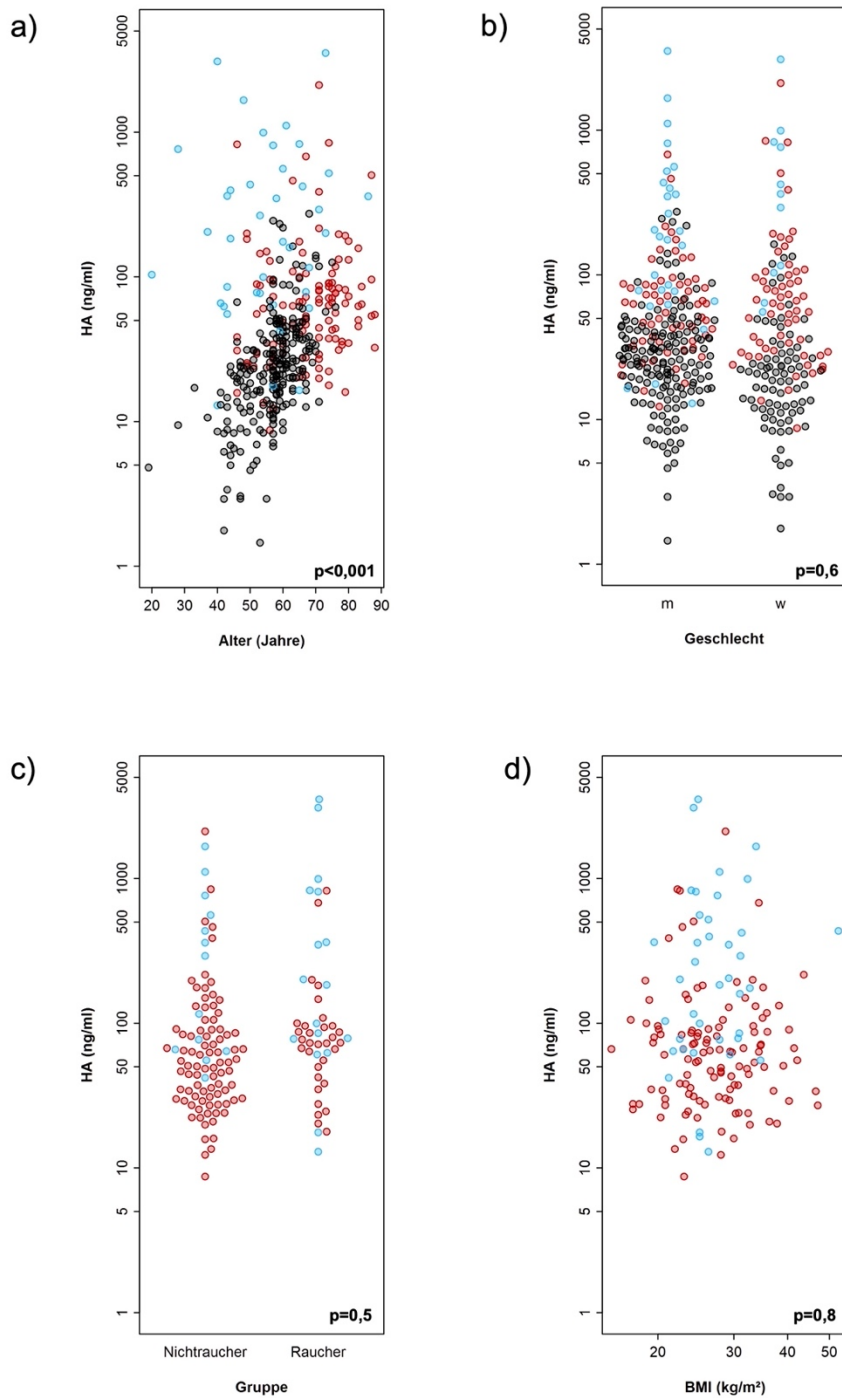


Abbildung 4.1: HA-Konzentration im Plasma von Donoren und Patienten mit CAP und ARDS. a-b) Konzentration von HA im Plasma von Donoren und Patienten mit CAP und ARDS nach a) Alter und b) Geschlecht (Donoren, $n=241$; CAP, $n=118$; ARDS, $n=39$). c-d) Konzentration von HA im Plasma von CAP- und ARDS-Patienten nach c) Rauchstatus (CAP, $n=118$; ARDS, $n=30$) und d) BMI (CAP, $n=117$; ARDS, $n=39$). Für alle: Gemessen via ELISA; schwarz repräsentiert Donoren, rot repräsentiert CAP-Patienten und blau repräsentiert ARDS-Patienten.

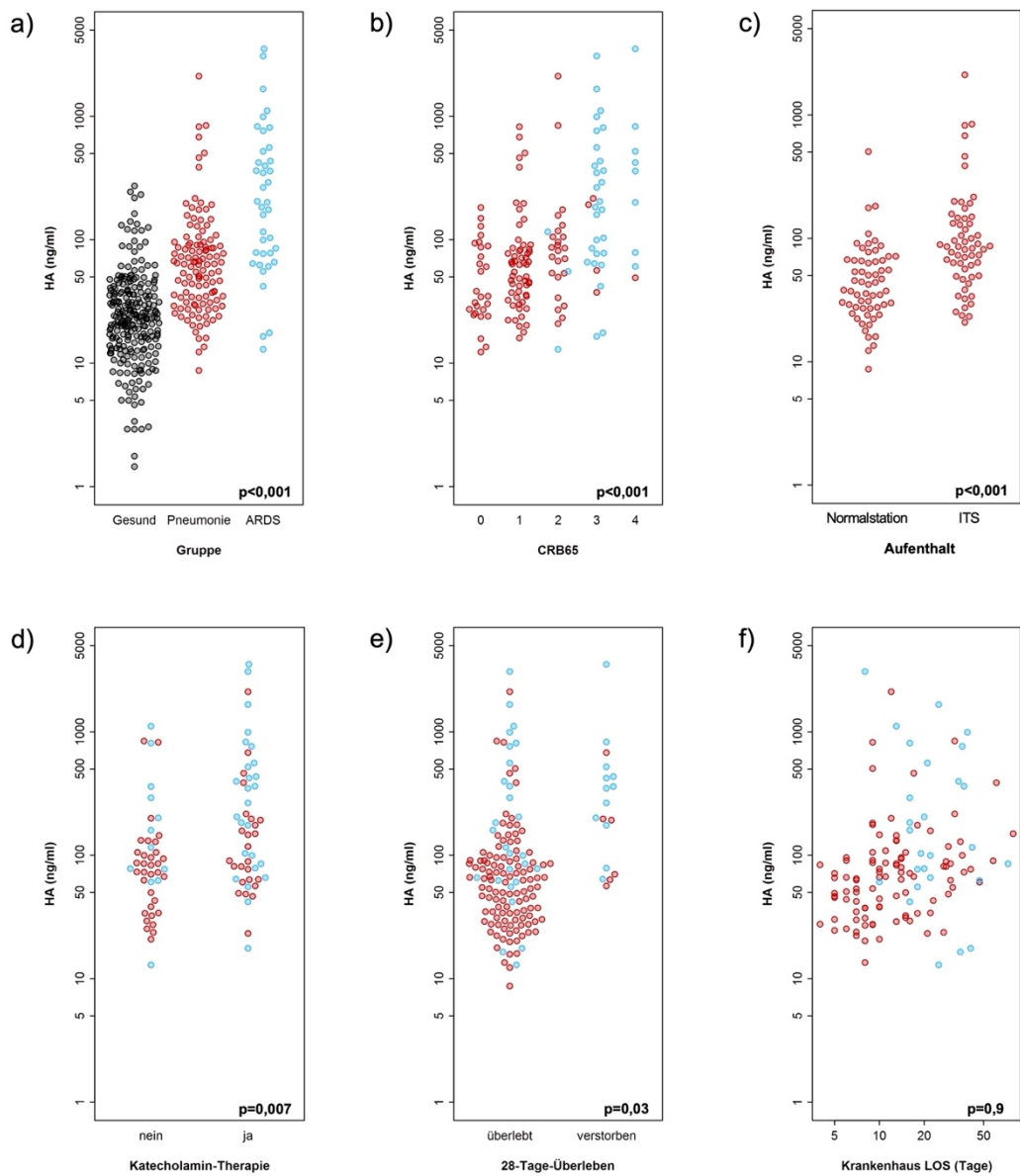


Abbildung 4.2: HA-Plasmakonzentration und ihre Assoziation mit dem Krankheitsschweregrad und Outcome. a) Konzentration von HA im Plasma von Donoren ($n=241$), CAP- ($n=118$) und ARDS-Patienten ($n=39$). b-f) HA-Plasmalevel in CAP- und ARDS-Patienten in Abhängigkeit von b) CRB-65 Score (CAP, $n=116$; ARDS, $n=39$), c) ITS-Aufenthalt (CAP, $n=118$), d) Katecholamin-Therapie (CAP, $n=58$; ARDS, $n=38$), e) 28-Tage-Überleben (CAP, $n=116$; ARDS, $n=39$) und f) Länge des Krankenhausaufenthaltes (CAP, $n=104$; ARDS, $n=39$). Für alle: Gemessen via ELISA; schwarz repräsentiert Donoren, rot repräsentiert CAP- und blau ARDS-Patienten.

4.2 Die Größe der HA-Fragmente ist mit dem Schweregrad der Lungenerkrankung assoziiert

Die Größe der HA-Fragmente im gereinigten Plasma von Donoren, CAP- und ARDS-Patienten wurde mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt. Durch die nachträgliche Behandlung des gereinigtem HAs mit HYAL, wurde die Reinheit des isolierten HAs aus dem Plasma überprüft (Abb. 4.3a).

In Abb. 4.3b wurden Plasmaproben von Donoren, CAP- und ARDS-Patienten und HA-Standard Proben mit bekannten molekularen Massen (LMW HA: 38 kDa, MMW HA: 309 kDa, HMW HA: 1560 kDa) auf der DC-Platte aufgetragen. Nach dem Vergleich mit HA-Standard Lösungen, gibt es in allen drei Gruppen eine Anreicherung von LMW HA mit einer molekularen Masse von etwa 38 kDa. Lediglich in der ARDS-Gruppe gibt es zusätzlich eine Anreicherung von HMW HA mit einer molekularen Masse von etwa 1560 kDa. In Abb. 4.3c wurden jeweils drei zufällig ausgewählte gereinigte CAP- und ARDS-Plasmaproben miteinander gegenübergestellt. Es zeigt sich auch hier eine vermehrte Anreicherung von HMW HA bei den ARDS-Proben. Schließlich wurde in Abb. 4.3d die auf der DC-Platte gemessene HA-Laufstrecke in cm ausgewählter CAP- und ARDS-Proben mit unterschiedlichem CRB-65 Score miteinander verglichen. Die Höhe des CRB-65 Scores ist farblich dargestellt: 0 ist grau, 1 ist braun, 2 ist rot, 3 ist hellblau und 4 ist dunkelblau. HA-Fragmente im ARDS-Plasma sind statistisch signifikant länger als jene im CAP-Plasma ($p=0,02$). Des Weiteren weisen Patienten mit einem höheren CRB-65 Score längere HA-Fragmente im Plasma auf als jene mit einem niedrigerem CRB-65 Score.

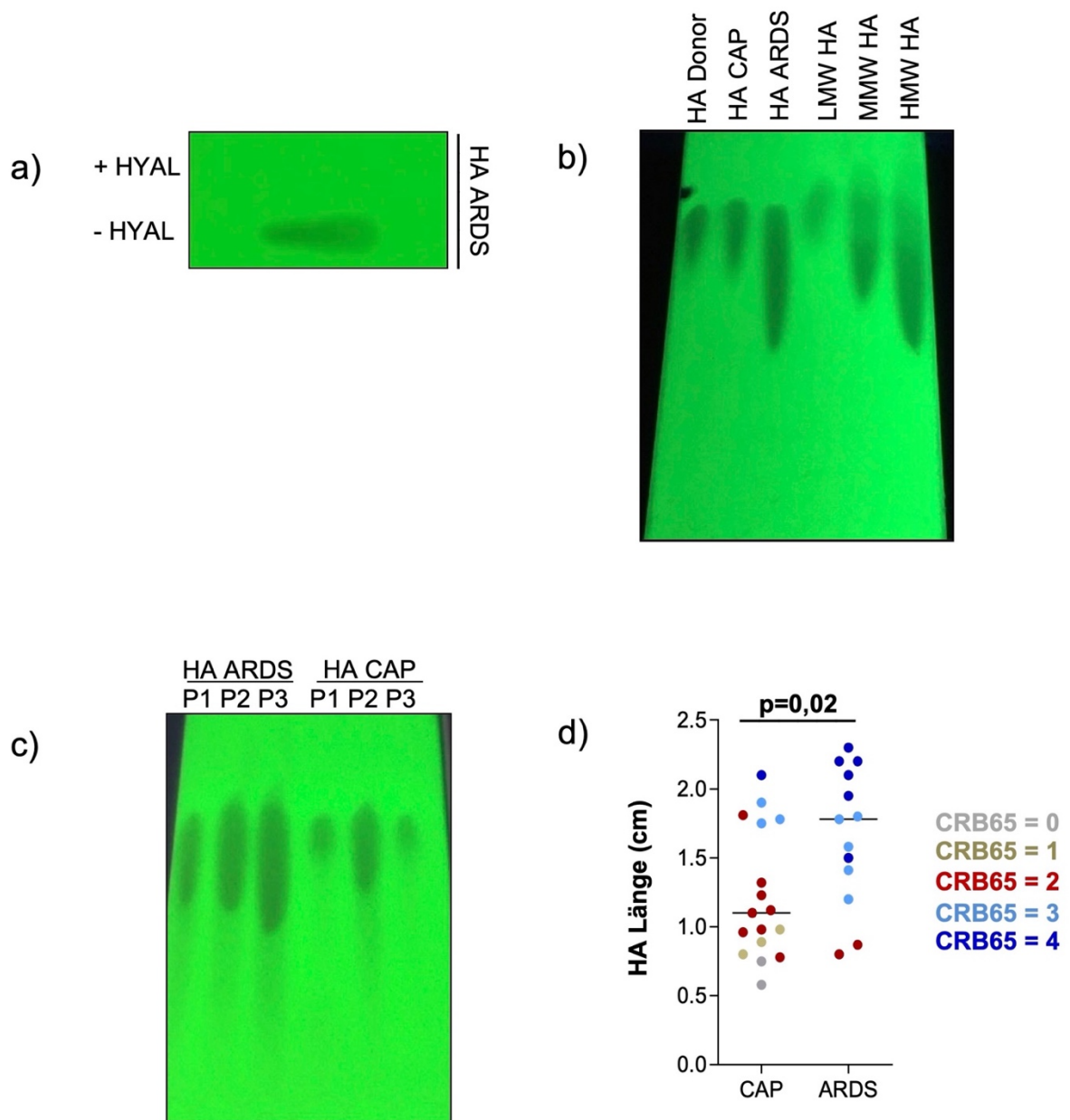


Abbildung 4.3: Assoziation der HA-Größe im Plasma mit dem Schweregrad der Lungenerkrankung.
a-c) Dünnschichtchromatographie (DC) Platten, welche die Migration von gereinigtem HA aus Plasma zeigen; repräsentative Bilder sind dargestellt; a) Aufgereinigtes HA aus dem Plasma von ARDS-Patienten mit (+) und ohne (-) HYAL Verdau; b) Wanderung von gereinigtem HA aus dem Plasma von Donor, CAP- und ARDS-Patienten und von Standard HA-Proben (LMW HA: ~38 kDa; MMW HA: ~309 kDa; HMW HA: ~1560 kDa); c) Gereinigtes HA aus dem Plasma von je drei ARDS- und CAP-Patienten. d) Wanderungslänge von gereinigtem HA auf der DC-Platte, Vergleich zwischen CAP- (n=17) und ARDS-Plasma (n=13) und nach CRB-65 Score dargestellt.

4.3 Die HA-Plasmakonzentration korreliert mit IL-6 und Proteinen der Endothelzellaktivierung und Basalmembraninstabilität

Mittels Multiplex Assay wurde die Konzentration verschiedener Proteine im EDTA-Plasma von ARDS-Patienten bestimmt. Es wurde die Korrelation zwischen der HA-Plasmakonzentration und der Konzentration dieser Plasmaproteine geprüft. Diese Korrelationen wurde mithilfe einer Korrelationsmatrix (Abb. 4.4a) dargestellt. Die Farbe und Größe der Punkte demonstriert den Korrelationskoeffizienten.

Die untersuchten Entzündungsproteine (IL-1 β , -6, -8, -10, TNF- α , MCP-1 und RANTES) haben einige Korrelationen untereinander. So korrelieren die Konzentrationen von IL-6, -8 und -10. Zudem korreliert die Konzentration von IL-1 β mit derer von TNF- α . Die HA-Konzentration korreliert mit denen des Entzündungsproteins IL-6, des Oberflächenproteins CD62e und mit denen des Basalmembranproteins Koll. IV. Die Korrelationen von HA zu diesen drei Proteinen sind zusätzlich in Abb. 4.4b, 4.4c und 4.4d dargestellt. Die Abbildungen zeigen den HA-Plasmaspiegel aufgetragen gegen die Konzentration von IL-6 (Abb. 4.4b, $p=0,007$), CD62e (Abb. 4.4b, $p=0,014$) und Koll. IV (Abb. 4.4c, $p<0,001$). Es offenbart sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Höhe der HA-Konzentration und der Höhe der IL-6, CD62e, sowie Koll. IV Konzentration im Plasma von ARDS-Patienten. In Abb. 4.4e ist zudem der Zusammenhang zwischen der Länge der HA-Fragmente und der Plasmakonzentration von Koll. IV dargestellt. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Parametern ($p=0,04$).

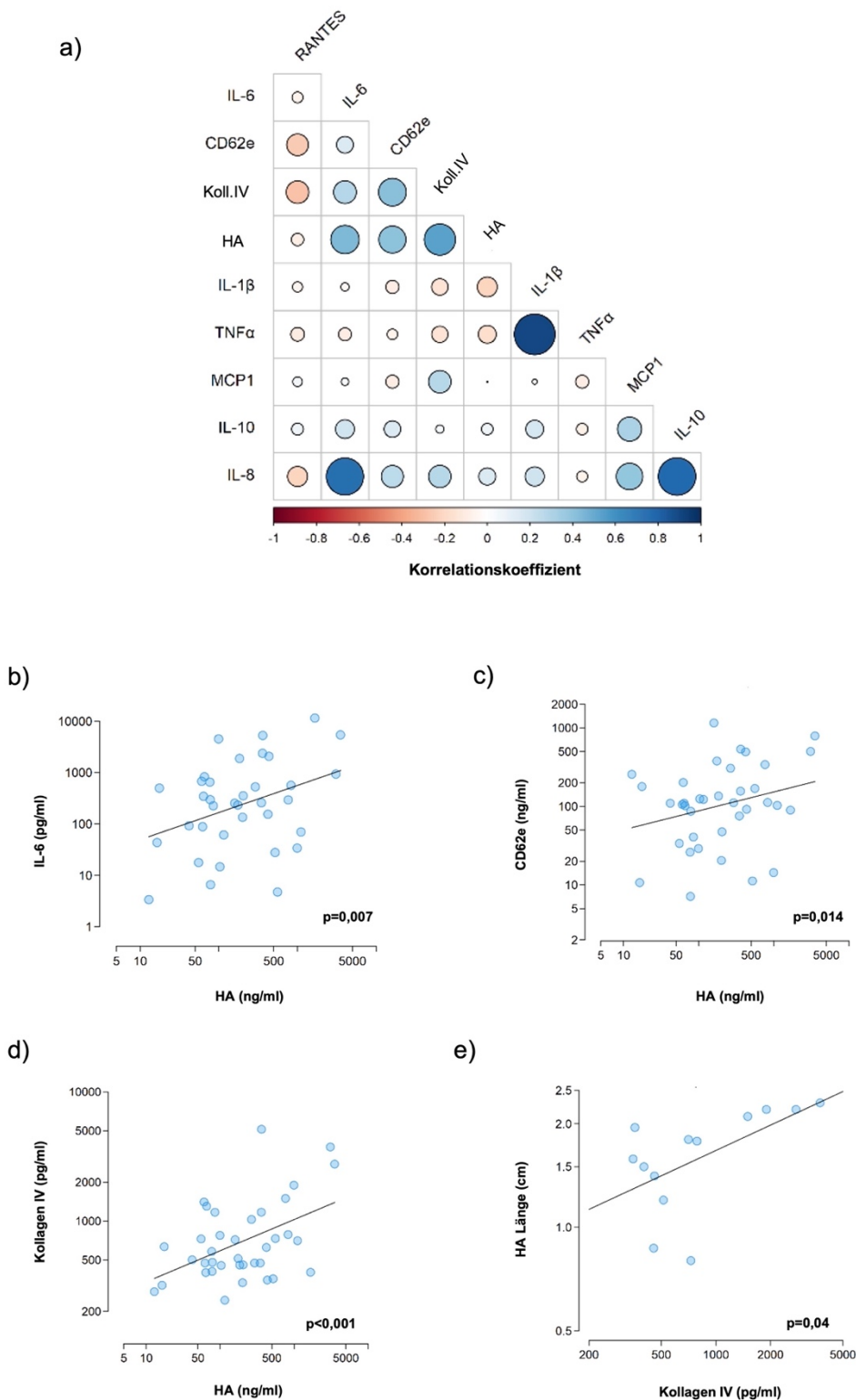


Abbildung 4.4: Korrelation der HA-Konzentration mit verschiedenen Plasmaproteinen.
 a) Korrelationsmatrix von HA und IL-1 β , -6, -8, -10, TNF α , MCP-1, RANTES, CD62e und Koll. IV im Plasma von ARDS-Patienten; die Farbe und Größe der Punkte repräsentiert den Korrelationskoeffizienten; n=39; gemessen via Multiplex Assay. b-d) Korrelation der Konzentration von HA mit b) IL-6, c) CD62e sowie d) Koll. IV im Plasma von ARDS-Patienten; n=39. e) Korrelation zwischen der Konzentration von Koll. IV und der Länge des gereinigten HAs im Plasma von ARDS-Patienten; n=13.

4.4 Pneumolysin hat Einfluss auf die HA-Konzentration und Länge der HA-Fragmente im Zellmedium von HPMEC

HPMEC wurden sowohl direkt mit PLY stimuliert als auch mit *S.p.* infiziert, welche entweder PLY produzierten (*S.p.* WT) oder nicht produzierten (*S.p.* Δ PLY). Als wichtiger Virulenzfaktor des häufigsten Pneumonie Erregers *S.p.* ⁸⁶, sollte untersucht werden, ob PLY, wie auch andere Virulenzfaktoren, einen Einfluss auf das Zelloberflächenproteom hat ¹³⁴, hier insbesondere den HA-Abbau von HPMEC. Durch die Injektion mit *S.p.* WT und *S.p.* Δ PLY sollte zudem überprüft werden, ob PLY auch unter der Infektion mit diesem Erreger eine Rolle beim Abbau von HA spielt. Anschließend wurde im Zellmedium der behandelten Zellen die Konzentration von HA mittels ELISA gemessen und die Größe der HA-Fragmente auf einer DC-Platte ermittelt. Wie in den Experimenten mit EDTA-Plasma (4.2) wurde die Reinheit des HAs mittels nachträglicher Behandlung durch HYAL überprüft (Abb. 4.5b, ganz rechts).

Abb. 4.5a zeigt die Konzentration von HA im Zellmedium von HPMEC, welche mit unterschiedlichen Konzentrationen von PLY (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml) für sechs Stunden stimuliert wurden (rot). Die Negativkontrolle ist links in grau dargestellt. Insgesamt wurden jeweils vier unabhängige Experimente durchgeführt und abgebildet. Die HA-Konzentration steigt statistisch signifikant mit Zunahme der PLY-Konzentration ($p < 0,001$). Abb. 4.5b präsentiert die Größe der isolierten HA-Fragmente aus dem Zellmedium der HPMEC aus Abb. 4.5a ($n=4$). Dargestellt sind die HA-Fragmente der Negativkontrolle, der PLY-Stimulation unterschiedlicher Konzentrationen (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml) und die HA-Fragmente der PLY 200 ng/ml Stimulation mit zusätzlicher HYAL-Behandlung. In allen nicht mit HYAL behandelten Proben gibt es eine Anreicherung von kurzen HA-Fragmenten. Das Zellmedium, welches jedoch mit 200 ng/ml PLY stimuliert wurde, hat eine besonders hohe Anreicherung an langen HA-Fragmenten. Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch in Abb. 4.5c und 4.5d erkennen. Abb. 4.5c verdeutlicht die Konzentration von HA im Zellmedium von HPMEC, welche mit PLY (200 ng/ml) für 1, 3, 6 und 24 Stunden stimuliert wurden (rot). Die Negativkontrolle ist ebenfalls links in grau dargestellt. Auch hier wurden jeweils vier unabhängige Experimente durchgeführt und abgebildet. Die HA-Konzentration steigt bis zur Stunde sechs statistisch signifikant mit der Dauer der Stimulation an ($p < 0,05$). Danach bleibt die HA-Konzentration konstant. In Abb. 4.5d ist die Länge der isolierten HA-Fragmente aus dem Zellmedium der HPMEC aus Abb. 4.5c dargestellt (ohne 24 Stunden PLY Stimulation, $n=4$). Im Zellmedium der Negativkontrolle gibt es eine Anreicherung sehr kurzer HA-Fragmente, dessen Länge nach ein und drei Stunden Stimulation deutlich

steigt und nach sechs Stunden Stimulation eine Anreicherung von sehr langen HA-Fragmenten erreicht.

Auch der Einfluss von durch *S.p.* produziertem PLY auf die HA-Konzentration und die Größe der HA-Fragmente im Zellmedium von HPMEC wurde untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.5e und 4.5f präsentiert. Abb. 4.5e zeigt die Konzentrationen von HA im Zellmedium von HPMEC, welche für unterschiedliche Zeiten (1, 3, 6 und 24 Stunden) entweder mit *S.p.* WT (rot) oder *S.p.* Δ PLY (blau) behandelt wurden. Die Negativkontrolle ist grau dargestellt. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten. Die HA-Konzentration in der Negativkontrolle bleibt über den gesamten Zeitraum etwa gleich niedrig bei etwa 20 ng/ml. Im Zellmedium der mit *S.p.* Δ PLY infizierten HPMEC bleibt die HA-Konzentration bis zur dritten Stunde etwa gleich konstant wie in der Negativkontrolle, steigt dann jedoch statistisch signifikant nach der sechsten Stunde ($p < 0.01$) und bis zur 24. Stunde ($p < 0,001$) an. Noch eindeutiger sind die Ergebnisse im Zellmedium der HPMEC mit *S.p.* WT. Die Konzentration von HA steigt in diesem Zellmedium statistisch signifikant mit der Länge der Inkubationszeit an ($p < 0,001$; für alle paarweisen Vergleiche). Der HA-Spiegel in dem Zellmedium der mit *S.p.* WT infizierten HPMEC ist deutlich höher als jener der Negativkontrolle und der mit *S.p.* Δ PLY infizierten HPMEC. Abb. 4.5f verdeutlicht die Ergebnisse der DC von isoliertem HA aus Zellmedium von HPMEC welche mit *S.p.* WT oder *S.p.* Δ PLY infiziert wurden und der Negativkontrolle. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Die HA-Fragmente der *S.p.* WT Proben sind im Vergleich zu denen der *S.p.* Δ PLY Proben und der Negativkontrolle deutlich größer.

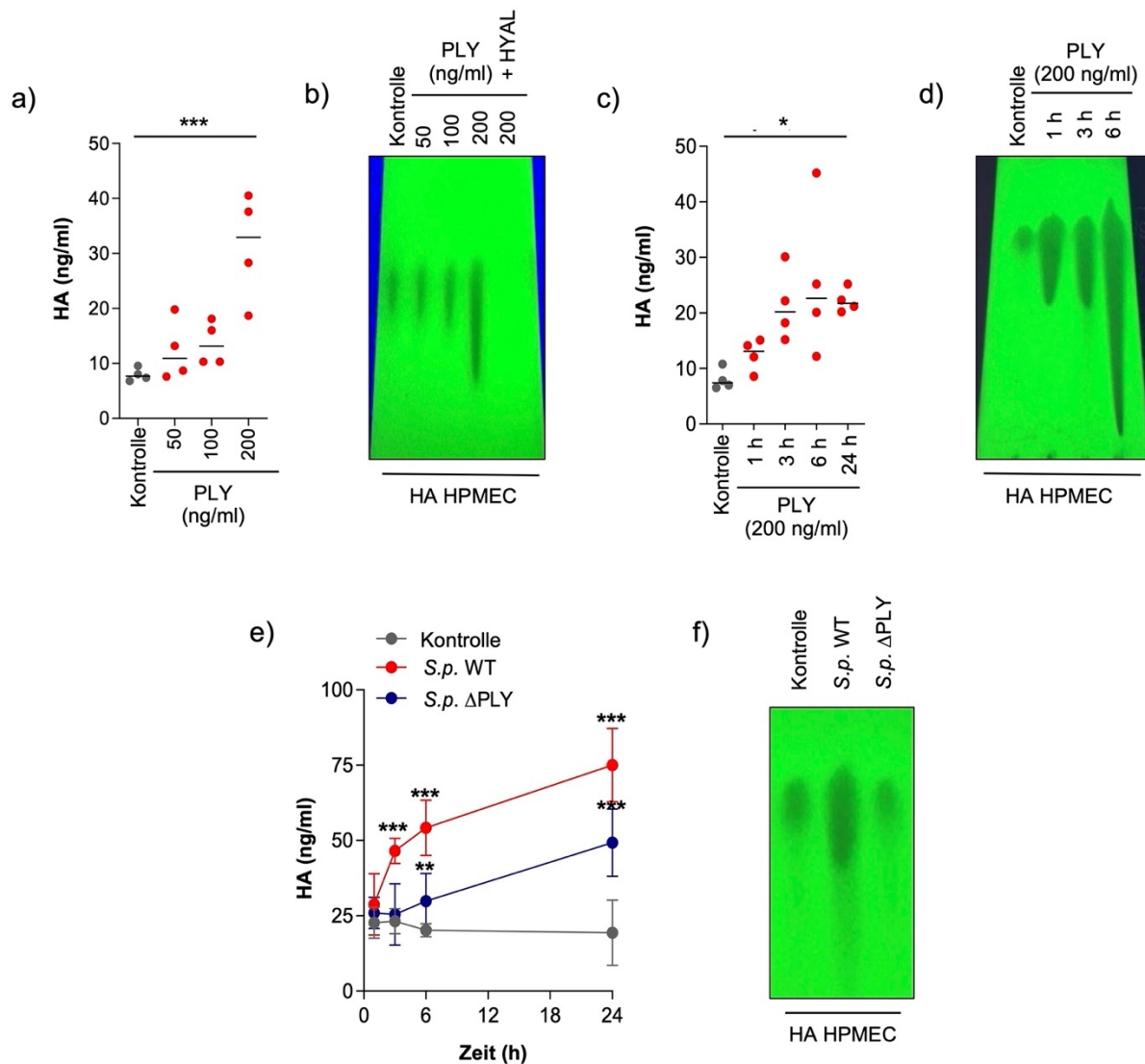


Abbildung 4.5: Einfluss von PLY auf die Freisetzung von HA in das Zellmedium von HPMEC. a+c) HA-Konzentration im Zellmedium von HPMEC a) nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an PLY für 6 h und c) nach Stimulation mit 200 ng/ml PLY mit unterschiedlichen Inkubationszeiten; grau repräsentiert die Negativkontrolle (Kontrolle) und rot repräsentiert HPMEC mit PLY-Stimulation; n=4; Gemessen via ELISA. b+d) Migration auf der DC-Platte von gereinigtem HA aus dem Zellmedium von HPMEC b) nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von PLY für 6 h und d) nach Stimulation mit 200 ng/ml PLY mit unterschiedlichen Inkubationszeiten, n=4. e) HA-Konzentration im Zellmedium von HPMEC, welche mit S.p. WT oder S.p. ΔPLY infiziert wurden in Abhängigkeit von der Inkubationszeit; grau repräsentiert die Negativkontrolle (Kontrolle), rot repräsentiert S.p. WT und blau repräsentiert S.p. ΔPLY; n=4; Gemessen via ELISA. f) DC-Platten Migration von gereinigtem HA aus dem Zellmedium von HPMEC, welche mit S.p. WT oder mit S.p. ΔPLY infiziert wurden; n=4. Für a), c) und e): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Für b), d) und f): Repräsentative Bilder sind dargestellt.

4.5 Pneumolysin hat keinen Einfluss auf die Endothelbarriere/Zellintegrität von HPMEC

Da der HA-Abbau mit der Zerstörung der Endothelzellbarriere einhergeht⁵⁵, sollte untersucht werden, ob auch der PLY-induzierte HA Abbau dazu führen kann. Hierfür wurde der Einfluss von PLY auf die Zellstabilität, sowie die Veränderung der Zellform und der Zell-Zell-Kontakte untersucht.

Zur Prüfung der Zellstabilität von HPMEC wurde die LDH-Aktivität bestimmt. Diese Kontrolle wurde sowohl bei HPMEC durchgeführt, welche direkt mit PLY stimuliert wurden, als auch bei HPMEC, welche mit *S.p.* infiziert wurden. Abb. 4.6a zeigt die Ergebnisse der LDH-Aktivitätsbestimmung von HPMEC welche für 1, 3, 6 und 24 Stunden mit je 200 ng/ml PLY stimuliert wurden (rot), der unbehandelten Negativkontrolle (grau) und der mit 0,1 % Triton X-100 behandelten Positivkontrolle (blau). Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Die LDH-Aktivität ist sowohl bei der Negativkontrolle als auch bei allen mit PLY stimulierten HPMEC sehr niedrig. Die Positivkontrolle hat eine hohe Aktivität des LDHs. Abb. 4.6b verdeutlicht die gemessene LDH-Aktivität von HPMEC, welche für je 1, 3, 6 und 24 Stunden mit *S.p.* WT (rot) oder mit *S.p.* Δ PLY (blau) infiziert wurden und dessen unbehandelte Negativkontrolle (grau). Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Die LDH-Aktivität verhält sich bei allen drei unterschiedlich behandelten HPMEC gleich. Sie sinkt bis zur sechsten Stunde und steigt dann bis zur 24. Stunde an. Es gibt keine Unterschiede in der LDH-Aktivität von *S.p.* WT infizierten, *S.p.* Δ PLY infizierten und nicht infizierten HPMEC.

Zur Messung von Veränderungen in der Zellform und somit Barrierefunktion von HPMEC nach PLY-Stimulation wurde eine ECIS durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.6c präsentiert. Sie zeigt die gemessene Impedanz Änderung über eine Zeit von sechs Stunden bei HPMEC, welche entweder mit 200 ng/ml PLY (rot) oder mit 0,5 U/ml Thrombin als Positivkontrolle (grau) behandelt wurden. Die Positivkontrolle diente dazu, die Reaktivität der Zellen zu überprüfen. Über den gesamten Zeitraum ist kaum eine Impedanz Änderung der HPMEC mit PLY-Stimulation messbar. Im Vergleich mit der Positivkontrolle ist ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) feststellbar.

Zur Darstellung der Zell-Zell-Kontakte zwischen HPMEC wurde eine VE-Cadherin Färbung durchgeführt. Zellkontakte sind durch das mit AlexaFluor 555 markierte VE-Cadherin gelb-orange und Zellkerne durch DAPI blau. Abb. 4.6d zeigt die VE-Cadherin Färbung von unbehandelten HPMEC (links) und mit 200 ng/ml PLY für sechs Stunden

stimulierten HPMEC (rechts). Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt. Die Zellkontakte sind sowohl bei HPMEC ohne als auch mit PLY-Stimulation gut erhalten. Eine ähnliche Darstellung zeigt Abb. 4.6e. Hier ist die VE-Cadherin Färbung von unbehandelten HPMEC (links), sowie mit *S.p.* WT (Mitte) und mit *S.p.* Δ PLY (rechts) infizierten HPMEC abgebildet. Auch hierfür wurde jeweils ein repräsentativer Ausschnitt ausgewählt. Die VE-Cadherin Färbung zwischen den Zellen von HPMEC mit und ohne *S.p.* Behandlung ist gleichmäßig, was für regelrechte Zell-Zell-Kontakte zwischen den HPMEC spricht.

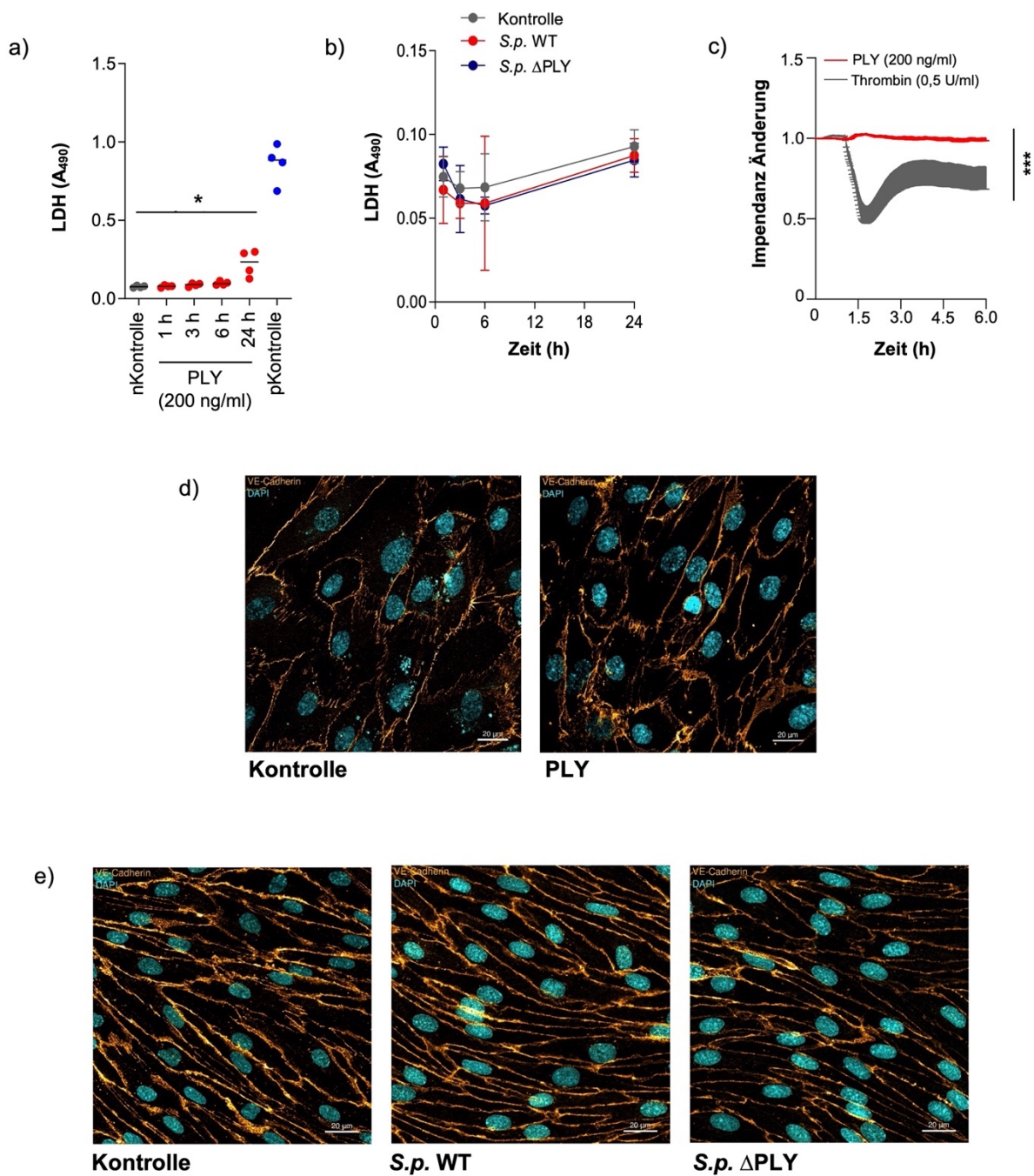


Abbildung 4.6: Kein Einfluss von PLY auf Endothelzellbarriere und Zellintegrität von HPMEC. a) LDH-Aktivität in HPMEC nach Stimulation mit 200 ng/ml PLY; als Positivkontrolle (pKontrolle) wurde 0,1 % Triton X-100 verwendet; grau repräsentiert die Negativkontrolle (nKontrolle), blau repräsentiert die pKontrolle und rot repräsentiert HPMEC mit PLY Stimulation; n=4; *p<0,05. b) LDH Aktivität in HPMEC welche mit S.p. WT oder S.p. ΔPLY infiziert wurden in Abhängigkeit von der Inkubationszeit; grau repräsentiert die Negativkontrolle (Kontrolle), rot repräsentiert S.p. WT und blau repräsentiert S.p. ΔPLY; n=4. c) ECIS Messung in HPMEC nach Stimulation mit 200 ng/ml PLY (rot) oder mit 0,5 U/ml Thrombin (grau) als Positivkontrolle in Abhängigkeit von der Zeit; ***p<0,001. d-e) VE-Cadherin Färbung von HPMEC d) nach Stimulation mit 200 ng/ml PLY für 6 h + Kontrolle (n=4) und e) nach 6 h Infektion mit S.p. WT oder S.p. ΔPLY + Kontrolle (n=3); repräsentative Bilder sind dargestellt.

4.6 Die HA-Freisetzung durch Pneumolysin erfolgt nicht-enzymatisch

Sowohl enzymatische Prozesse als auch die vermehrte Freisetzung von TNF- α und ROS führen zu einem Abbau der Glykokalyx und Freisetzung ihrer Bestandteile²⁸. Es sollte deswegen untersucht werden, ob PLY einen Einfluss auf die Aktivität dieser Prozesse hat, und den HA-Abbau hierdurch bedingt.

Abb. 4.7 zeigt die Genexpression verschiedener HYAL und HAS in HPMEC, ohne (grau) und mit 200 ng/ml PLY-Stimulation für vier Stunden (rot). Es sind jeweils sechs Experimente als ΔC_T mit $\beta 2M$ als Referenzgen dargestellt. Die Genexpression von HYAL1 (a), HYAL2 (b), HYAL3 (c), HAS2 (e) und HAS3 (f) ist in HPMEC mit PLY-Stimulation im Vergleich zu Zellen ohne PLY-Stimulation nicht statistisch signifikant erhöht oder erniedrigt. Die Genexpression von HAS1 (d) in HPMEC mit PLY-Stimulation ist jedoch zu jener in nicht stimulierten HPMEC statistisch signifikant erhöht ($p < 0,05$).

In Abb. 4.8 ist die HYAL-Aktivität an der Zelloberfläche (a) und im Zellmedium (b) von HPMEC ohne (grau) und mit 200 ng/ml PLY-Stimulation für sechs Stunden (rot) abgebildet. Es wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt und dargestellt. Zwischen der HYAL-Aktivität von HPMEC mit und ohne PLY-Stimulation zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Abb. 4.9 verdeutlicht die Genexpression (a) und Protein Konzentration (b) von TNF- α in HPMEC ohne (grau) und mit 200 ng/ml PLY-Stimulation für vier Stunden (rot). Es wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt und dargestellt. In Abb. 4.9a sind die Werte als ΔC_T mit PBGD als Referenzgen präsentiert. Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Genexpression und Protein Konzentration von TNF- α zwischen HPMEC mit und ohne PLY-Stimulation.

Die Änderungen der mROS-Produktion sind in Abb. 4.10a dargestellt. Es wurden fünf Experimente von HPMEC ohne (grau) und mit 200 ng/ml PLY-Stimulation für vier Stunden (rot) untersucht. Die mROS-Produktion ist in HPMEC mit PLY-Stimulation statistisch signifikant höher als in der Negativkontrolle ($p < 0,05$). Der Einfluss von MT auf den HA-Abbau von HPMEC mit und ohne vorherige 200 ng/ml PLY-Stimulation für vier Stunden ist in Abb. 4.10b verdeutlicht. MT bewirkt eine Inhibition der mROS Produktion und diente zur Verifizierung der zuvor in Abb.4.10a erbrachten Ergebnisse¹³². Es wurde die HA-Konzentration im Zellmedium von HPMEC mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die HA-Level von vier Gruppen: HPMEC ohne Behandlung mit PLY und MT (Kontrollgruppe, grau), HPMEC mit PLY-Behandlung, HPMEC mit PLY- und MT-

Behandlung und HPMEC mit MT- aber ohne PLY-Behandlung (alle rot). Insgesamt wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Anstieg der HA-Konzentration im Zellmedium von HPMEC, welche nur mit PLY stimuliert wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,01$). Durch die zusätzliche Behandlung der PLY stimulierten HPMEC mit MT sinkt die HA-Konzentration jedoch statistisch signifikant ab ($p < 0,05$). Abb. 4.10c präsentiert die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Mitochondrien von HPMEC ohne (links) und mit 200 ng/ml PLY-Stimulation für vier Stunden. Die Mitochondrien der Zellen wurden zuvor mittels MitoSOX gefärbt (rosa), die Zellkerne mittels DAPI (gelb). Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten. Es gibt keinen Hinweis auf Veränderungen im Mitochondrien Netzwerk durch PLY.

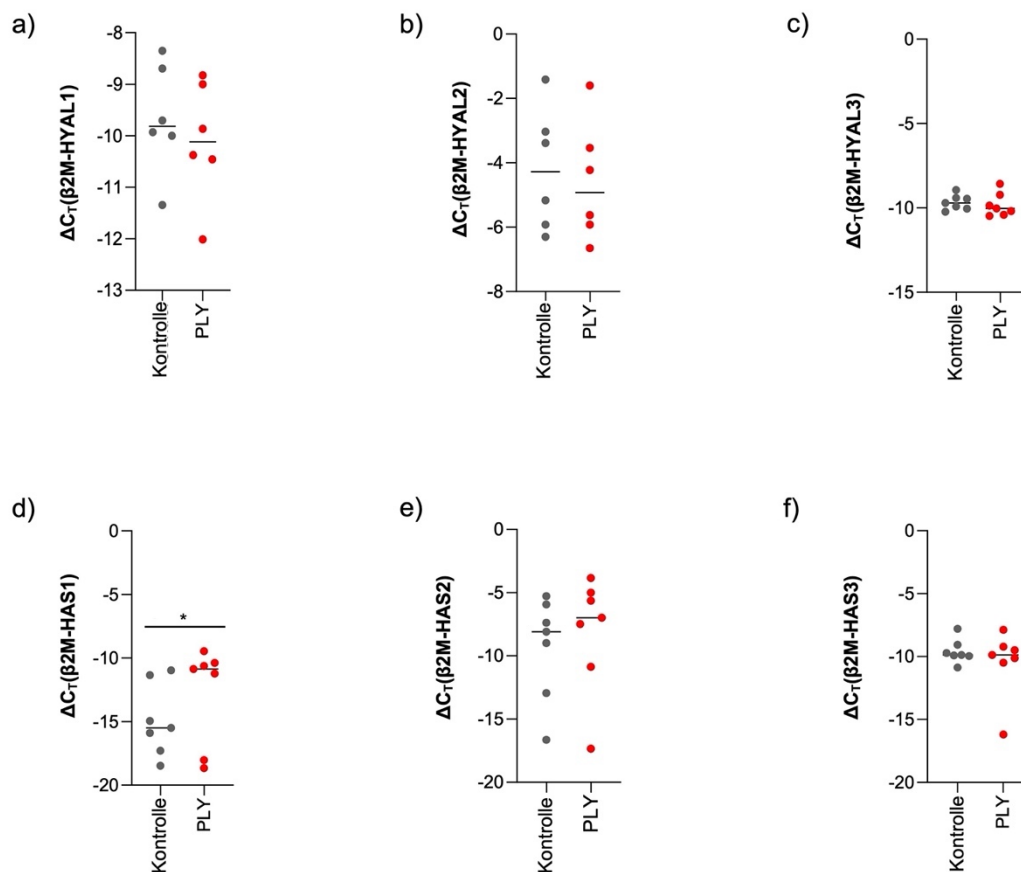


Abbildung 4.7: Genexpression von HYAL und HAS in PLY-stimulierten HPMEC. a-f) mRNA-Level von a) HYAL1, b) HYAL2, c) HYAL3, d) HAS1, e) HAS2 und f) HAS3 in HPMEC vor (grau) und nach (rot) Stimulation mit 200 ng/ml PLY für 4 h; $n=6$; die qPCR Daten sind als ΔC_t dargestellt und $\beta 2M$ als Referenzgen verwendet; $*p < 0,05$.

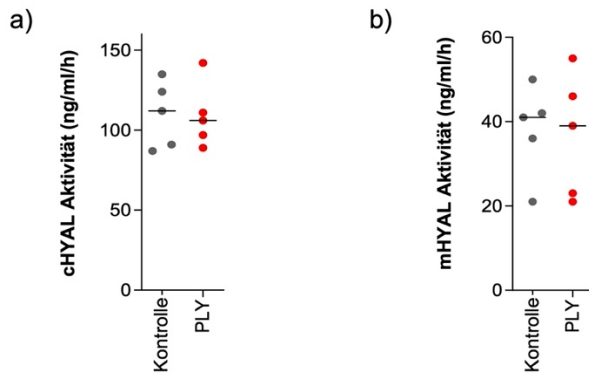


Abbildung 4.8: HYAL-Aktivität von HPMEC nach PLY-Stimulation. a-b) HYAL-Aktivität a) an der Zelloberfläche und b) im Zellmedium von HPMEC vor (grau) und nach (rot) Stimulation mit 200 ng/ml PLY für 6 h; n=5.

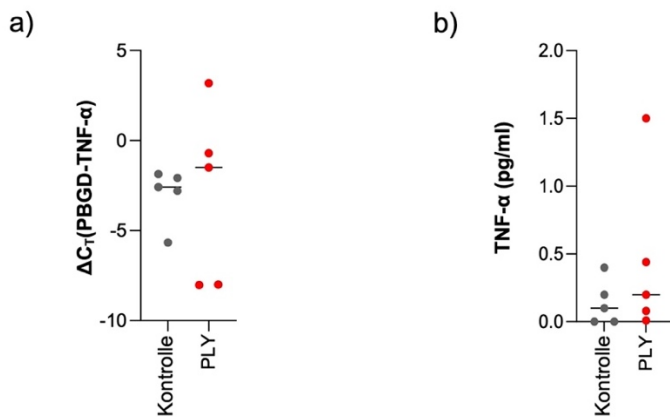


Abbildung 4.9: TNF- α im Zellmedium von HPMEC nach PLY-Stimulation. a) Genexpression von TNF- α in HPMEC vor (grau) und nach (rot) Stimulation mit 200 ng/ml PLY für 4 h; n=5; die qPCR Daten sind als ΔC_T dargestellt und PBGD als Referenzgen verwendet. b) Proteinkonzentration von TNF- α im Zellmedium von HPMEC vor (grau) und nach (rot) Stimulation von 200 ng/ml für 4 h; n=5; gemessen via ELISA.

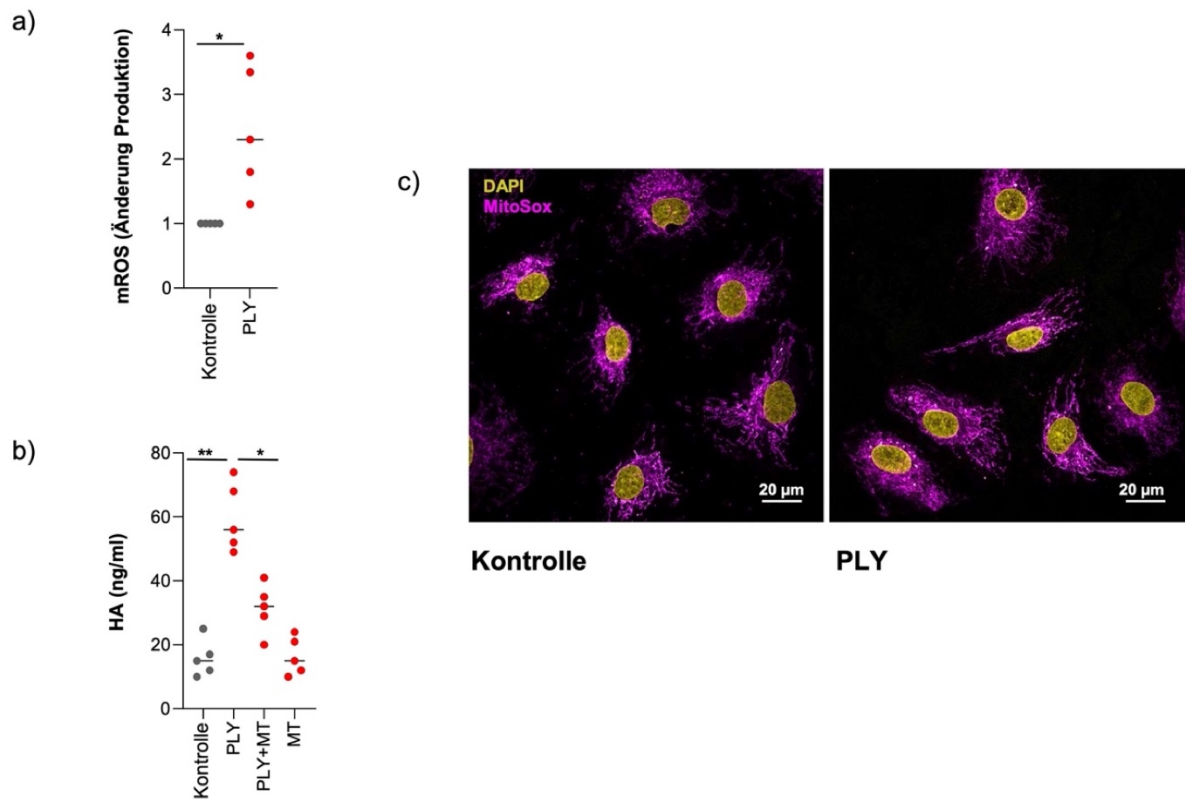


Abbildung 4.10: Änderung der mROS-Produktion in HPMEC nach PLY-Stimulation. a) Änderungen der mROS-Produktion in HPMEC vor (grau) und nach (rot) Stimulation mit 200 ng/ml PLY für 4 h; n=5; *p<0,05. b) Einfluss von MitoTEMPOL (MT) auf den HA-Abbau von HPMEC nach Stimulation mit 200 ng/ml PLY für 4 h; n=5; *p<0,05; **p<0,01; gemessen via ELISA. c) MitoSOX Färbung der Mitochondrien in HPMEC ohne und mit 200 ng/ml PLY-Stimulation für 4 h; repräsentative Bilder sind dargestellt; n=3.

4.7 Pneumolysin verursacht HA-Abbau aus der Glykokalyx von HPMEC

Um das Ausmaß des HA-Abbaus auf der Oberfläche von HPMEC zu untersuchen, wurden zelluläres HA mit HABP gefärbt (Abb. 4.11a) und die Höhe (Abb. 4.11b) und Fläche (Abb. 4.11c) des HAs quantitativ untersucht. Abb. 4.11a zeigt die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von HPMECs, welche ohne (links) und mit *S.p.* WT (zweite von links) oder mit *S.p.* Δ PLY (zweite von rechts) infiziert wurden. Zur Kontrolle, ob HABP lediglich HA markiert, wurden nicht infizierte HPMEC mit HYAL behandelt (rechts). Zelluläres HA wurde mittels Alexa Fluor 488 (gebunden über HABP) rosa und die Zellkerne (DNA) mittels DAPI gelb gefärbt. In der oberen Reihe der Abbildung sind sowohl die DAPI- als auch die HA-Färbung dargestellt. In der unteren Reihe sieht man lediglich das markierte HA. Es wurden exemplarische Bildausschnitte ausgewählt. Durch die Behandlung mit HYAL war kein HA mehr in der HPMEC vorhanden, weswegen keine Färbung möglich war (rechts). Im Vergleich zur Negativkontrolle (links) ist nach der Behandlung mit *S.p.* WT (zweite von links) deutlich weniger zelluläres HA in HPMEC vorhanden. Dieser Effekt verringert sich jedoch, sobald die HPMEC mit *S.p.* Δ PLY (zweite von rechts) behandelt werden. Ähnliche Ergebnisse präsentierten sich auch bei der quantitativen Ermittlung der Höhe und Fläche der zellulären HA-Moleküle. Abb. 4.11b zeigt dabei die ermittelte Höhe der HA-Moleküle von HPMEC ohne (grau) und mit *S.p.* WT (rot) oder mit *S.p.* Δ PLY (blau) Behandlung. In Abb. 4.11c sind die Ergebnisse jeweils für die Fläche der zellulären HA-Moleküle dargestellt. Sowohl die Höhe als auch die Fläche der HA-Moleküle von HPMEC welche mit *S.p.* WT infiziert wurden, ist im Vergleich zur Negativkontrolle und zu *S.p.* Δ PLY infizierten HPMEC statistisch signifikant geringer ($p < 0,01$).

Die elektronenmikroskopische Aufnahme (Abb. 4.11d) von HPMEC ohne (links) und mit 200 ng/ml PLY-Stimulation für vier Stunden (rechts) verdeutlicht den Einfluss von PLY auf die EG der Endothelzellen. Die Abbildung stellt repräsentative Beispielbilder dar. Die schwarzen Pfeile demonstrieren die EG. Auf der Zellmembran der unbehandelten HPMEC sitzt die EG lückenlos an. Von der Zellmembran der PLY-stimulierten HPMEC ist die EG hingegen abgelöst und befindet sich frei von dieser neben den Zellen.

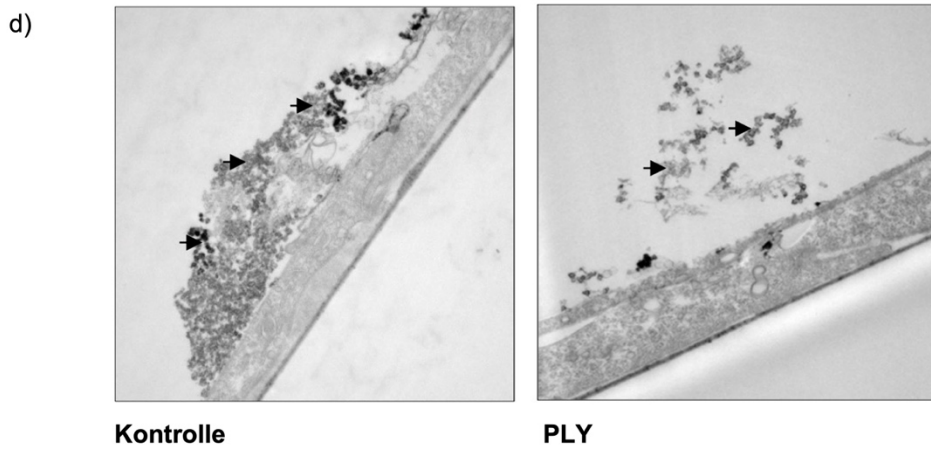
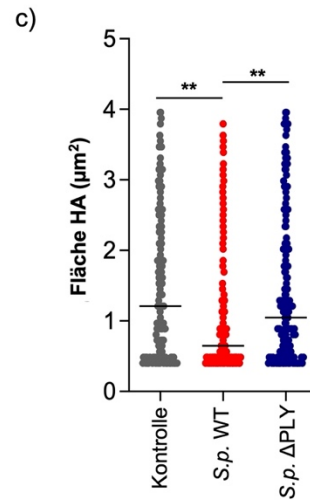
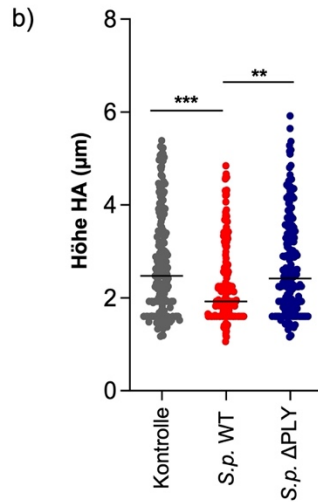
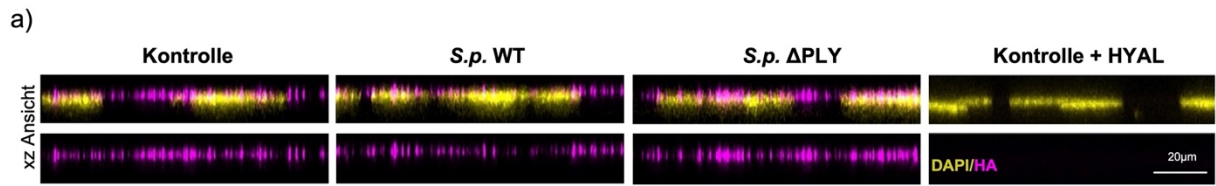


Abbildung 4.11: Mikroskopische Darstellung des HA- und EG-Abbaus durch PLY. a) HA-Färbung von HPMEC welche mit *S.p.* WT und *S.p.* ΔPLY infiziert wurden; zur Kontrolle wurden nicht-infizierte HPMEC mit HYAL behandelt; n=3; repräsentative xz Ansichten dargestellt. b-c) Quantitative Darstellung der b) Höhe und c) Fläche von HA an der Oberfläche von *S.p.* WT und *S.p.* PLY infizierten HPMEC; grau repräsentiert die Negativkontrolle (Kontrolle), rot repräsentiert *S.p.* WT und blau repräsentiert *S.p.* ΔPLY; **p<0,01; ***p<0,001. d) Elektronenmikroskopische Aufnahme von HPMEC vor und nach Stimulation mit 200 ng/ml PLY für 4 h; Pfeile demonstrieren die EG; n=3; repräsentative Bilder dargestellt.

5. Diskussion

5.1 Gelöstes HA im Plasma von CAP- und ARDS-Patienten

Der Abbau der EG spielt eine zentrale Rolle bei inflammatorischen Prozessen und kritischen Erkrankungen, wie Ischämie und Trauma⁵⁵. Die Zerstörung dieser Struktur ist nicht nur mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität zahlreicher Erkrankungen assoziiert, sondern bestimmt grundlegend die Pathophysiologie und den Verlauf vieler Pathologien^{28,78,131}. In den Lungengefäßen nimmt die EG einen wichtigen Stellenwert ein, weswegen ihr inflammatorischer Abbau von besonderer Bedeutung ist. So führt der EG-Abbau in Lungengefäßen zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität und damit zur Entstehung von Lungenödem⁶⁶. ARDS ist beispielsweise durch die Dysfunktion der alveolären-endothelialen Barriere und hierdurch entstehende Lungenödeme gekennzeichnet. Es gibt Hinweise darauf, dass die Zerstörung der EG für den Pathomechanismus von ARDS mitverantwortlich ist^{41,55}. Es haben sich schon zahlreiche Studien mit den Prozessen, die zum EG-Abbau in den Lungengefäßen führen, beschäftigt. Besonderes Augenmerk galt dabei den indirekten Lungenerkrankungen, die durch Sepsis bedingt sind. So konnten Schmidt et al. demonstrieren, dass es in der Anwesenheit von zirkulierenden pathogen-assoziierten molekularen Mustern in EC zu einer schnellen Aktivierung von Heparanasen und folglich zum Abbau der EG kommt. Die Experimente zeigten, dass Mäuse, bei welchen die Heparanase ausgeschaltet wurde, einen gewissen Schutz vor Lungenerkrankungen hatten, die durch eine nicht-pulmonale Sepsis bedingt waren¹¹³. Interessanterweise konnten diese Ergebnisse jedoch nicht von Morris et al. bei Heparanase-negativen Mäusen mit Inhalationstraumata wiederholt/reproduziert werden⁸⁸. Der Unterschied zu den Versuchen von Schmidt et al. war hierbei, dass es sich bei einem Inhalationstrauma um eine direkte und nicht, wie bei einer nicht-pulmonalen Sepsis, um eine indirekte Lungenerkrankung handelt. Dass sich die Abbauprozesse der EG zwischen direkten und indirekten Lungenerkrankungen unterscheiden, konnte auch auf molekularbiologischer Ebene bewiesen werden^{91,112}.

Der HA-Abbau scheint dabei bei direkten Lungenerkrankungen eine besondere Rolle einzunehmen. So wurde zum Beispiel eine Anreicherung an freiem HA im Plasma von ARDS-Patienten beschrieben^{112,113}. Dennoch gibt es nur wenige ausreichende Daten zu HA-Plasmaspiegeln, dessen Abbaumechanismus und den strukturellen Merkmalen dieser HA-Fragmente in CAP- und ARDS-Patienten. Die nähere Untersuchung der Plasmakonzentration von HA in Patienten mit direkten Lungenerkrankungen im Vergleich zu Gesunden lag somit nah. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich hierbei nicht

nur, dass die HA-Plasmaspiegel der Lungenerkrankten im Allgemeinen höher waren als jene der Gesunden, sondern auch, dass sich Assoziationen zwischen der Höhe der HA-Konzentration und dem Schweregrad der Erkrankung ziehen lassen. So wiesen Patienten, welche ARDS als Folge von CAP entwickelt hatten, höhere Werte als CAP-Patienten auf. Vorherige Studien zeigten, dass der Inflammationsstatus von CAP-assoziierten ARDS-Patienten deutlich höher ist als jener von CAP-Patienten^{23,101,117}. Die Höhe des HA-Spiegels ist somit ein Zeichen für die Stärke der vorherrschenden Inflammation in der Lunge. Zur Einschätzung des Schweregrades der CAP- und ARDS-Patienten, wurden verschiedene klinische Parameter herangezogen. So korreliert der CRB-65 Score beispielsweise mit der Mortalität von Pneumonie Patienten und wird im klinischen Alltag zur Risiko- und Schweregradstratifizierung verwendet²⁷. Ein weiteres Merkmal stellt die Notwendigkeit für eine Behandlung auf ITS dar. CAP-Patienten, welche auf einer ITS therapiert werden müssen, weisen eine höhere Mortalität und ein stärkeres Risiko für die Entwicklung von Komplikationen auf⁹². Ähnliche Erkenntnisse gibt es auch über die Notwendigkeit einer Katecholamin-Therapie. Diese wird bei Patienten angewandt, um das kardiovaskuläre System zu stabilisieren und eine suffiziente Organperfusion zu garantieren. Patienten, welche unter der Notwendigkeit einer Katecholamin-Therapie stehen, sind extrem instabil und mit höherem Komplikationsrisiko behaftet als jene ohne die Notwendigkeit einer derartigen Therapie¹⁰⁵. Weitere klinische Parameter zur Angabe des Outcomes einer Erkrankung sind die 28-Tage-Mortalität und die Länge des Krankenhausaufenthalts^{1,97}. So stiegen die HA-Plasmaspiegel bei Patienten mit höherem CRB-65 Score, bei ITS-Aufenthalt, bei benötigter Katecholamin-Therapie, und bei höherer 28-Tage-Mortalität an. Lediglich bei der Länge des Krankenhausaufenthaltes war keine Korrelation mit der Höhe der HA-Plasmakonzentration erkennbar. Dies könnte auf das frühe Versterben einiger schwer kranker ARDS- und CAP-Patienten und die geringe Repräsentation von CAP-Patienten mit einem CRB-65 Score über 2 zurückgeführt werden. Letztendlich sprachen die erbrachten Daten dafür, dass der HA-Abbau bei direkten Lungenerkrankungen wie CAP und ARDS eine wichtige Rolle spielt und sogar mit dem Schweregrad und Outcome zusammenhängt.

Schon in der Vergangenheit wurde die besondere Stellung des HAs bei Entzündungsprozesse erkannt. Einen wichtigen Einfluss scheint dabei die Größe von HA-Fragmenten im Blut zu haben. Hierbei liegt HMW HA vermehrt unter antiinflammatorischen und LMW HA und kleinere HA-Fragmente unter proinflammatorischen Bedingungen vor. HMW HA übernimmt eine protektive Funktion²⁸. HMW HA kann beispielsweise die Genexpression von NF- κ B und von

einigen Interleukinen herunterregulieren und sogar intra- und extrazelluläre ROS neutralisieren^{16,45}. Eine gehäufte Ansammlung von LMW HA ließ sich in der Vergangenheit hingegen bei entzündlichen Erkrankungen feststellen²⁸. Das vermehrte Vorliegen von kurzen HA-Fragmenten im Plasma von CAP- und ARDS-Patienten, im Vergleich zu Gesunden, war somit anzunehmen. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht reproduziert werden. So zeigte sich nicht nur eine vermehrte Ansammlung von HMW HA im Plasma von ARDS-Patienten, sondern auch eine Zunahme der Länge der HA-Moleküle mit dem Schweregrad der Erkrankung (CRB-65 Score). Eine Erklärung für das Auftreten von großen HA-Fragmenten im Plasma kritisch kranker Patienten könnte die Aktivierung eines Schutzmechanismus der EC sein, um Entzündungsprozesse zu dämpfen. Die Zellen könnten unter inflammatorischen Bedingungen die Produktion von HA hierfür verstärken. Als eine weitere mögliche Erklärung könnte es sich jedoch auch um einen Ausdruck dafür handeln, dass der EG-Abbau recht grob erfolgt und hierdurch HA in voller Länge abgebaut wird. Durch eine vermehrte Reaktion auf starke Entzündungsprozesse und eine übermäßige ROS-Produktion könnte HA verstärkt freigesetzt werden. Die Korrelation zwischen der HA-Konzentration und der Konzentration verschiedener Entzündungsproteine (IL-1 β , -6, -8, -10, TNF- α , RANTES, MCP-1) im Plasma von Erkrankten stützt diese Hypothese. Es konnte gezeigt werden, dass mit steigender HA-Konzentration auch die Konzentration von IL-6 im Plasma statistisch signifikant höher ist. Ob die vermehrte Freisetzung von IL-6 den Abbau von HA bedingt oder die Freisetzung von HA in das Plasma die Ausschüttung von IL-6 verstärkt, scheint dadurch jedoch nicht geklärt. Letztendlich müssten weitere Forschungsarbeiten diese Hypothesen untersuchen.

Aus der EG abgebautes HA kann nicht nur die weitere Freisetzung von Entzündungsmediatoren auslösen, sondern auch eine Dysfunktion der endothelialen Barriere induzieren⁵⁵. Der Abbau der BM bei ARDS wurde schon in vorherigen Studien beobachtet und mit endothelialer Dysfunktion, Ödembildung und starker Infiltration von Immunzellen in die Lunge in Verbindung gebracht⁴¹. Koll. IV ist ein Marker für BM Instabilität¹²⁰. Es konnte in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation zwischen der Höhe der HA-Konzentration und der Höhe des Koll. IV Plasmaspiegels festgestellt werden. Und auch die Höhe des Plasmalevels von CD62e, einem Marker für Endothelzellaktivierung⁴⁸, korrelierte in den durchgeführten Experimenten mit der von HA. Es scheint zudem einen Zusammenhang zwischen der Länge des im Plasma gelösten HAs und der Konzentration von Koll. IV zu geben. Koll. IV und CD62e korrelieren somit mit HA-Parametern, welche bei kritisch Kranken erhöht sind. Je stärker die inflammatorische Reaktion und der HA-Abbau, desto stärker scheint auch die

endotheliale Dysfunktion. Bereits Queisser et al. konnten nachweisen, dass es als Reaktion auf freigesetzte HA-Fragmente bei SARS-CoV-2 Infektionen zur Zerstörung der EC-Barriere kommt⁹⁹. Es ist also möglich, dass die Zerstörung der EG erforderlich ist, um zu Veränderungen in der Organisation der BM und somit zur Zerstörung der endothelialen Barrierefunktion zu führen.

5.2 Der Einfluss von Pneumolysin auf den HA-Abbau

Es konnte in Studien gezeigt werden, dass bakterielle Pathogene dazu fähig sind, die Zellen des befallenen Wirts abzubauen, um ihre Virulenz zu steigern^{133,134}. Hierbei scheinen Virulenzfaktoren der Bakterien eine entscheidende Rolle zu spielen. Walev et al. stellten zum Beispiel fest, dass Streptolysin O und Hämolysin den Abbau von Lipopolysaccharid (CD14) und IL-6-Rezeptoren fördern¹³⁴. Weitere Berichte von Vollmer et al. verdeutlichten, dass es in Kulturüberständen von *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* und *Listeria monocytogenes* zur Freisetzung von IL-6-Rezeptoren von der Zelloberfläche kommt¹³³. Obwohl in letzterem Beispiel die hinter der Pathologie steckenden Mechanismen noch nicht abschließend identifiziert wurden, deuten die genannten Studien darauf hin, dass bakterielle Virulenzfaktoren zu einer Modulation des Zelloberflächenproteoms führen können. Es besteht also die Möglichkeit, dass einer der Mechanismen hinter dem EG-Abbau ebenfalls eine solche bakterielle Modulation ist.

Der häufigste bakterielle Erreger von CAP ist *S.p.*¹⁰⁹. Aus vorherigen Studien von Mai et al. und Jedrzejewski et al. ist bereits bekannt, dass *S.p.* HA von der Zelloberfläche enzymatisch abbauen kann. Dies geschieht durch die *S.p.*-Hyaluronatlyase (SpnHL), ein Oberflächenenzym des Bakteriums, welches das Eindringen in den menschlichen Organismus erleichtert. Durch SpnHL kann Bindegewebe, insbesondere mittels HA-Abbau, zerstört werden und der Erreger seinen Wirt befallen. Dieser Virulenzfaktor hilft somit dem Erreger durch Veränderungen des Oberflächenproteoms in den Organismus einzudringen^{56,75}. *S.p.* hat jedoch noch eine Reihe an weiteren signifikanten Virulenzfaktoren. Neben der Polysaccharidkapsel und verschiedenen Oberflächenproteinen und -enzymen, ist dies insbesondere das Toxin PLY⁸⁶. PLY scheint dabei einen Einfluss auf inflammatorische Prozesse zu haben. So konnte von Rubins et al. gezeigt werden, dass PLY-negative Pneumokokken in Mäuselungen im Vergleich zum PLY-positiven Wildtyp die Inflammation deutlich reduzieren. Als Virulenzfaktor von *S.p.* induziert es eine frühe Zerstörung der Alveolar-Kapillar-Barriere.

Es wurde zudem ein Anstieg der Bakterienzahl in PLY behandelten Mäuselungen nach drei und sechs Stunden beobachtet¹⁰⁷. Das Toxin könnte demzufolge eine wichtige Rolle bei frühen inflammatorischen Reaktionen der *S.p.*-Pneumonie spielen. Auch der Abbau von HA und die damit verbundene Abnahme der EG wurden als frühe Prozesse während der Inflammation beschrieben³³. Der mögliche Einfluss von PLY auf den HA-Abbau sollte demzufolge in dieser Arbeit untersucht werden. Hierfür wurden HPMEC zum einen direkt mit PLY stimuliert und zum anderen durch die Infektion mit *S.p.* WT dem PLY indirekt ausgesetzt. Als Kontrolle diente die Infektion mit *S.p.* Δ PLY, eine PLY-negative Mutante des Wildtyps. Wurde zuvor im Plasma kritisch Kranker ein Anstieg der HA-Konzentration beobachtet, so konnten nun vergleichbare Ergebnisse durch die PLY-Stimulation erzielt werden. Im Zellmedium der HPMEC stiegen die HA-Level nach der Behandlung mit PLY an. Je länger die PLY-Inkubation erfolgte, und je höher die Konzentrationen an PLY waren, desto größer war die gemessene HA-Konzentration. Der höchste Anstieg der HA-Konzentration erfolgte bis zur sechsten Stunde und bei einer Konzentration von 200 ng/ml PLY. Die Vermutung, dass sich der frühe HA-Abbau durch PLY triggern lässt, lag also nahe. Dies ließ sich auch fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch in der vorliegenden Arbeit bestätigen. So zeigte sich im EM ein Abbau der EG nach der Stimulation mit PLY. Zudem konnte durch die Analyse und Auswertung fluoreszenzmikroskopischer Daten gezeigt werden, dass der PLY-positive *S.p.* WT zu einer Reduktion des HAs auf der Oberfläche der HPMEC führt. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die erhöhten Mengen an HA im Zellmedium der HPMEC nach PLY-Stimulation tatsächlich durch den Abbau aus der EG verursacht sind. Es wurde zudem durch die PLY-Stimulation vermehrt HMW HA abgebaut. Es ließen sich also mit PLY, sei es durch eine direkte oder indirekte Stimulation der HPMEC, ähnliche Ergebnisse beobachten wie zuvor im Plasma von schwer kranken Patienten mit direkter Lungenerkrankung.

Wie zuvor beschrieben, scheint der HA-Abbau mit der Zerstörung der Endothelzellbarriere einherzugehen^{55,99}. So konnte auch in der vorliegenden Arbeit, wie unter dem Punkt 5.1 beschrieben, eine Korrelation zwischen der Höhe der HA-Plasmaspiegel und der Koll. IV bzw. CD62e Plasmakonzentration, beides Marker endothelialer Dysfunktion, beobachtet werden. Dies konnte jedoch durch PLY in den ersten sechs Stunden nicht provoziert werden. Weder eine direkte noch eine indirekte PLY-Stimulation führten zu einer Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte, einer erhöhten Aktivität von LDH oder einer Änderung in der Zellform. Nach etwa 24 Stunden direkter und indirekter Stimulation mit PLY stieg die LDH-Aktivität der HPMEC an. Bei der LDH-Aktivität handelt es sich um einen Marker für den Untergang von Zellen, welcher mit

endothelialer Dysfunktion bzw. der Zerstörung der Zellmembran einhergeht⁶⁴. Eine mögliche Erklärung der Beobachtungen könnte sein, dass die durchgeführten Messungen zur EC-Barriere Integrität über einen zu kurzen Zeitraum durchgeführt wurden. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte sein, dass die notwendige Schwellenkonzentration der HA-Fragmente nicht erreicht wurde, um zu einer Zerstörung der EC-Barriere zu führen. Die durch HA-induzierte Zerstörung der endothelialen Barriere könnte somit ein Prozess sein, der nicht initial, sondern erst im Verlauf einer Inflammation auftritt. Weitere Erforschungen PLY-induzierter Prozesse könnten genauere Aufklärung erbringen.

Für das weitere Verständnis, welcher Mechanismus hinter dem PLY-induzierten HA-Abbau stecken könnte, wurden in der vorliegenden Arbeit enzymatische Prozesse untersucht. Hyaluronidasen sind Enzyme, welche HA spalten können. Insgesamt gibt es sechs Gene, die für humane Hyaluronidasen kodieren: HYAL1 bis 4, HYAL-P1 und PH-20. PH-20 liegt vor allem im Testikel vor und hat seine höchste Konzentration im Kopf und Akrosomen der menschlichen Spermatozoen. Bei HYAL-P1 handelt es sich lediglich um ein Pseudogen, welches für kein funktionelles Protein kodiert. HYAL4 findet sich besonders in der menschlichen Plazenta und Skelettmuskeln. Es gibt zudem erste Hinweise darauf, dass es sich bei HYAL4 um eine Chondroitinase, ohne Einfluss auf HA, handelt. Die übrigen drei HYAL kommen in verschiedenen humanen Organen vor, und wurden deswegen für die Analyse ausgewählt^{83,121}. Weder die Expression von HYAL1, HYAL2 und HYAL3 noch deren Aktivität an der Zelloberfläche oder im Zellmedium waren nach PLY-Stimulation verändert. Ein PLY-getriggert enzymatischer Abbau von HA durch HYAL liegt somit nicht vor. Ergänzend wurde zudem die Genexpression von HA-Synthasen betrachtet. Es gibt drei Isoenzyme der HAS (HAS1 bis 3), welche HA an der Plasmamembran synthetisieren³³. Die Expression von HAS2 und HAS3 war nach PLY-Stimulation nicht erhöht. Eine Zunahme der HAS1 Expression nach der Inkubation mit PLY war jedoch zu beobachten. HAS1 steht mit der schützenden Produktion von HMW HA in Verbindung, wie sie auch vermehrt nach PLY-Stimulation zu beobachten war¹³⁵. Dies stützt die Hypothese, dass es sich bei der vermehrten Ansammlung von HMW HA im Plasma kritisch Kranker um einen Schutzmechanismus handeln könnte. Neben enzymatischen Prozessen sollten auch andere Mechanismen untersucht werden, welche hinter dem PLY-getriggertem HA-Abbau stecken könnten. TNF- α wurden in der Vergangenheit häufig mit dem Abbau der EG in Verbindung gebracht²⁸. Es konnte hier jedoch kein Zusammenhang zwischen der Expression oder der Konzentration von TNF- α mit der PLY-Stimulation dargestellt werden. In vorherigen Studien wurde zudem die inflammatorische ROS-Produktion als Ursache des EG-Abbaus angegeben²⁸. Auch

in der vorliegenden Arbeit stieg die mROS-Produktion nach PLY-Stimulation in HPMEC an. Der Virulenzfaktor scheint also einen Einfluss hierauf zu nehmen. Durch den zusätzlichen Einfluss von MT, welches eine Inhibition der mROS-Produktion bewirkt¹³², erniedrigte sich zudem die, durch PLY-Stimulation bedingt, erhöhte HA-Konzentration im Zellmedium von HPMEC. Dadurch kann angenommen werden, dass eine erhöhte mROS-Produktion, welche durch PLY-Stimulation bedingt sein kann, möglicherweise den Abbau von HA verursacht. Ein Hinweis auf Änderungen im Mitochondrien Netzwerk durch PLY konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Um die Prozesse hinter dem HA-Abbau genauer verstehen zu können sind weitere Untersuchungen erforderlich.

5.3 Limitation der Arbeit

Einige Punkte sollten für das bessere Verständnis der Ergebnisse dieser Arbeit kritisch betrachtet werden. So standen für die Experimente mit Plasmaproben nur eine kleine Zahl an CAP- und ARDS-Probanden zur Verfügung (CAP: n=118; ARDS: n=39). Die erbrachten Ergebnisse benötigen jedoch eine größere klinische Validierung, um sie für die Praxis sicher anwenden zu können. Ein weiterer Punkt, der die Aussagekraft der Daten limitiert, ist die Verwendung von Plasmaproben, welche lediglich zu einem einzigen Zeitpunkt abgenommen wurden. Die Proben spiegeln somit Momentaufnahmen wider. Deswegen war es auch wichtig, die PLY-Experimente zu verschiedenen Zeitpunkten auszuwerten. Dynamische Entwicklungen konnten anhand der Plasmaproben nicht aufgefunden gemacht werden. Für die Verwendung der HA-Konzentration als Vorhersagewert in ALLs, müssten weitere Untersuchungen mit aufeinander folgenden Proben durchgeführt werden. Des Weiteren hinderte das Vorhandensein begrenzter Plasmamengen die ausreichende Auswertung der HA-Größe bei allen Probanden. Eine Beziehung zwischen Krankheitskausalität und der Ansammlung von HA unterschiedlicher Größe konnte somit nicht untersucht werden.

Letztendlich sind auch die Ergebnisse aus den PLY-Experimenten nicht vollständig mit jenen der Plasmaproben vergleichbar. Bei den CAP- und ARDS-Patienten, von welchen die Plasmaproben stammten, lag ein sehr breites Spektrum an kausalen Pathogenen zu Grunde. So lag bei 44 % der CAP-Patienten eine virale, bei 20 % eine bakterielle und bei 8 % eine virale und bakterielle Infektion als Ursache der Pneumonie vor. Bei 28 % gab es demzufolge sogar gar keine Angabe zur Ursache. Ähnlich sah es bei den Patienten mit ARDS nach schwerer CAP aus. Bei 44 % dieser lag eine virale, bei 27 % eine bakterielle und bei 3 % eine virale und bakterielle Infektion vor. Für 26 % dieser

Patienten gab es folglich ebenfalls keine Angabe zur Ursache. Die Freisetzung von HA in das Plasma dieser Erkrankten kann somit nur für den geringen Anteil an Patienten, der eine bakterielle Infektion mit *S.p.* hatte, durch den PLY-getriggerten HA-Abbau erklärt werden. Für alle anderen Patienten müssen weitere Erklärungsansätze gefunden werden. Der HA-Abbau scheint durch viele verschiedene Faktoren stimuliert zu werden. Der Virulenzfaktor PLY scheint nur einer von vielen Ursachen zu sein. Dennoch sind die Erkenntnisse, welche durch die Versuche mit PLY und *S.p.* gewonnen wurden, nicht weniger bedeutsam und können auch in Zukunft einen Weg ebnen, um die Mechanismen hinter dem HA- und EG-Abbau bei ALIs besser verstehen zu können.

6. Schlussfolgerung

Der Abbau der EG in Lungengefäßen hat einen massiven Einfluss auf die Funktion der Lunge. So können durch die Zerstörung der alveolären-endothelialen Barriere vermehrt Lungenödeme entstehen, durch Neutrophilen-Adhäsion inflammatorische Prozesse verstärkt, und die Regulation des Vasotonus der Lungengefäße gestört werden ⁶⁶. Schlussendlich fördert all dies das Fortschreiten der Erkrankung. Umso wichtiger ist es in den letzten Jahren geworden, die Mechanismen hinter dem Abbau der EG und die Rolle der im Plasma gelösten Bausteine zu ergründen. So wurde im Plasma von ARDS-Patienten bereits in der Vergangenheit eine erhöhte Menge an gelöstem HA festgestellt, sowie eine Korrelation dieser mit einer vergrößerten Morbidität und Mortalität ^{10,112,139}. Vergangene Studien haben gezeigt, dass sich die Prozesse hinter dem EG-Abbau zwischen direkten und indirekten Lungenerkrankungen unterscheiden ^{91,112}. Weitere Forschungen auf diesem Gebiet können also von grundlegender Bedeutung sein und das Verständnis der Komplexität von ALIs und dessen Folgen fördern.

Diese Arbeit hat zahlreiche neue Erkenntnisse über die Prozesse des EG-Abbaus bei ALIs gebracht. Der Abbau von HA und dessen Freisetzung in das Plasma scheint eine zentrale Rolle bei direkten Lungenerkrankungen zu spielen. So kann die Plasmakonzentration des HAs Auskunft über den Schweregrad der Inflammation und das Outcome von Patienten geben. Dies zeigt, dass der Abbauprozess einen wesentlichen Einfluss auf den Verlauf von ALIs hat. Durch die weitere Untersuchung der HA-Plasmaspiegel, könnten diese zukünftig eine Rolle bei der Einschätzung zur Prognose von Patienten spielen. Aussagen über die Progredienz der alveolären-endothelialen Barriere Dysfunktion wären durch das Wissen über HA-Plasmakonzentrationen möglich. Aber auch die protektive Funktion von HA darf an dieser Stelle nicht unterschätzt werden. Der Hinweis darauf, dass HMW HA im Plasma kritisch kranker Patienten vermehrt vorzukommen scheint, war ein neues Ergebnis dieser Arbeit. Es ist bis jetzt weitestgehend bekannt, dass HMW HA anti-inflammatorische Wirkungen hat ²⁸. Ob hinter der vermehrten Freisetzung von HMW HA bei ARDS-Patienten ein Schutzmechanismus der Lunge steckt oder es die Folge von grobem Abbau des HAs ist, könnte Gegenstand neuer Forschungen sein. Möglich wäre jedoch, dass sich hier eine Chance auf neue Therapieformen von ALIs mittels HMW HA eröffnet. Auch die Ergebnisse der PLY-Experimente haben neue Einblicke in die Mechanismen hinter dem EG- bzw. HA-Abbau ermöglicht. Sie bestätigen bereits zuvor erbrachte Hinweise darauf, dass Virulenzfaktoren einen Einfluss auf das Zelloberflächenproteom ihres Wirtes haben können ^{133,134}. So könnten sich hier ebenfalls

durch weitere Forschungen Möglichkeiten für neue Therapieoptionen aufbringen. Der schnelle HA-Abbau kann durch PLY nicht-enzymatisch getriggert werden. Bereits in der Vergangenheit beschriebene durch ROS ausgelöste Prozesse scheinen die Ursache hierfür zu sein. Es erfordert jedoch weitere Untersuchungen, um die genauen Abläufe dahinter verstehen zu können. Und auch wenn PLY nicht den HA-Abbau aller ALIs erklären kann, so hat es dennoch einen hohen Stellenwert. Als häufigster Erreger von CAP, können neue Erkenntnisse über Virulenz steigernde Mechanismen von *S.p.* in Zukunft von großer Bedeutung sein ¹⁰⁹. Zudem können sie helfen, die Pathomechanismen weiterer Erreger zu verstehen und zu bekämpfen.

7. Zusammenfassung

Die endotheliale Glykokalyx (EG) ist eine gelartige, kohlenhydratreiche Schicht an der luminalen Seite der Endothelzellen (EC). Sie ragt in die Blutgefäße hinein und steht unter ständiger Interaktion mit den Bestandteilen des Blutes. Ihre Aufgaben sind sehr vielschichtig und reichen von der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks in den EC, über Regulation des Vasotonus und der Immunantwort zu der Vermittlung von anti-koagulativen Effekten. Durch den Einfluss verschiedener Pathologien, wie beispielsweise Inflammation, Trauma oder Ischämie, kann die Integrität der EG gestört werden. Durch unterschiedliche Prozesse, sei es direkt über Enzyme oder indirekt über zytokin-vermittelte Reaktionen, kommt es zum Abbau der EG und zur Freisetzung ihrer Bestandteile in das Plasma. Die Zerstörung der EG scheint auch ein wesentlicher Mechanismus bei akuten Lungenerkrankungen zu sein. Hierbei wurde insbesondere der Abbau von Hyaluronan (HA), ein Baustein der EG, mit direkten akuten Lungenerkrankungen assoziiert. Durch den Abbau des HAs können Plasmaproteine, und mit ihnen Flüssigkeit, durch die defekten vaskulären Zellwände in das Innere der Lunge strömen und führen so zu Lungenödem. Zudem kommt es zu einer vermehrten Adhäsion von Neutrophilen und der Fehlregulation des Vasotonus in den Lungengefäßen. Das gelöste HA könnte somit einen Biomarker für die zustande gekommene endotheliale Dysfunktion darstellen. Dies sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Hierfür wurde die HA-Konzentration und dessen Größe im Plasma von Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie (CAP) und akutem Atemnotsyndrom (ARDS) gemessen und mit klinischen Parametern korreliert. Die HA-Konzentration war im Plasma von Erkrankten im Vergleich zu Gesunden erhöht und korrelierte zudem mit dem Schweregrad der Lungenerkrankung, gemessen anhand von CRB-65 Score, ITS-Aufenthalt, Katecholamin-Therapie und 28-Tage-Mortalität. Desweiteren zeigte sich eine Korrelation der HA-Plasmaspiegel mit derer von Markern der Endothelzellaktivität (E-Selectin) und der Basalmembraninstabilität (Kollagen IV). Die Länge des im Plasma gelösten HAs korrelierte sowohl mit dem Schweregrad der Erkrankung (CRB-65 Score) als auch mit jenem der Basalmembran Zerstörung. Pneumolysin (PLY), ein Virulenzfaktor des häufigsten Pneumonie Erregers *Streptococcus pneumoniae* (S.p.), führte zu einer übermäßigen Freisetzung von HA aus humanen mikrovaskulären EC der Lunge (HMPEC). Die Lösung des HAs aus der Zelloberfläche war dabei abhängig von der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Dementgegen war sie jedoch nicht mit der Zerstörung der endothelialen Barriere assoziiert. Zudem wurde die wichtige Rolle des

PLY für den HA-Abbau in HPMEC unter *S.p.* Infektion demonstriert. So setzten HPMEC, welche mit einer PLY-negativen *S.p.* Mutante infiziert waren, weniger HA frei als jene, welche mit dem *S.p.* Wildtyp infiziert wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Einblick in den Mechanismus, welcher sich hinter dem HA-Abbau unter pulmonalen Infektionen verbirgt. Es konnte sowohl die Korrelation von löslichem HA mit dem Schweregrad akuter Lungenerkrankungen als auch die wichtige Rolle des PLY auf den HA-Abbau in HPMEC verdeutlicht werden. All dies kann dabei helfen, die Pathomechanismen von direkten Lungenerkrankungen, wie CAP und ARDS, besser zu verstehen und eröffnet die Möglichkeit neuer Therapien.

8. Summary

On the luminal side of the endothelial cells (EC) there is a gel-like and carbohydrate-enriched layer called the endothelial glycocalyx (EG). It protrudes into the blood vessels and is in constant interaction with the components of the blood. It has diverse functions, such as stabilization of oncotic pressure in EC, regulation of vasotonus and immune response, and anti-adhesive effects. The integrity of the EG can be disturbed during various pathologies, such as inflammation, trauma, or ischemia. EG degradation and release of its components into plasma are caused by different enzymatic and non-enzymatic processes. EG destruction is also a hallmark of acute lung injury. In particular, the shedding of hyaluronan (HA), a component of EG, has been associated with direct acute lung injury. HA degradation allows plasma proteins, and with them fluid, to permeate through the vessel wall, leading to the formation of lung edema. In addition, there is increased adhesion of neutrophils and dysregulation of the vasotonus in the pulmonary vessels. As such, soluble HA may represent a biomarker for impaired vascular barrier function. This should be further investigated in this work.

Therefore, we analyzed the levels and size of HA in plasma of patients with community-acquired pneumonia (CAP) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) and correlated them to various clinical parameters. Compared to healthy donors, the HA plasma levels were increased in patients with acute lung injury and correlated with the severity of disease, measured by CRB-65 score, ICU stay, catecholamine therapy, and 28-day mortality. There was also a correlation between the plasma levels of HA and the markers of EC activity (E-selectin) and basement lamina destruction (collagen IV). In addition, the size of soluble HA was associated with the disease severity (CRB-65 score) and basement lamina destruction. Pneumolysin (PLY), a virulence factor of the most common pneumonia pathogen *Streptococcus pneumoniae* (*S.p.*), triggered an excessive release of HA from human pulmonary microvascular EC (HPMEC). The shedding of HA from the cell surface was dependent on reactive oxygen species production. Conversely, the release of HA from HPMEC was not linked to endothelial barrier dysfunction. Additionally, the important role of PLY in HA shedding during the infection of HPMEC with *S.p.* was demonstrated. We could show that HPMEC infected by *S.p.* PLY-deficient mutant released less HA compared to HPMEC infected with *S.p.* wildtype.

The results of this work give an insight into the mechanisms of HA degradation in pulmonary infections. We could demonstrate the correlation of soluble HA with the

severity of acute lung diseases and the important role of PLY in HPMEC HA degradation. Our findings may help to explain pathomechanisms of direct lung injuries such as CAP and ARDS and open new possibilities for therapies.

9. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ALI	akute Lungenerkrankung
ARDS	akutes Atemnotsyndrom (Acute Respiratory Distress Syndrome)
β2M	β-2-Mikroglobulin
BM	Basalmembran
BMI	Body Mass Index
BRISQ	Biospecimen reporting for improved study quality
BSA	Rinderalbumin
<i>C.p.</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
CAP	ambulant erworbene Pneumonie (community-acquired pneumonia)
CD62e	Endothel Selektin (E-Selektin)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
CRB-65	confusion (Verwirrtheit), respiratory rate (Atemfrequenz) >30 /min, blood pressure (Blutdruck) systolisch ≤90 mmHg oder diastolisch ≤60 mmHg, >65 (über 65 Jahre)
CRP	C-reaktives Protein
CS	Chondroitinsulfat
C _T	cycle-threshold
CURB-65	confusion (Verwirrtheit), urea (Harnstoffkonzentration) >7 mmol/l, respiratory rate (Atemfrequenz) >30 /min, blood pressure (Blutdruck) systolisch ≤90 mmHg oder diastolisch ≤60 mmHg, >65 (über 65 Jahre)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ΔPLY	Pneumolysin-negative Mutante
DS	Dermatansulfat
EC	Endothelzellen
ECIS	Electric Cell-Substrate Impedance Sensing
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	endotheliale Glykokalyx
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie
FGF	Fibroblast Growth Factor
F _i O ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
FITC-HA-AuNPs	Hyaluronan Gold-Nanosonde
GAG	Glykosaminoglykane
GDA	Glutaraldehyd

GP	Glykoproteine
GTC	Guanidinthiocyanat
h	human
<i>H.i.</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HA	Hyaluronan
HABP	Hyaluronan-Binding-Protein
HAP	nosokomial erworbene Pneumonie (hospital-acquired pneumonia)
HAS	Hyaluronan-Synthase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazinyl)-ethanolsulfonsäure
HMW	High-molecular-weight
HPMEC	mikrovaskuläre Endothelzellen der menschlichen Lunge
HS	Heparansulfat
HYAL	Hyaluronidase
IL-	Interleukin-
ITS	Intensivstation
Koll. IV	Kollagen IV
KS	Keratinsulfat
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LMW	Low-molecular-weight
LOS	Länge des Aufenthalts (Lenght of Stay)
LPL	Lipoproteinlipase
<i>M.p.</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
männl.	männlich
MCP-1	chemoattraktives Monozytenprotein-1
MMP	Metalloprotease
MMW	Medium-molecular-weight
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
mROS	mitochondriale Reaktive Sauerstoffspezies
MT	MitoTEMPOL
NF-κB	Nuclear factor κB
NO	Stickoxid-vermittelt
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEEP	positiv endexpiratorischer Druck
PFA	Paraformaldehyd
PG	Proteoglykane
pH	Potential des Wasserstoffs
PLY	Pneumolysin
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
qPCR	Realtime-Polymerasekettenreaktion

RANTES	Chemokine Ligand 5
RIPA	Radioimmunopräzipitations-Assay-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	reverse Transkription
-RT	Ohne reverse Transkriptase
<i>S.a.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S.p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus typ 2
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SpnHL	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Hyaluronatlyase
TGF- β 1/2	Transforming Growth Factor β 1/2
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
TSG-6	Tumornekrosefaktor-stimulierendes-Gen-6-Protein
UV	Ultraviolett
VE-Cadherin	vascular endothelial Cadherin 5 (CD144)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
weibl.	weiblich
WLL	Weißlichtlaser
WT	Wildtyp

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: BRISQ-Meldekriterien der Studienkohorte

Tabelle 3.2: Klinische und demographische Eigenschaften der Patienten- und Kontrollkohorten

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Master Mix zur cDNA Synthese

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Master Mix zur qPCR

Tabelle 3.5: Reaktionszyklen der qPCR

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.1: HA-Konzentration im Plasma von Donoren und Patienten mit CAP und ARDS.

Abbildung 4.2: HA-Plasmakonzentration und ihre Assoziation mit dem Krankheitsschweregrad und Outcome.

Abbildung 4.3: Assoziation der HA-Größe im Plasma mit dem Schweregrad der Lungenerkrankung.

Abbildung 4.4: Korrelation der HA-Konzentration mit verschiedenen Plasmaproteinen.

Abbildung 4.5: Einfluss von PLY auf die Freisetzung von HA in das Zellmedium von HPMEC.

Abbildung 4.6: Kein Einfluss von PLY auf Endothelzellbarriere und Zellintegrität von HPMEC.

Abbildung 4.7: Genexpression von HYAL und HAS in PLY-stimulierten HPMEC.

Abbildung 4.8: HYAL-Aktivität von HPMEC nach PLY-Stimulation.

Abbildung 4.9: TNF- α im Zellmedium von HPMEC nach PLY-Stimulation.

Abbildung 4.10: Änderung der mROS-Produktion in HPMEC nach PLY-Stimulation.

Abbildung 4.11: Mikroskopische Darstellung des HA- und EG-Abbaus durch PLY.

12. Literaturverzeichnis

1. Abela L, Pace A, Buttigieg SC. What affects length of hospital stay? A case study from Malta. *J Health Organ Manag.* 2019;33(6):714-736. doi:10.1108/JHOM-10-2018-0280
2. Afratis N, Gialeli C, Nikitovic D, et al. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J.* 2012;279(7):1177-1197. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08529.x
3. Alphonsus CS, Rodseth RN. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia.* 2014;69(7):777-784. doi:10.1111/anae.12661
4. Arabyan N, Park D, Foutouhi S, et al. Salmonella Degrades the Host Glycocalyx Leading to Altered Infection and Glycan Remodeling. *Sci Rep.* 2016;6:29525. doi:10.1038/srep29525
5. Banavasi H, Nguyen P, Osman H, Soubani AO. Management of ARDS - What Works and What Does Not. *Am J Med Sci.* 2021;362(1):13-23. doi:10.1016/j.amjms.2020.12.019
6. Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res.* 2010;87(2):300-310. doi:10.1093/cvr/cvq137
7. Becker BF, Chappell D, Jacob M. Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Res Cardiol.* 2010;105(6):687-701. doi:10.1007/s00395-010-0118-z
8. Becker BF, Jacob M, Leipert S, Salmon AHJ, Chappell D. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. *Br J Clin Pharmacol.* 2015;80(3):389-402. doi:10.1111/bcp.12629
9. Bein T, Bischoff M, Brückner U, et al. S2e guideline: positioning and early mobilisation in prophylaxis or therapy of pulmonary disorders: Revision 2015: S2e guideline of the German Society of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine (DGAI). *Anaesthesist.* 2015;64 Suppl 1:1-26. doi:10.1007/s00101-015-0071-1

10. Benatti MN, Fabro AT, Miranda CH. Endothelial glycocalyx shedding in the acute respiratory distress syndrome after flu syndrome. *J Intensive Care*. 2020;8:72. doi:10.1186/s40560-020-00488-7
11. Beović B, Bonac B, Kese D, et al. Aetiology and clinical presentation of mild community-acquired bacterial pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003;22(10):584-591. doi:10.1007/s10096-003-0997-0
12. Bodmann KF, Grabein B, Kresken M. S2k guideline “Calculated parenteral initial treatment of bacterial infections in adults - update 2018”, 2(nd) updated version: Foreword. *GMS Infect Dis*. 2020;8:Doc20. doi:10.3205/id000064
13. Boulnois GJ. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol*. 1992;138(2):249-259. doi:10.1099/00221287-138-2-249
14. Broekhuizen LN, Mooij HL, Kastelein JJP, Stroes ESG, Vink H, Nieuwdorp M. Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(1):57-62. doi:10.1097/MOL.0b013e328321b587
15. Calfee CS, Matthay MA. Nonventilatory treatments for acute lung injury and ARDS. *Chest*. 2007;131(3):913-920. doi:10.1378/chest.06-1743
16. Campo GM, Avenoso A, Nastasi G, et al. Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(9):1170-1181. doi:10.1016/j.bbadis.2011.06.006
17. Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*. 1997;327 (Pt 1)(Pt 1):1-16. doi:10.1042/bj3270001
18. Carl M, Alms A, Braun J, et al. S3 guidelines for intensive care in cardiac surgery patients: hemodynamic monitoring and cardiocirculatory system. *Ger Med Sci*. 2010;8:Doc12. doi:10.3205/000101
19. Chappell D, Jacob M, Paul O, et al. The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell: an impressive structure ex vivo but not in culture. *Circ Res*. 2009;104(11):1313-1317. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.187831
20. Chaudhuri N, Whyte MKB, Sabroe I. Reducing the toll of inflammatory lung disease. *Chest*. 2007;131(5):1550-1556. doi:10.1378/chest.06-2869

21. Chelazzi C, Villa G, Mancinelli P, De Gaudio AR, Adembri C. Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. *Crit Care*. 2015;19(1):26. doi:10.1186/s13054-015-0741-z
22. Chen G, Wang D, Vikramadithyan R, et al. Inflammatory cytokines and fatty acids regulate endothelial cell heparanase expression. *Biochemistry*. 2004;43(17):4971-4977. doi:10.1021/bi0356552
23. Cillóniz C, Polverino E, Ewig S, et al. Impact of age and comorbidity on cause and outcome in community-acquired pneumonia. *Chest*. 2013;144(3):999-1007. doi:10.1378/chest.13-0062
24. Community-acquired pneumonia in adults in British hospitals in 1982-1983: a survey of aetiology, mortality, prognostic factors and outcome. The British Thoracic Society and the Public Health Laboratory Service. *Q J Med*. 1987;62(239):195-220.
25. Dalhoff K, Abele-Horn M, Andreas S, et al. [Epidemiology, Diagnosis and Treatment of Adult Patients with Nosocomial Pneumonia - Update 2017 - S3 Guideline of the German Society for Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, the German Society for Infectious Diseases, the German Society for Hygiene and Microbiology, the German Respiratory Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Radiological Society and the Society for Virology]. *Pneumologie*. 2018;72(1):15-63. doi:10.1055/s-0043-121734
26. Davydow DS, Desai SV, Needham DM, Bienvenu OJ. Psychiatric morbidity in survivors of the acute respiratory distress syndrome: a systematic review. *Psychosom Med*. 2008;70(4):512-519. doi:10.1097/PSY.0b013e31816aa0dd
27. DeLaney M, Khoury C. Community-acquired pneumonia in the emergency department. *Emerg Med Pract*. 2021;23(2):1-24.
28. Dogné S, Flamion B. Endothelial Glycocalyx Impairment in Disease: Focus on Hyaluronan Shedding. *Am J Pathol*. 2020;190(4):768-780. doi:10.1016/j.ajpath.2019.11.016
29. Dogné S, Flamion B, Caron N. Endothelial Glycocalyx as a Shield Against Diabetic Vascular Complications: Involvement of Hyaluronan and Hyaluronidases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(7):1427-1439. doi:10.1161/ATVBAHA.118.310839

30. Dogné S, Rath G, Jouret F, Caron N, Dessy C, Flamion B. Hyaluronidase 1 Deficiency Preserves Endothelial Function and Glycocalyx Integrity in Early Streptozotocin-Induced Diabetes. *Diabetes*. 2016;65(9):2742-2753. doi:10.2337/db15-1662
31. Dolsen MR, Crosswell AD, Prather AA. Links Between Stress, Sleep, and Inflammation: Are there Sex Differences? *Curr Psychiatry Rep*. 2019;21(2):8. doi:10.1007/s11920-019-0993-4
32. Ellison, III RT. Acute Pneumonia. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2014;(2015):823-846. doi:10.1016/B978-1-4557-4801-3.00069-2
33. Erickson M, Stern R. Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. *Biochem Res Int*. 2012;2012:893947. doi:10.1155/2012/893947
34. Ewig S, Kolditz M, Pletz M, et al. [Management of Adult Community-Acquired Pneumonia and Prevention - Update 2021 - Guideline of the German Respiratory Society (DGP), the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy (PEG), the German Society for Infectious Diseases (DGI), the German Society of Medical Intensive Care and Emergency Medicine (DGIIN), the German Viological Society (DGV), the Competence Network CAPNETZ, the German College of General Practitioners and Family Physicians (DEGAM), the German Society for Geriatric Medicine (DGG), the German Palliative Society (DGP), the Austrian Society of Pneumology Society (ÖGP), the Austrian Society for Infectious and Tropical Diseases (ÖGIT), the Swiss Respiratory Society (SGP) and the Swiss Society for Infectious Diseases Society (SSI)]. *Pneumologie*. 2021;75(9):665-729. doi:10.1055/a-1497-0693
35. Falguera M, Carratalà J, Ruiz-Gonzalez A, et al. Risk factors and outcome of community-acquired pneumonia due to Gram-negative bacilli. *Respirology*. 2009;14(1):105-111. doi:10.1111/j.1440-1843.2008.01371.x
36. Fan E, Brodie D, Slutsky AS. Acute Respiratory Distress Syndrome: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA*. 2018;319(7):698-710. doi:10.1001/jama.2017.21907
37. Fichtner F, Moerer O, Weber-Carstens S, Nothacker M, Kaisers U, Laudi S. Clinical Guideline for Treating Acute Respiratory Insufficiency with Invasive Ventilation and Extracorporeal Membrane Oxygenation: Evidence-Based Recommendations for

Choosing Modes and Setting Parameters of Mechanical Ventilation. *Respiration*. 2019;98(4):357-372. doi:10.1159/000502157

38. Fransson LA, Belting M, Cheng F, Jönsson M, Mani K, Sandgren S. Novel aspects of glypican glycobiochemistry. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(9):1016-1024. doi:10.1007/s00018-004-3445-0

39. Gharib AM, Stern EJ. Radiology of pneumonia. *Med Clin North Am*. 2001;85(6):1461-1491, x. doi:10.1016/s0025-7125(05)70391-6

40. Ginde AA, Blatchford PJ, Trzeciak S, et al. Age-related differences in biomarkers of acute inflammation during hospitalization for sepsis. *Shock*. 2014;42(2):99-107. doi:10.1097/SHK.0000000000000182

41. Gottschaldt U, Reske AW. Pathophysiologie des Lungenversagens. *Anästhesi Intensivmed*. 2018;59:249-264.

42. Griffiths RD, Hall JB. Intensive care unit-acquired weakness. *Crit Care Med*. 2010;38(3):779-787. doi:10.1097/CCM.0b013e3181cc4b53

43. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(4):388-416. doi:10.1164/rccm.200405-644ST

44. Haeger SM, Liu X, Han X, et al. Epithelial Heparan Sulfate Contributes to Alveolar Barrier Function and Is Shed during Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;59(3):363-374. doi:10.1165/rcmb.2017-0428OC

45. Halicka HD, Mitlitski V, Heeter J, Balazs EA, Darzynkiewicz Z. Attenuation of the oxidative burst-induced DNA damage in human leukocytes by hyaluronan. *Int J Mol Med*. 2009;23(5):695-699. doi:10.3892/ijmm_00000182

46. Harris EN, Weigel JA, Weigel PH. The human hyaluronan receptor for endocytosis (HARE/Stabilin-2) is a systemic clearance receptor for heparin. *J Biol Chem*. 2008;283(25):17341-17350. doi:10.1074/jbc.M710360200

47. Henry CB, Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol*. 1999;277(2):H508-514. doi:10.1152/ajpheart.1999.277.2.H508

48. Huang D, Ding Q, Chen S, Lü S, Zhang Y, Long M. E-selectin negatively regulates polymorphonuclear neutrophil transmigration through altered endothelial junction integrity. *FASEB J*. 2021;35(5):e21521. doi:10.1096/fj.202000662RR
49. Huang L, Zhang X, Ma X, et al. Berberine alleviates endothelial glycocalyx degradation and promotes glycocalyx restoration in LPS-induced ARDS. *Int Immunopharmacol*. 2018;65:96-107. doi:10.1016/j.intimp.2018.10.001
50. Huxley VH, Curry FE. Differential actions of albumin and plasma on capillary solute permeability. *Am J Physiol*. 1991;260(5 Pt 2):H1645-1654. doi:10.1152/ajpheart.1991.260.5.H1645
51. Ibrahim S, Ramamurthi A. Hyaluronic acid cues for functional endothelialization of vascular constructs. *J Tissue Eng Regen Med*. 2008;2(1):22-32. doi:10.1002/term.61
52. Iozzo RV. Perlecan: a gem of a proteoglycan. *Matrix Biol*. 1994;14(3):203-208. doi:10.1016/0945-053x(94)90183-x
53. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 2010;304(16):1787-1794. doi:10.1001/jama.2010.1553
54. jalexop. jalexop/glycoproteins_size: Release V1.2 (v1.2). Published online January 2022. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5841068>
55. Jedlicka J, Becker BF, Chappell D. Endothelial Glycocalyx. *Crit Care Clin*. 2020;36(2):217-232. doi:10.1016/j.ccc.2019.12.007
56. Jedrzejas MJ, Mewbourne RB, Chantalat L, McPherson DT. Expression and purification of Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase from Escherichia coli. *Protein Expr Purif*. 1998;13(1):83-89. doi:10.1006/prev.1997.0864
57. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:435-461. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337
58. Johnstone J, Majumdar SR, Fox JD, Marrie TJ. Viral infection in adults hospitalized with community-acquired pneumonia: prevalence, pathogens, and presentation. *Chest*. 2008;134(6):1141-1148. doi:10.1378/chest.08-0888

59. Jones BE, Jones J, Bewick T, et al. CURB-65 pneumonia severity assessment adapted for electronic decision support. *Chest*. 2011;140(1):156-163. doi:10.1378/chest.10-1296
60. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis*. 2016;63(5):e61-e111. doi:10.1093/cid/ciw353
61. Katz DS, Leung AN. Radiology of pneumonia. *Clin Chest Med*. 1999;20(3):549-562. doi:10.1016/s0272-5231(05)70235-5
62. Kinsella MG, Bressler SL, Wight TN. The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2004;14(3):203-234. doi:10.1615/critreveukaryotgeneexpr.v14.i3.40
63. Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules*. 2020;10(11). doi:10.3390/biom10111525
64. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6). doi:10.1101/pdb.prot095497
65. Lanks CW, Musani AI, Hsia DW. Community-acquired Pneumonia and Hospital-acquired Pneumonia. *Med Clin North Am*. 2019;103(3):487-501. doi:10.1016/j.mcna.2018.12.008
66. LaRivière WB, Schmidt EP. The Pulmonary Endothelial Glycocalyx in ARDS: A Critical Role for Heparan Sulfate. *Curr Top Membr*. 2018;82:33-52. doi:10.1016/bs.ctm.2018.08.005
67. Lawson PR, Reid KB. The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunol Rev*. 2000;173:66-78. doi:10.1034/j.1600-065x.2000.917308.x
68. Ledin J, Staats W, Li JP, et al. Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production. *J Biol Chem*. 2004;279(41):42732-42741. doi:10.1074/jbc.M405382200

69. Lennon FE, Singleton PA. Hyaluronan regulation of vascular integrity. *Am J Cardiovasc Dis*. 2011;1(3):200-213.
70. Li L, Ly M, Linhardt RJ. Proteoglycan sequence. *Mol Biosyst*. 2012;8(6):1613-1625. doi:10.1039/c2mb25021g
71. Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, et al. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax*. 2003;58(5):377-382. doi:10.1136/thorax.58.5.377
72. Lipowsky HH. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation*. 2005;12(1):5-15. doi:10.1080/10739680590894966
73. Luchsinger V, Ruiz M, Zunino E, et al. Community-acquired pneumonia in Chile: the clinical relevance in the detection of viruses and atypical bacteria. *Thorax*. 2013;68(11):1000-1006. doi:10.1136/thoraxjnl-2013-203551
74. Lukasz A, Hillgruber C, Oberleithner H, et al. Endothelial glycocalyx breakdown is mediated by angiopoietin-2. *Cardiovasc Res*. 2017;113(6):671-680. doi:10.1093/cvr/cvx023
75. Mai VQ, Vo TT, Meere M. Modelling hyaluronan degradation by streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase. *Math Biosci*. 2018;303:126-138. doi:10.1016/j.mbs.2018.07.002
76. Mandell LA. Community-acquired pneumonia: An overview. *Postgrad Med*. 2015;127(6):607-615. doi:10.1080/00325481.2015.1074030
77. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*. 2007;44 Suppl 2(Suppl 2):S27-72. doi:10.1086/511159
78. Martin L, Koczera P, Zechendorf E, Schuerholz T. The Endothelial Glycocalyx: New Diagnostic and Therapeutic Approaches in Sepsis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:3758278. doi:10.1155/2016/3758278
79. Mason RJ, Greene K, Voelker DR. Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am J Physiol*. 1998;275(1):L1-13. doi:10.1152/ajplung.1998.275.1.L1

80. Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:147-163. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130158
81. McCullers JA, Tuomanen EI. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front Biosci.* 2001;6:D877-889. doi:10.2741/mccullers
82. McDade TW, Meyer JM, Koning SM, Harris KM. Body mass and the epidemic of chronic inflammation in early mid-adulthood. *Soc Sci Med.* 2021;281:114059. doi:10.1016/j.socscimed.2021.114059
83. Menzel EJ, Farr C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett.* 1998;131(1):3-11. doi:10.1016/s0304-3835(98)00195-5
84. Metlay JP, Waterer GW, Long AC, et al. Diagnosis and Treatment of Adults with Community-acquired Pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(7):e45-e67. doi:10.1164/rccm.201908-1581ST
85. Meyer NJ, Gattinoni L, Calfee CS. Acute respiratory distress syndrome. *Lancet.* 2021;398(10300):622-637. doi:10.1016/S0140-6736(21)00439-6
86. Mitchell AM, Mitchell TJ. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(5):411-418. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03183.x
87. Miyashita N. Atypical pneumonia: Pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Respir Investig.* 2022;60(1):56-67. doi:10.1016/j.resinv.2021.09.009
88. Morris A, Wang B, Waern I, et al. The role of heparanase in pulmonary cell recruitment in response to an allergic but not non-allergic stimulus. *PLoS One.* 2015;10(6):e0127032. doi:10.1371/journal.pone.0127032
89. de la Motte CA, Drazba JA. Viewing hyaluronan: imaging contributes to imagining new roles for this amazing matrix polymer. *J Histochem Cytochem.* 2011;59(3):252-257. doi:10.1369/0022155410397760
90. Mulivor AW, Lipowsky HH. Inhibition of glycan shedding and leukocyte-endothelial adhesion in postcapillary venules by suppression of matrixmetalloprotease

activity with doxycycline. *Microcirculation*. 2009;16(8):657-666. doi:10.3109/10739680903133714

91. Murphy LS, Wickersham N, McNeil JB, et al. Endothelial glycocalyx degradation is more severe in patients with non-pulmonary sepsis compared to pulmonary sepsis and associates with risk of ARDS and other organ dysfunction. *Ann Intensive Care*. 2017;7(1):102. doi:10.1186/s13613-017-0325-y

92. Nair GB, Niederman MS. Updates on community acquired pneumonia management in the ICU. *Pharmacol Ther*. 2021;217:107663. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107663

93. Nandi A, Estess P, Siegelman MH. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J Biol Chem*. 2000;275(20):14939-14948. doi:10.1074/jbc.275.20.14939

94. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Mooij HL, et al. Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability. *J Appl Physiol (1985)*. 2008;104(3):845-852. doi:10.1152/jappphysiol.00440.2007

95. Oeyen SG, Vandijck DM, Benoit DD, Annemans L, Decruyenaere JM. Quality of life after intensive care: a systematic review of the literature. *Crit Care Med*. 2010;38(12):2386-2400. doi:10.1097/CCM.0b013e3181f3dec5

96. Parhar KKS, Zjadewicz K, Soo A, et al. Epidemiology, Mechanical Power, and 3-Year Outcomes in Acute Respiratory Distress Syndrome Patients Using Standardized Screening. An Observational Cohort Study. *Ann Am Thorac Soc*. 2019;16(10):1263-1272. doi:10.1513/AnnalsATS.201812-910OC

97. Prachanukool T, Sanguanwit P, Thodamrong F, Suttapanit K. The 28-Day Mortality Outcome of the Complete Hour-1 Sepsis Bundle in the Emergency Department. *Shock*. 2021;56(6):969-974. doi:10.1097/SHK.0000000000001815

98. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*. 2000;440(5):653-666. doi:10.1007/s004240000307

99. Queisser KA, Mellema RA, Middleton EA, et al. COVID-19 generates hyaluronan fragments that directly induce endothelial barrier dysfunction. *JCI Insight*. 2021;6(17). doi:10.1172/jci.insight.147472

100. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Published online 2021. <https://www.R-project.org/>
101. Rahmel T, Asmussen S, Karlik J, Steinmann J, Adamzik M, Peters J. Moxifloxacin monotherapy versus combination therapy in patients with severe community-acquired pneumonia evoked ARDS. *BMC Anesthesiol.* 2017;17(1):78. doi:10.1186/s12871-017-0376-5
102. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA.* 2012;307(23):2526-2533. doi:10.1001/jama.2012.5669
103. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 2007;454(3):345-359. doi:10.1007/s00424-007-0212-8
104. Reynolds JH, McDonald G, Alton H, Gordon SB. Pneumonia in the immunocompetent patient. *Br J Radiol.* 2010;83(996):998-1009. doi:10.1259/bjr/31200593
105. Riessen R, Tschritter O, Janssens U, Haap M. [Catecholamines: pro and contra]. *Med Klin Intensivmed Notfmed.* 2016;111(1):37-46. doi:10.1007/s00063-015-0011-5
106. Rom O, Avezov K, Aizenbud D, Reznick AZ. Cigarette smoking and inflammation revisited. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013;187(1):5-10. doi:10.1016/j.resp.2013.01.013
107. Rubins JB, Charboneau D, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew PW, Janoff EN. Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J Clin Invest.* 1995;95(1):142-150. doi:10.1172/JCI117631
108. Saguil A, Fargo MV. Acute Respiratory Distress Syndrome: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2020;101(12):730-738.
109. Said MA, Johnson HL, Nonyane BAS, et al. Estimating the burden of pneumococcal pneumonia among adults: a systematic review and meta-analysis of diagnostic techniques. *PLoS One.* 2013;8(4):e60273. doi:10.1371/journal.pone.0060273
110. Scheld WM. Developments in the pathogenesis, diagnosis and treatment of nosocomial pneumonia. *Surg Gynecol Obstet.* 1991;172 Suppl:42-53.

111. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
112. Schmidt EP, Li G, Li L, et al. The circulating glycosaminoglycan signature of respiratory failure in critically ill adults. *J Biol Chem*. 2014;289(12):8194-8202. doi:10.1074/jbc.M113.539452
113. Schmidt EP, Yang Y, Janssen WJ, et al. The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. *Nat Med*. 2012;18(8):1217-1223. doi:10.1038/nm.2843
114. Scott JE, Heatley F. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a ¹³C NMR study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(9):4850-4855. doi:10.1073/pnas.96.9.4850
115. Shah RD, Wunderink RG. Viral Pneumonia and Acute Respiratory Distress Syndrome. *Clin Chest Med*. 2017;38(1):113-125. doi:10.1016/j.ccm.2016.11.013
116. Shah RM, Gupta S, Angeid-Backman E, O'Donnell J. Pneumococcal pneumonia in patients requiring hospitalization: effects of bacteremia and HIV seropositivity on radiographic appearance. *AJR Am J Roentgenol*. 2000;175(6):1533-1536. doi:10.2214/ajr.175.6.1751533
117. Sligl WI, Marrie TJ. Severe community-acquired pneumonia. *Crit Care Clin*. 2013;29(3):563-601. doi:10.1016/j.ccc.2013.03.009
118. Soltés L, Stankovská M, Kogan G, Gemeiner P, Stern R. Contribution of oxidative-reductive reactions to high-molecular-weight hyaluronan catabolism. *Chem Biodivers*. 2005;2(9):1242-1245. doi:10.1002/cbdv.200590094
119. Song JW, Zullo J, Lipphardt M, et al. Endothelial glycocalyx-the battleground for complications of sepsis and kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(2):203-211. doi:10.1093/ndt/gfx076
120. Steffensen LB, Stubbe J, Lindholt JS, et al. Basement membrane collagen IV deficiency promotes abdominal aortic aneurysm formation. *Sci Rep*. 2021;11(1):12903. doi:10.1038/s41598-021-92303-y
121. Stern R, Kogan G, Jedrzejewski MJ, Soltés L. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnol Adv*. 2007;25(6):537-557. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.07.001

122. Sugahara KN, Murai T, Nishinakamura H, Kawashima H, Saya H, Miyasaka M. Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *J Biol Chem.* 2003;278(34):32259-32265. doi:10.1074/jbc.M300347200
123. Tarbell JM, Pahakis MY. Mechanotransduction and the glycocalyx. *J Intern Med.* 2006;259(4):339-350. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01620.x
124. Tarver RD, Teague SD, Heitkamp DE, Conces DJJ. Radiology of community-acquired pneumonia. *Radiol Clin North Am.* 2005;43(3):497-512, viii. doi:10.1016/j.rcl.2005.02.005
125. Tavianatou AG, Caon I, Franchi M, Piperigkou Z, Galesso D, Karamanos NK. Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *FEBS J.* 2019;286(15):2883-2908. doi:10.1111/febs.14777
126. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med.* 2017;377(6):562-572. doi:10.1056/NEJMra1608077
127. Tomaszefski JFJ. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med.* 2000;21(3):435-466. doi:10.1016/s0272-5231(05)70158-1
128. Toole BP. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr Opin Cell Biol.* 1990;2(5):839-844. doi:10.1016/0955-0674(90)90081-o
129. Torres A, Peetermans WE, Viegi G, Blasi F. Risk factors for community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Thorax.* 2013;68(11):1057-1065. doi:10.1136/thoraxjnl-2013-204282
130. Torres A, Serra-Batlles J, Ferrer A, et al. Severe community-acquired pneumonia. Epidemiology and prognostic factors. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144(2):312-318. doi:10.1164/ajrccm/144.2.312
131. Uchimido R, Schmidt EP, Shapiro NI. The glycocalyx: a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis. *Crit Care.* 2019;23(1):16. doi:10.1186/s13054-018-2292-6
132. Virgana R, Atik N, Gunadi JW, et al. MitoTEMPO Inhibits ROS-Induced Retinal Vascularization Pattern by Modulating Autophagy and Apoptosis in Rat-Injected Streptozotocin Model. *Life (Basel).* 2022;12(7). doi:10.3390/life12071061

133. Vollmer P, Walev I, Rose-John S, Bhakdi S. Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: liberation of membrane-anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the human interleukin-6 receptor. *Infect Immun.* 1996;64(9):3646-3651. doi:10.1128/iai.64.9.3646-3651.1996
134. Walev I, Vollmer P, Palmer M, Bhakdi S, Rose-John S. Pore-forming toxins trigger shedding of receptors for interleukin 6 and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(15):7882-7887. doi:10.1073/pnas.93.15.7882
135. Wang X, Balaji S, Steen EH, et al. High-molecular weight hyaluronan attenuates tubulointerstitial scarring in kidney injury. *JCI Insight.* 2020;5(12):136345. doi:10.1172/jci.insight.136345
136. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2000;342(18):1334-1349. doi:10.1056/NEJM200005043421806
137. Weber DJ, Sickbert-Bennett EE, Brown V, Rutala WA. Comparison of hospitalwide surveillance and targeted intensive care unit surveillance of healthcare-associated infections. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28(12):1361-1366. doi:10.1086/523868
138. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng.* 2007;9:121-167. doi:10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959
139. Yagmur E, Koch A, Haumann M, Kramann R, Trautwein C, Tacke F. Hyaluronan serum concentrations are elevated in critically ill patients and associated with disease severity. *Clin Biochem.* 2012;45(1-2):82-87. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.10.016
140. Yang X, Meegan JE, Jannaway M, Coleman DC, Yuan SY. A disintegrin and metalloproteinase 15-mediated glycocalyx shedding contributes to vascular leakage during inflammation. *Cardiovasc Res.* 2018;114(13):1752-1763. doi:10.1093/cvr/cvy167

13. Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Arbeit veröffentlicht:

Circulating hyaluronic acid signature in CAP and ARDS - the role of pneumolysin in hyaluronic acid shedding.

Agnes Sauer, Benjamin Seeliger, Katharina Jandl, Last Erfinanda, Jochen Wilhelm, Ioannis Alexopoulos, Nelli Baal, Anna Birnhuber, Sascha David, Tobias Welte, Guillermo Barreto, Ulrich Gärtner, Grazyna Kwapiszewska, Werner Seeger, Wolfgang M. Kübler, Liliana Schäfer, Małgorzata Wygrecka, Mitglieder der CAPNETZ Studiengruppe

Matrix Biology | Dezember 2022 (114:67-83) | doi: 10.1016/j.matbio.2022.11.003

Ko-Autorin in folgender Arbeit:

Effects of therapeutic plasma exchange on the endothelial glycocalyx in septic shock.

Klaus Stahl, Uta C. Hillebrand, Yulia Kiyan, Benjamin Seeliger, Julius J. Schmidt, Heiko Schenk, Thorben Pape, Bernhard M. W. Schmidt, Tobias Welte, Marius M. Hoeper, Agnes Sauer, Małgorzata Wygrecka, Christian Bode, Heiner Wedemeyer, Hermann Haller, Sascha David

Intensive Care Medicine Experimental | November 2021 (9(1):57) | doi: 10.1186/s40635-021-00417-4

14. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

15. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Prof. Dr. Małgorzata Wygrecka, die mir die Möglichkeit eröffnete diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Vielen Dank für die stets offenen Ohren, die aufgeopferte Zeit, die einfallsreichen Ideen und die schnellen Korrekturen. Ich weiß dies alles sehr zu schätzen.

Auch möchte ich mich an dieser Stelle bei der AG Kübler, der AG Kwapiszewska, Dr. Nelli Baal, Dr. Ioannis Alexopoulos, Dr. Jochen Wilhelm, PD Dr. Ulrich Gärtner und Prof. Dr. Trinad Chakraborty für die großartige Kollaboration und Hilfe bedanken. Ich danke zudem der Klinik für Pneumologie der medizinischen Hochschule Hannover, dem Institut für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie *CAPNETZ* für die Bereitstellung der Plasmaproben.

Vielen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe für die positive Atmosphäre im Labor - insbesondere Astrid und Fabian für ihre Unterstützung, ihre aufbauenden Worte und Ablenkung vom Laboralltag. Ein herzlicher Dank auch an Kim und Olivia für ihre tatkräftige Mithilfe.

Abschließend möchte ich mich hiermit bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, für ihre Liebe, Motivation und bedingungslosen Beistand.

Für Alexander. Ich habe es dir gesagt.