

Universitätsklinikum Ulm  
Zentrum für Chirurgie  
Klinik für Unfallchirurgie, Hand-, Plastische  
und Wiederherstellungschirurgie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. F. Gebhard

Rolle des Complementrezeptors C5L2 auf neutrophilen  
Granulozyten während experimenteller und klinischer Sepsis

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von Daniel Rittirsch  
geboren in Speyer am Rhein

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. K.-M. Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. med. M. Huber-Lang

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med U. Brückner

Tag der Promotion: 18. 07. 2008

# **Inhaltsverzeichnis**

	Seitenzahl
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Hintergrund	5
1.2 Die Definition der Sepsis	5
1.3 Das Complementsystem	7
1.4 Das C5a-Molekül	8
1.5 Der C5a-Rezeptor (C5aR)	9
1.6 Die Rolle von C5a und C5aR während der Sepsis	10
1.7 Der „C5a-like“-Rezeptor 2 (C5L2)	10
1.8 Zielsetzung	12
<b>2. Material und Methodik</b>	<b>13</b>
2.1 Material	13
2.2 Ethische Aspekte	13
2.3 Patienten- und Kontrollgruppenauswahl	13
2.4 Isolation der neutrophilen Granulozyten	16
2.5 Zelladjustierung und Vitalitätstestung	16
2.6 In vitro Simulation einer Complementaktivierung mit rekombinatem C5a	17
2.7 Messung der Produktion von Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	17
2.8 Proteinbestimmung	18
2.9 Western Blot Analyse	19
2.10 Durchflusszytometrie	20
2.11 ELISA	21
2.12 Experimentelle Sepsis durch Caecum-Ligatur und -Punktion (CLP)	22
2.13 Statistische Analyse	23

	Seitenzahl
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1 Nachweis der Expression von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten	24
3.2 Verlust von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten während experimenteller Sepsis	27
3.3 C5a-induzierte Reduktion von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten nach in vitro Simulation einer Complementaktivierung	29
3.4 Verlust von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten während klinischer Sepsis	34
<b>4. Diskussion</b>	<b>39</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>47</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>48</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>58</b>
7.1 Konsensuskriterien zur Definition der Sepsis	58
7.2 SOFA-Score	59
7.3 Votum der Ethikkommission	60
7.4 Patienteninformation	61
7.5 Einwilligungserklärung	62
7.6 Übereignungsvertrag	63
<b>8. Danksagung</b>	<b>64</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

AP	Alkalinphosphatase
ARDS	Schocklunge („Acute respiratory distress syndrome“)
Arg	Arginin
AST	Aspartataminotransferase
C3aR	C3a-Rezeptor
C5a <sub>desarg74</sub>	C5a ohne C-terminalen Argininrest
C5aR	C5a-Rezeptor
C5L2	„C5a-like“-Rezeptor 2
CLP	Caecum-Ligatur und -Punktion
DPBS	Phosphatpufferlösung („Dulbecco’s phosphate buffered saline“)
DRY	Asparaginsäure-Arginin-Tyrosin-Sequenz
ECL	„Enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymimmunoassay („Enzyme-linked immuno sorbent assay“)
FBS	fetales Rinderserum („Fetal bovine serum“)
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
fMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
fMLPR	fMLP-Rezeptor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
HBSS	physiologische Kochsalzlösung („Hank’s balanced salt solution“)
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase („Horseradish peroxidase“)
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül („Intercellular adhesion molecule“)
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Ktrl	Kontrolle
Leu	Leucin

LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
MAK	Membranangriffskomplex
MAP	arterieller Mitteldruck („Mean arterial pressure“)
MASP	MBL assoziierte Serinprotease
MBL	Mannose bindendes Lectin („Mannose binding lectin“)
Met	Methionin
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MOV	Multiorganversagen
Pa <sub>CO2</sub>	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
Pa <sub>O2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphatpufferlösung („Phosphate buffered saline“)
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck („Positive endexpiratory pressure“)
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMN	Neutrophile Granulozyten („Polymorphonuclear neutrophil granulocytes“)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Argarose-Gel-Elektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes („Standard error of the mean“)
Ser	Serin
SIRS	Ganzkörperentzündungsantwort („Systemic inflammatory response syndrome“)
SOFA-Score	„Sepsis-related organ failure assessment score“
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TTBS	Trispufferlösung („Tris buffered saline“ mit TWEEN 20)
TWEEN	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat

# 1. Einleitung

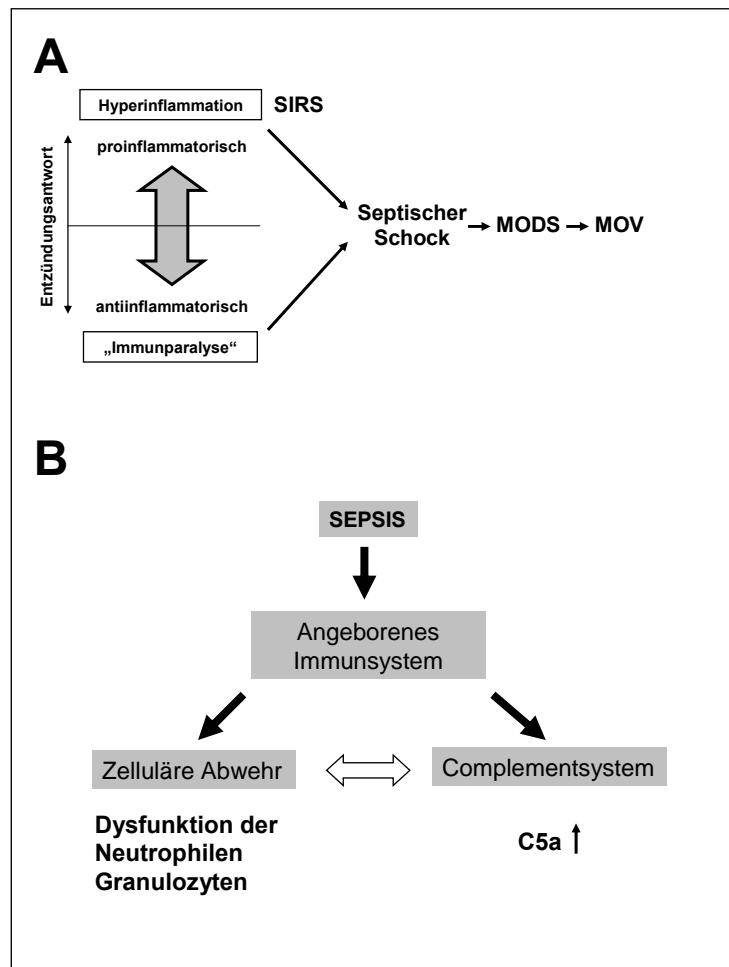
## 1.1 Hintergrund

Das Immunsystem dient als natürlicher Schutzschild gegen eindringende Mikroorganismen und deren Toxine [45]. Zwei tragende Säulen der angeborenen Körperabwehr sind das Complementsystem und die neutrophilen Granulozyten. Wird Körpergewebe durch Bakterien oder physikalische Einflüsse geschädigt, so kommt es in der Anfangsphase zu einer Complementaktivierung, begleitet von einer Aktivierung des frühen zellulären Abwehrsystems (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen) [85]. Durch die Störung der Gewebeintegrität leitet das Immunsystem als Antwort auf freiliegende oder invadierte pathogenassoziierte Molekülmuster („Pathogen-associated molecular patterns“) [36, 45] eine harmonisch abgestimmte, lokal begrenzte Entzündungsantwort ein, die durch humorale [11, 35, 53], zelluläre [11, 37] sowie neuronale [76] Mediatoren feinreguliert wird. Complementaktivierungsprodukte und das Zytokin-Chemokin-Netzwerk führen zusammen mit der Ausschüttung reaktiver Substanzen (wie z.B. Sauerstoffradikalen) zu den klassischen Entzündungszeichen [19]. Bei ausgeprägten Gewebetraumen (z. B. bei großen operativen Eingriffen, Polytrauma, ausgedehnten Verbrennungen, etc.) kann es durch eine überschießende Immunantwort mit einem Überwiegen der proinflammatorischen Mediatoren zu einem generalisierten Entzündungsprozess kommen.

## 1.2. Die Definition der Sepsis

Die generalisierte Entzündungsantwort wird als „Systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) bezeichnet und ist durch mindestens zwei der nachfolgenden Symptome charakterisiert [6]: Tachykardie, Tachypnoe, Hyper- oder Hypothermie und Leukozytose oder Leukopenie (Definitionskriterien s. Anhang 7.1., Tab. 3). Eine Sepsis liegt vor, wenn eine mikrobiologisch oder klinisch nachgewiesene Infektion die Ursache des SIRS ist [6]. Zeigt der Patient Zeichen der Organfunktionsstörung, Hypoperfusion oder Hypotension, spricht man von einer schweren Sepsis [6]. Dem septischen Schock liegt definitionsgemäß eine schwere Sepsis mit Hypotension trotz entsprechender Volumensubstitution zugrunde (Anhang 7.1., Tab. 3) [6].

Die frühe Phase der Sepsis wird vor allem durch eine Zunahme des SIRS bestimmt. Eine länger andauernde proinflammatorische Entzündungsreaktion wird durch die Netzwerke der Mediatoren und entsprechende Rückkopplungsmechanismen unterhalten und kann schließlich zu einer manifesten Unterdrückung der humoralen und zellvermittelten Immunfunktion führen (Abb. 1A) [19, 85]. Pro- und antiinflammatorische Mediatoren werden nach neuesten Erkenntnissen zeitgleich freigesetzt und die Immunantwort kann je nach Balance beider Systeme umschlagen. Bei Überwiegen der antiinflammatorischen Entzündungsantwort sind die Patienten aufgrund der bestehenden Immunsuppression insbesondere durch Sekundärinfektionen gefährdet (Abb. 1A). Bei fortschreitender Sepsis kann es zu einer Beeinträchtigung der Organfunktionen (Multiorgan dysfunktionssyndrom, MODS) [81] kommen, die letztendlich in ein Multiorganversagen (MOV) münden kann.



**Abb. 1 A:** Sequenz der systemischen Entzündungsantwort. SIRS = „Systemic inflammatory response syndrome“; MODS = Multiorgan dysfunktionssyndrom; MOV = Multiorganversagen. **B:** Rolle des angeborenen Immunsystems während der Sepsis. Die unkontrollierte Aktivierung des Complementsystems führt zur Beeinträchtigung der neutrophilen Granulozyten als wichtigste Vertreter der frühen zellulären Abwehr.



### 1.3 Das Complementsystem

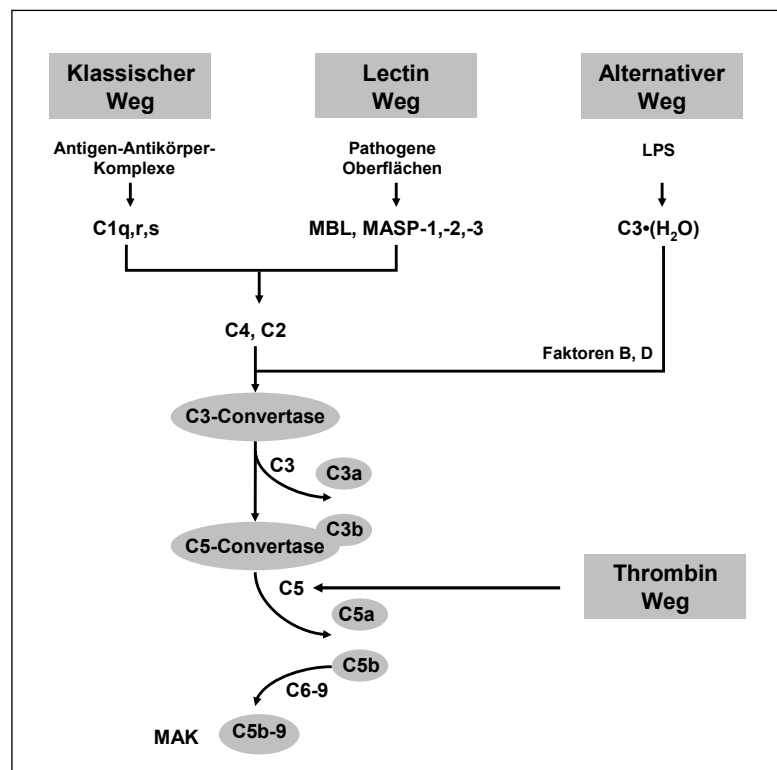
Insbesondere die unkontrollierte Aktivierung des Complementsystems mit übermäßiger Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a [27, 33] und nachfolgender Funktionsstörung der neutrophilen Granulozyten [7, 27, 73] scheint eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Sepsis zu spielen (Abb. 1B).

Als Complementsystem wird eine Gruppe von über 30 Plasmaproteinen zusammengefasst, die überwiegend in der Leber synthetisiert und entlang enzymatischer Kaskaden aktiviert werden. Sie gruppieren sich um neun Hauptkomponenten (C1 bis C9) [31]. Verletztes, verbranntes oder hypoxisches

Gewebe, Bakterien und deren Toxine oder Zellmembranfragmente können das Complementsystem über vier verschiedene Wege aktivieren [82]. Der klassische Weg wird in erster Linie durch Antikörper (hauptsächlich IgG-Immunkomplexe), aber auch durch akute Phase Proteine wie das C-reaktive Protein oder das Serum Amyloid Protein aktiviert. Der Kontakt mit

MBL als Bestandteil von Bakterienoberflächen führt zur Aktivierung von MBL-

assoziierten Serinproteasen (MASP-1, -2, -3), die anschließend C4 und C2 spalten (Lectin Weg). Der alternative Weg wird typischerweise durch gramnegative Bakterien, LPS und IgA-Immunkomplexe aktiviert. Darüber hinaus verstärkt eine ständig stattfindende spontane Hydrolyse von C3 zu C3b die Aktivierung dieses Weges [50, 82]. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass Thrombin als C5-Konvertase agieren kann, die unabhängig von C3 und C3b ist [38]. Jeder dieser Wege wird durch intrinsische Inhibitoren im Plasma und auf Zelloberflächen reguliert. Die Aktivierung zweier hintereinander geschalteter



**Abb. 2:** Vereinfachte Darstellung der vier Aktivierungswege des Complementsystems und ihrer gemeinsamen Endstrecke. MBL = „Mannose binding lectin“; MASP = MBL assoziierte Serinprotease; LPS = Lipopolysaccharide; MAK = Membranangriffskomplex.

Enzymkomplexe (C3-Convertase bzw. C5-Convertase) führt schließlich zur Spaltung von C3 bzw. C5 und damit zur Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a. Die gemeinsame Endstrecke aller Aktivierungswege mündet in der Formation der Proteine C5b-9 zum sog. Membranangriffskomplex (MAK), der Zellen und Bakterien lysieren kann [31, 50, 82] (Abb. 2).

#### 1.4 Das C5a-Molekül

Durch die C5-Convertase wird das C5-Molekül in die Fragmente C5a und C5b gespalten. Das 14 kDa große Glykoprotein C5a (74 Aminosäuren) besteht strukturell aus 4 antiparallelen  $\alpha$ -Helices, die einen mit Disulfidbrücken stabilisierten Kern bilden. Die Enden sind zum einen als relativ starrer Aminoterminal und zum anderen als frei beweglicher Carboxylschwanz geformt (Abb. 3) [42, 82]. Die fünf carboxyterminalen Aminosäuren (Met70, Gln71, Leu72, Gly73, Arg74) bilden das strukturelle Korrelat der biologischen Aktivität (Effektorregion). Für die volle Aktivität wird der endständige Argininrest verantwortlich gemacht [82]. Im Plasma wird C5a rasch von der Carboxypeptidase N durch Abspaltung des carboxyterminalen Arginins inaktiviert (C5a<sub>desarg74</sub>). Die Bindung des C5a-

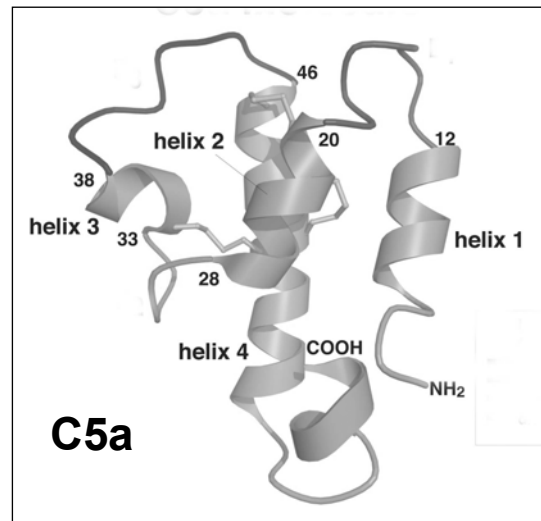


Abb. 3: Struktureller Aufbau des C5a-Moleküls (modifiziert nach Huber-Lang et al. [40]).

Moleküls an die aminoterminal Domäne des C5a-Rezeptors wird durch die kationischen Aminosäuren (His15, Lys19, Lys20, Arg37, Arg40, Arg46) der Helices 2 bis 4 und der interhelikalen Schleifen vermittelt [28, 82].

Funktionell betrachtet agiert C5a insbesondere für neutrophile Granulozyten als hochwirksames Chemotaxin und erhöht deren Bereitschaft zur Phagozytose. C5a stimuliert ferner neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen zur Synthese und Freisetzung von unterschiedlichen Enzymen, Zytokinen und Eicosanoiden und aktiviert den oxidativen Metabolismus der Zellen [44, 80]. Endothelzellen werden durch C5a zur Expression von Adhäsionsmolekülen (p-Selectin, ICAM-1) angeregt, die in Folge die Adhäsion und Aggregation von neutrophilen Granulozyten vermitteln. Die C5a-induzierte Ausschüttung

vasoaktiver Amine durch Endothelzellen hat eine Vasodilatation und Steigerung der Gefäßpermeabilität zur Folge [21, 25, 28]. Daneben kann C5a eine Histaminfreisetzung aus Mastzellen sowie die Kontraktion glatter Muskulatur induzieren [21]. Zusammengefasst steigert C5a als proinflammatorischer Mediator die Abwehrbereitschaft des angeborenen Immunsystems gegen eindringende Mikroorganismen. Der akuten und chronischen Überproduktion von C5a wird eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder zugeschrieben, wie z. B. myokardiale Ischämieschäden [4, 63], Asthma bronchiale [18], Sepsis [4, 70], Schocklunge (ARDS) [72] und Multiorganversagen (MOV) [39].

### 1.5 Der C5a-Rezeptor (C5aR)

Das Anaphylatoxin C5a übermittelt seine Signale über den C5a-Rezeptor (C5aR, CD88), der – wie viele andere Rezeptoren von Entzündungsmediatoren – aus 7 transmembranären Domänen besteht [25]. Das kodierende Gen ist auf Chromosom 19, Bandposition q13.2, lokalisiert [82]. C5aR gehört der Überfamilie der Rezeptoren vom Rhodopsin-Typ an und hat ein Molekulargewicht von 45 kDa [82]. Er wird in hoher Zahl auf Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (ca. 60 000/Zelle [80]) exprimiert, aber auch auf anderen immunologischen Zellen sowie auf verschiedensten nicht immunologischen Zelltypen (z. B. Gefäßendothelzellen, Bronchial- und Alveolarzellen, Nerven- und Gliazellen, Mesangium- und Tubulusepithelzellen der Niere) [82]. Neuere Untersuchungen des Bindungsverhaltens von C5a an C5aR postulieren ein komplexes dreiseitiges Bindungsmodell und damit mindestens drei potentielle Angriffspunkte, um die C5a-Interaktion zu beeinflussen [42, 71]. Nach Bindung von C5a an C5aR wird durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten an der dritten intrazellulären Schleife eine Interaktion mit dem G-Protein vermittelt [9, 10]. Der G-Protein-Komplex dissoziiert daraufhin in seine Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta\gamma$ ) und aktiviert dadurch verschiedene intrazelluläre Signalproteine wie z.B. die Adenylatcyclase, Phospholipase C, Proteinkinase C, Phosphatidylinositol-3-Kinase oder die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase [25, 26]. Durch Aktivierung weiterer nachgeschalteter intrazellulärer Proteine folgt dem C5a-Rezeptorsignal schließlich eine biologische Antwort (bei neutrophilen Granulozyten z. B. Chemotaxis, Phagozytose, „Oxidative burst“, Mediatoren- und Granulaausschüttung) [80]. Nach Ligandenbindung wird C5aR durch Phosphorylierung von Serinresten am

Carboxylende (an den Positionen Ser314, -317, -327, -332, -334 und -338) rasch internalisiert und zum partiellen Rezeptor-„Recycling“ intrazellulären Kompartimenten (Golgi-Apparat) zugeführt [56].

### **1.6 Die Rolle von C5a und C5aR während der Sepsis**

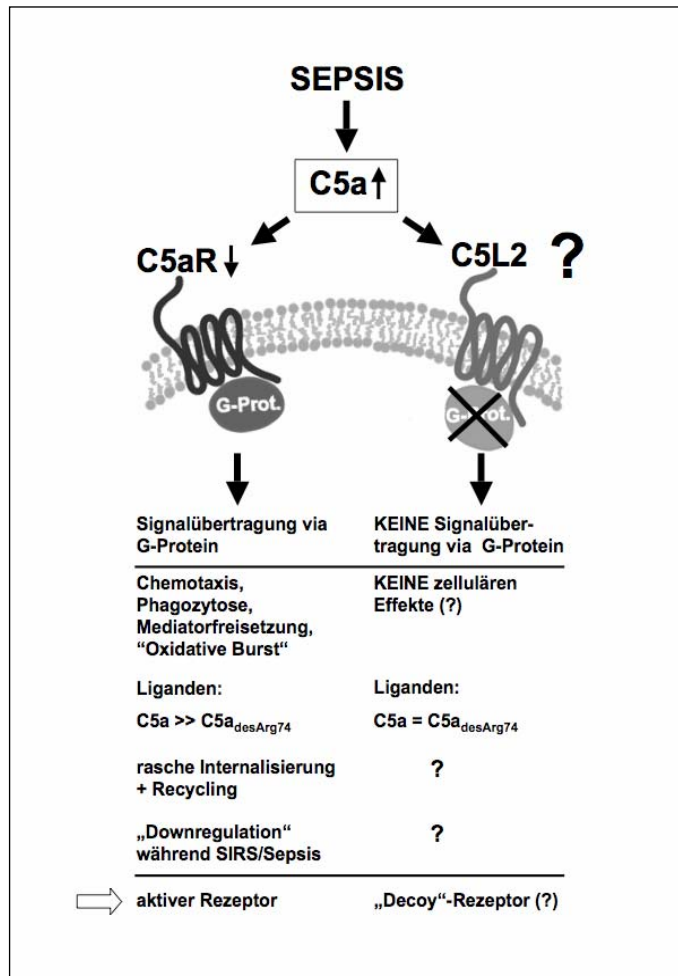
Die C5a-C5aR-Interaktion auf neutrophilen Granulozyten spielt für die Einleitung eines lokal begrenzten Entzündungsprozesses eine wichtige Rolle. Sie dient der Beseitigung von infektiösen Elementen und ist unter physiologischen Bedingungen sorgfältig reguliert [80]. Bereits vor mehr als zehn Jahren wurden während der Sepsis erhöhte C5a-Plasmakonzentrationen nachgewiesen [73]. Dies weist auf eine Überaktivierung des Complementsystems während des septischen Geschehens hin [80]. Andererseits verlieren neutrophile Granulozyten während experimenteller Sepsis weitestgehend ihre Fähigkeit, C5a zu binden [39], was auf eine verminderte Expression von C5aR zurückgeführt wurde und möglicherweise erhöhte C5a-Konzentrationen bedingen könnte [29]. Kürzlich wurde ein C5aR-Verlust auf neutrophilen Granulozyten von Patienten mit Sepsis bestätigt [22]. Exzessiv hohe C5a-Konzentrationen können *in vitro* eine Funktionsstörung der intrazellulären Signalprozesse mit nachfolgender „Paralyse“ der neutrophilen Granulozyten bewirken [30, 44]. Die phagozytotische Aktivität und die Antwort auf chemotaktische Reize sind dabei stark vermindert, außerdem ist die Produktion von bakterizid wirkendem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> um mehr als 50% eingeschränkt [7, 27, 73, 80]. Makrophagen werden indessen in ihrer Funktion nur unwesentlich gehemmt [80]. Weitere Studien zeigten, dass eine Blockade sowohl von C5a durch spezifische Antikörper als auch von C5aR durch C5aR-Antagonisten während experimenteller Sepsis die Überlebensraten der septischen Versuchstiere signifikant verbessert und die Dysfunktion von neutrophilen Granulozyten weitestgehend verhindert [14, 40].

### **1.7 Der „C5a-like“-Rezeptor 2 (C5L2)**

Kürzlich wurde ein zweiter C5a-bindender Rezeptor entdeckt, der aufgrund seiner molekularbiologischen Ähnlichkeiten mit dem „klassischen“ C5aR „C5a-like“ Rezeptor 2 (C5L2) genannt wurde [57]. Das kodierende Gen ist auch als GPR77 bekannt und dem des

C5aR benachbart (Chromosom 19, Band Position q13.33) [51]. C5L2 zeigt eine Sequenzhomologie zu C5aR von 49% [51]. Er gehört neben C3aR und fMLPR der C5aR-Subfamilie an [59]. Bisher wurde C5L2 auf unreifen dendritischen Zellen sowie Zellen aus Milz- und Hodengewebe gefunden [57], aber auch mit schwächerer Ausprägung auf Zellen verschiedener anderer Gewebe (z.B. Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Niere) [9, 51, 57]. Ob C5L2 auch auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden [58, 59]. Liganden dieses neubeschriebenen Rezeptors sind sowohl C5a als auch C5a<sub>desarg74</sub>, beide mit nahezu gleich hoher Affinität [9]. Im Gegensatz zum C3aR [13, 82] und C5aR [27,

82] ist C5L2 nicht mit G-Proteinen vergesellschaftet. Ursache hierfür ist der Austausch eines Arginins durch ein Leucin in der so genannten „DRY“-Region der dritten Transmembrandomäne [47, 58]. Außerdem ist die dritte intrazelluläre Schleife weitaus kürzer als bei C5aR und weist weniger Serin-/Threoninreste auf, die typischerweise nach Phosphorylierung die Verbindung zu G-Proteinen herstellen [9, 58]. Nach Bindung von C5a an C5L2 werden nach bisherigen Erkenntnissen weder die bekannten intrazellulären Signalwege aktiviert noch nachfolgende biologische Effekte erzeugt [47, 58]. Ein weiterer Unterschied zum C5aR ist das wesentlich langsamere Bindungsverhalten („On-/Off-rate“) der Liganden an C5L2 [58]. Außerdem scheint C5L2 nach Ligandenbindung nicht phosphoryliert und internalisiert zu werden [58]. Somit könnte C5L2 als sog. „Decoy“- oder „Scavenger“-Rezeptor agieren, der aktivierte Complementfaktoren bindet, ohne die zelluläre Aktivität zu beeinflussen. C5L2 könnte dadurch eine Pufferfunktion für überschüssig gebildete Complementaktivierungsprodukte einnehmen [58]. Eine andere



**Abb. 4:** Vergleich der beiden C5a-bindenden Rezeptoren C5aR und C5L2. C5aR = C5a-Rezeptor; C5L2 = „C5a-like“ Receptor 2; G-Prot. = G-Protein.

Interpretation wäre, dass C5L2 die inflammatorische Antwort jenseits der raschen initialen Effekte nach C5a-Bindung verlängert, indem der Ligand-C5L2-Komplex für eine längere Zeit auf der Zelloberfläche präsentiert wird [9] (Abb. 4).

### **1.8 Zielsetzung**

Die Expression des neuen Complementrezeptors C5L2 auf neutrophilen Granulozyten sowie dessen Funktion sind derzeit noch weitgehend unbekannt und insbesondere während der systemischen Entzündungsantwort (Sepsis) unerforscht. Ziel dieser Arbeit war es daher, das Expressionsverhalten von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten während der systemischen Entzündung 1.) *in vitro*, 2.) tierexperimentell und 3.) klinisch zu untersuchen und dadurch eine mögliche pathophysiologische Rolle von C5L2 zu eruieren.

## **2. Material und Methodik**

### **2.1 Material**

Die verwendeten Substanzen sind von höchstem Reinheitsgrad (>99%) und wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

### **2.2 Ethische Aspekte**

Vor Studienbeginn wurde ein Ethikantrag bei der Ethikkommission der Universität Ulm gestellt. Das Votum der Ethikkommission liegt vor (Antrag-Nr. 163/2003, Anhang 7.3). Die Freiwilligen und Patienten wurden über die Versuche ausführlich informiert, über mögliche Risiken aufgeklärt (Anhang 7.4) und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Blutentnahme (Anhang 7.5) und zur Übereignung des Körpermaterials (Anhang 7.6). Patienten, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme aufgrund der Schwere der Krankheit nicht einwilligungsfähig waren, wurden nach klinischer Besserung eingehend informiert und ihr schriftliches Einverständnis wurde nachträglich eingeholt. Für diejenigen Patienten, die während des Krankenhausaufenthaltes verstarben, unterzeichneten deren nächste Angehörige die Einverständniserklärung.

### **2.3 Patienten- und Kontrollgruppenauswahl**

#### *Patienten:*

In die Studie wurden intensivtherapiepflichtige Patienten im beginnenden septischen Schock aufgenommen. Auf der Grundlage der Sepsiskriterien der „ACCP/SCCM Consensus Conference“ [1] (Anhang 7.1, Tab. 3) und unter Berücksichtigung der nachfolgend genannten Kriterien wurden über einen Zeitraum von zehn Monaten (11/2003 – 08/2004) Patienten der Anästhesiologischen Intensivstation des Universitätsklinikums Ulm in die Untersuchung eingeschlossen:

Einschlusskriterien:

- Alter > 18 und < 80 Jahre
- Intensivtherapiepflichtige, postoperative/posttraumatische Patienten
- Frühphase des septischen Schocks (1.Tag)
- Beginnender Katecholaminbedarf als Marker eines beginnenden septischen Schocks
- Persistierende Infektion
- Leukozytenzahl < 4G/l oder >12 G/l

Ausschlusskriterien:

- Lebenserwartung < 24 h
- Schwangerschaft
- HIV/AIDS
- Kardiogener Schock als primäre Ursache des Schocks
- Hämatologische Grunderkrankung
- Beteiligung an anderen Studien
- Chemotherapie, Bestrahlung innerhalb der letzten 6 Monate

Insgesamt wurden 26 Patienten, die diese Bedingungen erfüllten, in die Studie aufgenommen. Davon waren 10 weiblichen und 16 männlichen Geschlechts. Sie hatten im Mittel ein Alter von  $64,9 \pm 2,6$  Jahren (Tab. 1). Um den Grad der Organfunktionsstörung zu beschreiben, wurde der SOFA-Score in modifizierter Form angewendet ([76] Anhang 7.2, Tab. 4). Hierbei wurde aufgrund der Sedierung der Patienten auf die Erfassung der „Glasgow coma scale“ verzichtet. Insgesamt 10 der 23 Patienten entwickelten im Verlauf ein Multiorganversagen. Im Mittel lag der SOFA-Score am Tag der Probenentnahme bei  $8,86 \pm 0,66$  (Minimum 4, Maximum 14, maximal erreichbarer Wert 20). Überlebten die Patienten länger als 30 Tage nach Beginn der Sepsis, wurden sie der Gruppe der Überlebenden zugeordnet (Tab. 1).

*Kontrollgruppe:*

Die Kontrollgruppe beschränkte sich auf gesunde, freiwillige Frauen und Männer, die > 21 und < 80 Jahre alt waren. Strikte Ausschlusskriterien waren eine bestehende Schwangerschaft, Bluterkrankungen (z.B. Anämie), Blutungsneigungen, bekannte Gerinnungsstörungen und die Einnahme von Antikoagulantien (z.B. Marcumar) oder



Thrombozytenaggregationshemmern (z.B. ASS). Es handelte sich um eine einmalige Blutentnahme. Die Probanden (n=14) hatten im Mittel ein Alter von  $62,5 \pm 3,3$  Jahren. Von ihnen waren 5 weiblich und 9 männlich (Tab. 1).

**Tab. 1A:** Daten des Patienten-/Kontrollgruppenkollektivs. Vergleich von Patienten mit Sepsis mit gesunden Freiwilligen.

<b>A</b>	<b>Patienten gesamt</b>	<b>Freiwillige gesamt</b>
<b>n</b>	26	14
<b>Geschlecht w : m</b>	10 : 16	5 : 9
<b>Alter (Minimum-Maximum) [Jahre]</b>	$64,9 \pm 2,6$ (38-80)	$62,5 \pm 3,3$ (35-76)
<b>Liegetage auf der Intensivstation (Minimum-Maximum)</b>	$21,7 \pm 3,7$ (1-62)	-
<b>SOFA-Score (Minimum-Maximum)</b>	$8,86 \pm 0,66$ (4-14)	-

**Tab. 1B:** Daten des Patientenkollektivs. Vergleich von überlebenden Patienten mit Nicht-Überlebenden.

<b>B</b>	<b>Patienten überlebend</b>	<b>Patienten nichtüberlebend</b>
<b>n</b>	11	15
<b>Geschlecht w : m</b>	3 : 8	7 : 8
<b>Alter (Minimum-Maximum) [Jahre]</b>	$57,4 \pm 3,9$ (38-77)	$70,6 \pm 2,6$ (51-80)
<b>Liegetage auf der Intensivstation (Minimum-Maximum)</b>	$26,8 \pm 5,9$ (9-62)	$16,3 \pm 4,3$ (1-30)
<b>SOFA-Score (Minimum-Maximum)</b>	$8,20 \pm 1,05$ (4-13)	$9,42 \pm 0,85$ (5-14)

Mittelwerte  $\pm$  SEM; SOFA-Score = „Sepsis-related organ failure assessment score“.

Den Freiwilligen wurde durch Punktion einer Unterarmvene („S-Monovette-Kanüle“, Sarstedt, Nümbrecht) jeweils ca. 15 ml venöses Vollblut lege artis entnommen: 7,5 ml in ein Citratröhrchen („S-Monovette“) zur Isolierung neutrophiler Granulozyten, 2,5 ml in ein

EDTA-Röhrchen („S-Monovette“) für die durchflusszytometrischen Untersuchungen und 5 ml in ein Serumröhrchen („S-Monovette“) zur Serumgewinnung für die spätere ELISA-Analyse. Bei den Patienten erfolgte diese Blutentnahme über einen bereits liegenden venösen bzw. arteriellen Verweilkatheter.

#### **2.4 Isolation der neutrophilen Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten des Menschen bzw. der Ratte wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mit anschließender Dextranedimentation und hypotoner Lyse der restlichen Erythrozyten aus Vollblut isoliert. Im ersten Schritt wurden die neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten durch Zentrifugation („Varifuge 3.0 RS“, Heraeus, Hanau) bei Raumtemperatur (23° C) für 30 min bei 300 x g in Anwesenheit von „Ficoll-Paque“ (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) von Monozyten und Lymphozyten getrennt. Anschließend erfolgte die Sedimentation der Erythrozyten bei Raumtemperatur in einer 1%-Dextranlösung (Amersham Biosciences). Nach 45 min wurde der Überstand aus neutrophilen Granulozyten und restlichen Erythrozyten bei Raumtemperatur für 5 min bei 300 x g zentrifugiert („Varifuge 3.0 RS“, Heraeus). Durch Resuspension des Sediments in 10 ml sterilem Wasser (Aqua Spüllösung, Delta Pharma, Pfullingen) für ca. 30 s wurden die Erythrozyten lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von je 5 ml einer 2,7%igen Kochsalzlösung (Wiederherstellen der Isotonie) und Auffüllen mit steriler, isotoner Kochsalzlösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg) beendet. Die erneute Zentrifugation („Varifuge 3.0 RS“, Heraeus) bei Raumtemperatur für 5 min bei 300 x g ergab ein Sediment aus neutrophilen Granulozyten (> 95% Reinheit), das in 10 ml HBSS (Gibco invitrogen, Karlsruhe) resuspendiert wurde.

#### **2.5 Zelladjustierung und Vitalitätstestung**

Aus 10 µl Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (0,025 mm<sup>2</sup>, 0,1 mm Tiefe, Brand, Wertheim) unter dem Mikroskop („Axioskop“, Zeiss, Oberkochen) die Zellzahl pro ml ermittelt. Durch entsprechende Verdünnungsschritte wurde die Zellzahl für die weiteren Versuche auf 2 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml angeglichen. In Vorversuchen wurde nach der Zellisolation eine Vitalitätstestung (Trypanblau Ausschlusstest) durchgeführt, indem zu

10 µl Zellsuspension 10 µl Trypanblau gegeben wurde. Dabei erschienen defekte und tote Zellen blau angefärbt.

### **2.6 In vitro Simulation einer Complementaktivierung mit rekombinantem C5a**

Zur Stimulation wurden die neutrophilen Granulozyten ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml, n=3) im Kurzzeitpuffermedium HBSS (Gibco invitrogen, Karlsruhe) in An- oder Abwesenheit (=Kontrolle) von PMA [48] in einem Wasserbad („SW 23“, Julabo, Seebach) bei 37°C unter kontinuierlicher sanfter Bewegung für 15 min inkubiert. Für die in vitro Simulation der Complementaktivierung während Sepsis wurden die Zellen vor der beschriebenen Stimulation unter sonst gleichen Bedingungen für verschiedene Zeiträume ohne (=Kontrolle) oder mit rekombinant hergestelltem C5a (Mensch: Sigma-Aldrich; Ratte: freundliche Gabe von Prof. Dr. Ward, Department of Pathology, University of Michigan, USA) oder alternativ mit fMLP vorinkubiert. Dabei wurden C5a-Konzentrationen von 10 nM benutzt, wie sie in Seren von septischen Patienten gefunden und beschrieben wurden [25, 70].

### **2.7 Messung der Produktion von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Die Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration wurde nach der Methode von Thurman, Ley und Scholy [75] als Endpunktbestimmung durchgeführt.

Nach o. g. in vitro Inkubation wurden folgende Reagenzien in den entsprechenden Endkonzentrationen der Zellsuspension hinzugegeben:

- Natriumazid (Merck, Darmstadt), Endkonzentration 5 mM
- Trichloressigsäure (TCA), Endkonzentration 10%; anschließende Zentrifugation („Biofuge fresco“, Heraeus) bei 23° C für 5 min bei 500 x g
- Eisenammoniumsulfat, Endkonzentration 1,5 mM
- Kalium-Thiocyanat, Endkonzentration 0,25 M

Durch Zugabe der beiden letztgenannten Reagenzien bildete sich in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein rötlicher Farbkomplex (Eisenthioocyanatkomplex), dessen Intensität zu der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration direkt proportional war. Die Lichtabsorptionen der einzelnen Proben wurden spektrometrisch („Ultrospec 3000“, Pharmacia Biotech, Cambridge,

Großbritannien) bei einer Wellenlänge von 480 nm bestimmt. In Abwesenheit von Zellen wurde durch absteigende Verdünnung einer  $10^{-2}$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung eine Standardkurve mit bekannten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen erstellt (Abb. 5). Damit konnten die Rohabsorptionswerte der Messreihen computergestützt in Konzentrationen umgerechnet werden.

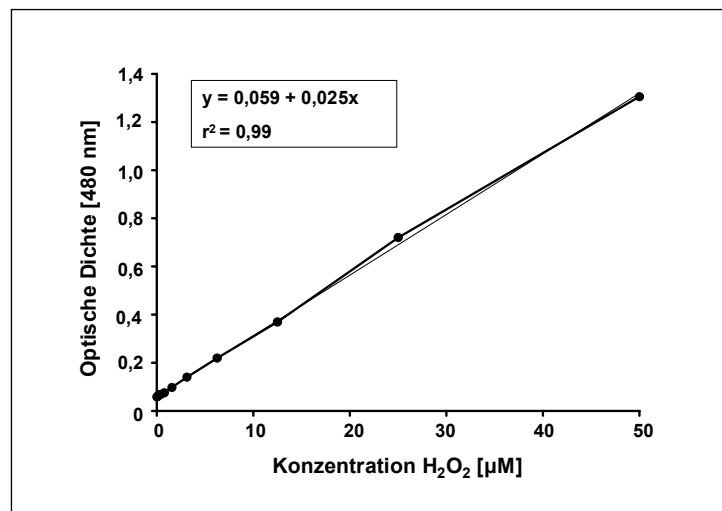


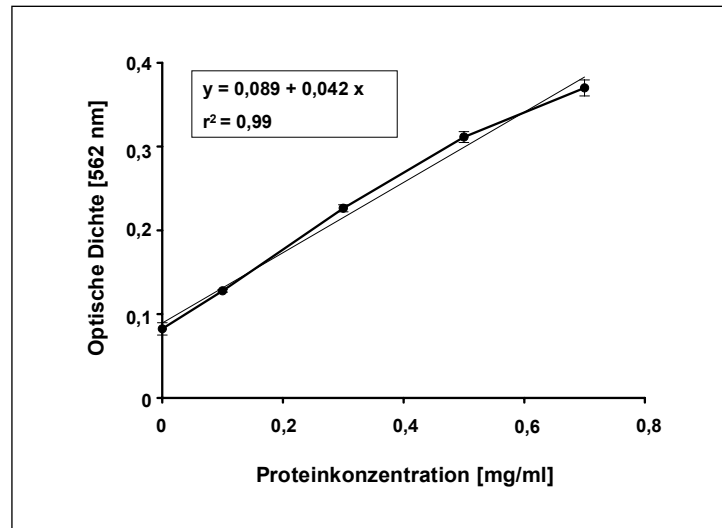
Abb. 5: Standardkurve zur Berechnung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen ( $n=3$ ).

## 2.8 Proteinbestimmung

Nach der Isolation und eventueller Inkubation wurden die neutrophilen Granulozyten mit einer hypotonen Pufferlösung (bestehend aus 42 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  und einem Breitspektrumproteaseinhibitor [Roche Diagnostics, Basel]) sowie anschließender kurzzeitiger Behandlung (30 s) im Ultraschallbad („Qualilab“, Merk, Bruchsal) vollständig lysiert. Nach Zentrifugation bei  $16000 \times g$  (5 min bei  $4^\circ\text{C}$ ) zur Entfernung des Zelldebridements wurde dem Überstand je  $15 \mu\text{l}$  „Laemmli sample buffer“ (BioRad, Hercules, USA) zugegeben. Anschließend wurden die Proben bei  $96^\circ\text{C}$  für 7 min im Hitzeblock („UBD“, Grant, Cambridge, England) erhitzt und danach entweder eingefroren oder direkt der Western Blot Analyse zugeführt.

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mittels „BCA Protein Assay Reagent Kit“ („Bicinchoninic acid protein assay“, Pierce, Rockford, USA) gemessen. Hierbei wurde strikt nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die gemessenen Lichtabsorptionen bei 562 nm („Cytofluor Series 4000“, Perspective Biosystems, Framingham, USA) wurden anhand der ermittelten Standardkurve (Abb. 6) computergestützt in Proteinkonzentrationen

umgerechnet.



**Abb. 6:** Standardkurve zur Berechnung der Proteinkonzentrationen, die mittels „Bicinchoninic acid protein assay“ bestimmt wurden (n=3).

## 2.9 Western Blot Analyse

Die Zellysate wurden mittels „SDS-PAGE“ nach Laemmli et al. [49] der Molekülgröße nach aufgetrennt. Dabei wurde ein 12,5%iges Gel gewählt und auf die Beladung von jeweils gleichen Proteinmengen sorgfältig geachtet (12 bzw. 15 µg Protein/Ladebucht; Volumenberechnung anhand der zuvor bestimmten Proteinkonzentrationen der Proben). Die Elektrophorese („Mini-Protean 3 Cell“, BioRad) erfolgte mit einer konstanten Spannung von  $U = 150 \text{ V}$  bei freier Stromstärke unter Beobachtung der Lauffront. Die aufgetrennten Proteine wurden per Western Blot Technik („Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell“, BioRad) bei einer konstanten Stromstärke von  $I = 185 \text{ mA}$  und freier Spannung für exakt 2 h vom Gel auf eine PVDF-Membran (2 µm Porengröße; Schleicher und Schuell, Dassel) übertragen. Direkt nach dem Transfer wurden die Membranen für 1 h in TTBS mit 5% Milchpulver (Roth, Karlsruhe) gegeben und anschließend mit einem der nachfolgend aufgeführten Antikörper in entsprechender Verdünnung in einer 5%-Milch-TTBS-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert:

- Kanninchen-anti-Mensch C5L2 IgG, 1:1000 (freundliche Gabe von Dr. Peter Monk, University of Sheffield, Großbritannien)

- Kanninchen-anti-Maus C5L2 IgG, 1:500 (freundliche Gabe von Prof. Dr. Peter Ward, University of Michigan, USA)
- Maus-anti-GAPDH IgG, 1: 5000 (Chemikon, Temecula, USA)
- Ziege-anti-GAPDH IgG, 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA).

Danach wurden die Membranen gründlich in TTBS gewaschen (3 x 5 min) und ein zweiter enzymmarkierter Antikörper in 5%-Milch-TTBS zugegeben (1 h bei Raumtemperatur).

Folgende Antikörper kamen zur Anwendung:

- AP-markiertes Ziege-anti-Kanninchen IgG 1:5000  
(Jackson Immunoresearch/ Dianova, Hamburg)
- AP-markiertes Kanninchen-anti-Ziege IgG, 1:5000  
(Jackson Immunoresearch/ Dianova)
- HRP-markiertes Esel-anti-Kanninchen IgG 1:5000  
(Amersham Biosciences)
- HRP-markiertes Ziege-anti-Maus IgG 1:4000  
(Amersham Biosciences).

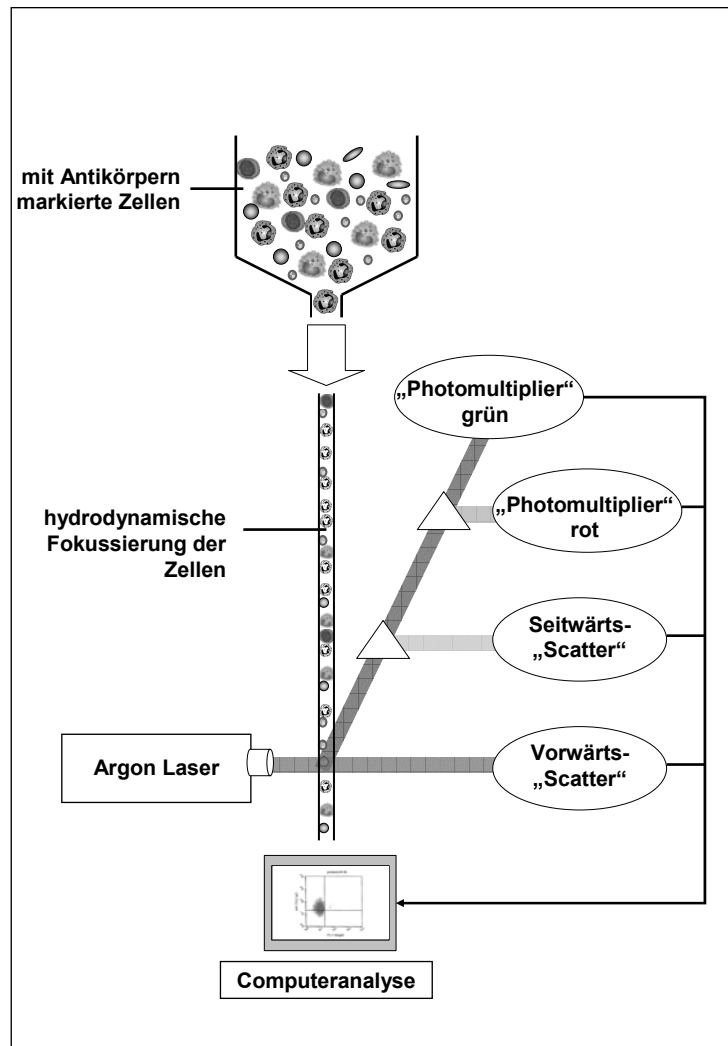
Die Membranen wurden je nach Zweitantikörper entweder mit dem Alkalinphosphatase-(AP)- oder dem „Enhanced-Chemiluminescence“- (ECL)-Verfahren nach den Empfehlungen der Hersteller („AP-Development-Substrate-Kit“, BioRad bzw. „ECL plus“, Amersham Biosciences) entwickelt. Anschließend wurden die Membranen bzw. Filme („Hyperfilm ECL“, Amersham Biosciences) eingescannt und elektronisch gespeichert.

### **2.10 Durchflusszytometrie**

EDTA-Vollblutproben wurden mit einem Durchflusszytometer („FACS Calibur“, BD Bioscience, San Jose, USA) analysiert (Abb. 7). Die Fluoreszenzeinstellungen wurden täglich kalibriert, um Messschwankungen des Durchflusszytometers auszugleichen. Unmittelbar nach Entnahme wurde das EDTA-Blut der Analyse zugeführt. 100 µl Vollblut wurden mit 7,5 µl (1,2 mg/ml) des unmarkierten anti-C5L2 (Mensch) Antikörpers für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Kontrolle diente ein nicht markierter Isotyp Antikörper (Serotec, Oxford, Großbritannien) in gleicher Konzentration. Ein Phyco-

erythrin-markiertes anti-Kaninchen IgG (Serotec) wurde im Verhältnis 1:50 mit „Staining buffer“ (PBS, Gibco invitrogen; mit 0,1% Natriumazid und 1% FBS) verdünnt, die Zellen darin nach dem Waschen resuspendiert und für weitere 20 min inkubiert. Anschließend folgte die Lyse der Erythrozyten mit 2 ml einer „1 x FACS lysing solution“ (BD PharMingen, San Diego, USA) für 10 min. Nach zweimaligem Waschen in PBS (Gibco invitrogen) wurden die Leukozyten in PBS mit 0,1% Natriumazid und 1% Paraformaldehyd fixiert und im Durchflusszytometer analysiert.

Dabei wurden die Granulozyten und die Monozyten mit Hilfe der typischen Vorwärts- und Seitwärts-„Scatter“-Profile getrennt und durch Markierung mit anti-CD45/anti-CD14 (Leukogate, Beckman Coulter, Kreefeld) weiter differenziert. Die Daten wurden als Punktwolke und arithmetische Mittelwerte der Fluoreszenzintensität angegeben.



**Abb. 7:** Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie. Bei der Durchflusszytometrie werden die Zellen einer Zellsuspension über eine Düse mit Überdruck in einem Hüllstrom aus Spülflüssigkeit hintereinander aufgereiht (hydrodynamische Fokussierung). Die Zellen streuen das Licht des Argon-Lasers und fluoreszierender Farbstoffe (z.B. von gebundenen Antikörpern). Das Streulicht wird vom Vorwärts-„Scatter“ (ermöglicht Beurteilung der Zellgröße) und vom Seitwärts-„Scatter“ (charakterisiert Binnenstrukturen der Zellen) registriert. Die gemeinsame Auswertung beider Parameter ermöglicht die Unterscheidung in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten.

## 2.11 ELISA

Die Konzentration von C5a im Serum von Patienten mit Sepsis bzw. von gesunden Freiwilligen wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Enzymimmunoassays („C5a

ELISA“, DRG Diagnostics, Marburg) bestimmt. Dabei wurden sämtliche Schritte wie auch die Vorbereitung und Verdünnung der Serumproben nach den Vorgaben des Herstellerprotokolls ausgeführt. Direkt im Anschluss wurden die Extinktionswerte bei 450 nm gemessen („Cytofluor Series 4000“, Perspective Biosystems, Framingham, USA) und die entsprechenden C5a-Konzentrationen anhand einer parallel durchgeführten Standardkurve berechnet.

### **2.12 Experimentelle Sepsis durch Caecum-Ligatur und -Punktion (CLP)**

Der in den in vivo Versuchen verwendete anti-C5a Antikörper (affinitätsgereinigter, polyklonaler Kanninchen-anti-Ratten-C5a Antikörper, gegen die Aminosäurereste 17-36 der M-Peptid-Region gerichtet) und der Kontrollantikörper aus dem Serum der Kanninchen vor der Immunisierung („präimmunes IgG“) wurden von Prof. Dr. Peter Ward, University of Michigan, USA, zur Verfügung gestellt. Die Tierexperimente wurden an der University of Michigan nach dem dort genehmigten Protokoll durchgeführt.

Zur Induktion der experimentellen Sepsis wurde das bekannte Sepsismodell der Caecum-Ligatur und -Punktion (CLP) in Ratten gewählt, geringgradig modifiziert nach Chaudry et al. [16, 62, 83]. Dabei wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (275-300 g Körpergewicht, Harlan, Indianapolis, USA) zunächst durch intraperitoneale Injektion von Ketamin-Hydrochlorid (200 mg/kg Körpergewicht; Pharmacia Upjohn, Erlangen) in Kombination mit Xylazin (8 mg/kg, Bayer, Leverkusen) sorgfältig anästhesiert. Über eine ca. 2 cm lange Mittellinieninzision wurde das Caecum aufgesucht und unterhalb der Ileocaecalklappe unter strikter Beachtung einer unversehrten Darmassage ligiert (Nylonfaden „Ethilon 4-0“, Ethicon, Norderstedt). Am ligierten Darmstück erfolgte eine einmalige Darmpunktion durch das gesamte Lumen von mesenterial nach antimesenterial mit einer 21-Gauge durchmessenden Nadel. Danach wurde eine kleine Menge Darminhalt aus beiden Punktionsstellen herausmassiert, um deren Offenheit zu gewährleisten. Anschließend wurde das Caecum reponiert und die Bauchhöhle in Schichten verschlossen („Ethilon 4-0“ und Hautclips, Ethicon). Denjenigen Tieren, die eine anti-C5a Therapie erhielten, wurde intravenös 400 µg anti-C5a IgG (in 500 µl sterilem DPBS, Gibco invitrogen) injiziert. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde in gleicher Weise 400 µg präimmunes IgG (in 500 µl sterilem DPBS, Gibco invitrogen) verabreicht. Scheinoperierte Tiere wurden nach identischem Vorgehen anästhesiert und laparotomiert, jedoch ohne



Caecum-Ligatur und -Punktion. Postoperativ wurde diesen Tieren 500 µl steriles DPBS (Gibco invitrogen) injiziert. Alle Tiere hatten prä- und postoperativ ungehinderten Zugang zu Wasser und Futter und wurden in sechsständlichen Abständen klinisch beobachtet. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme (bis zu 36 h postoperativ) erhielten die Tiere erneut eine intraperitoneale Ketamin-/Xylazin-Injektion. Zur Gewinnung der notwendigen Blutproben wurde die Vena cava inferior über eine Relaparotomie punktiert und die Tiere direkt im Anschluss durch vollständigen Aderlass und Anlegen eines beidseitigen Pneumothorax euthanasiert.

### 2.13 Statistische Analyse

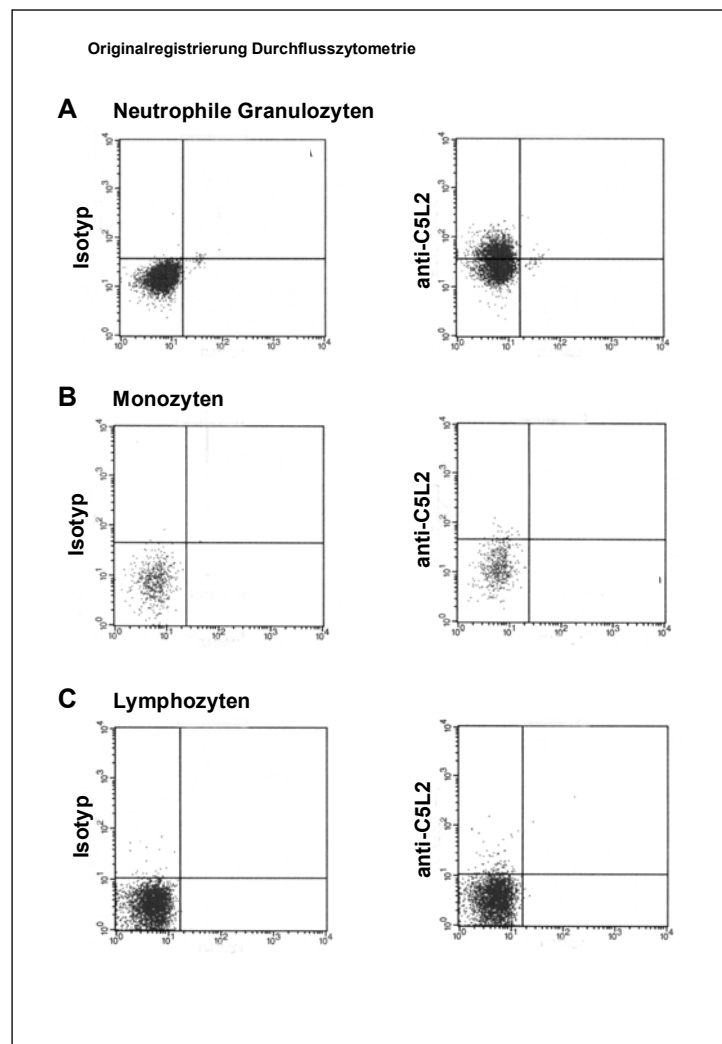
Zur Berechnung der Ergebnisse und zur Durchführung der statistischen Tests wurde das Programm SigmaStat (SPSS Science Software, Erkrath) verwendet. Die Daten wurden mittels univariater Varianzanalyse („Kruskal-Wallis one-way analysis of variance“) ausgewertet. Ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant erachtet. Die Überlebensraten wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $\pm$  SEM) angegeben. Dabei ist  $SEM = \frac{\text{Standardabweichung}}{\sqrt{n}}$ .

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Nachweis von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten

#### C5L2-Expression auf neutrophilen Granulozyten und auf Monozyten, nicht jedoch auf Lymphozyten des Menschen

Zunächst wurden Leukozyten von gesunden Freiwilligen mittels Durchflusszytometrie untersucht, um eine mögliche Expression von C5L2 auf den unterschiedlichen Zelltypen nachzuweisen. Bei der Bestimmung von C5L2 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten mit dem anti-C5L2 Antikörper zeigte sich eine signifikante



**Abb. 8:** Durchflusszytometrie von Leukozyten eines gesunden Freiwilligen. Rechts ist jeweils die Analyse mit dem anti-C5L2 Antikörper, links mit dem Kontrollantikörper (Isotyp) dargestellt.

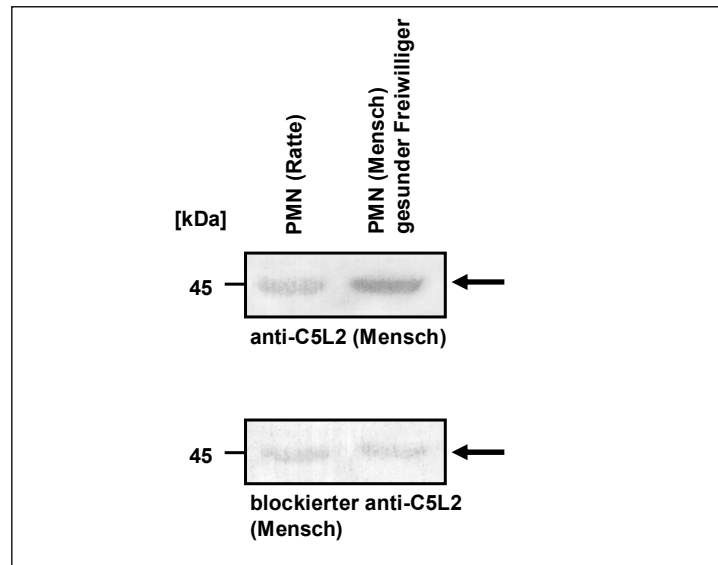
Vertikalverschiebung der detektierten Zellen verglichen mit der entsprechenden Isotyp IgG Kontrolle (Abb. 8A). Zirkulierende Monozyten präsentierten das C5L2-Protein ebenfalls auf ihrer Oberfläche (Abb. 8B), wenn auch deutlich schwächer als die neutrophilen Granulozyten. Im Gegensatz dazu blieb eine Vertikalverschiebung bei der Untersuchung von Lymphozyten aus (Abb. 8C).

#### **Nachweis von C5L2 im Lysat von neutrophilen Granulozyten des Menschen**

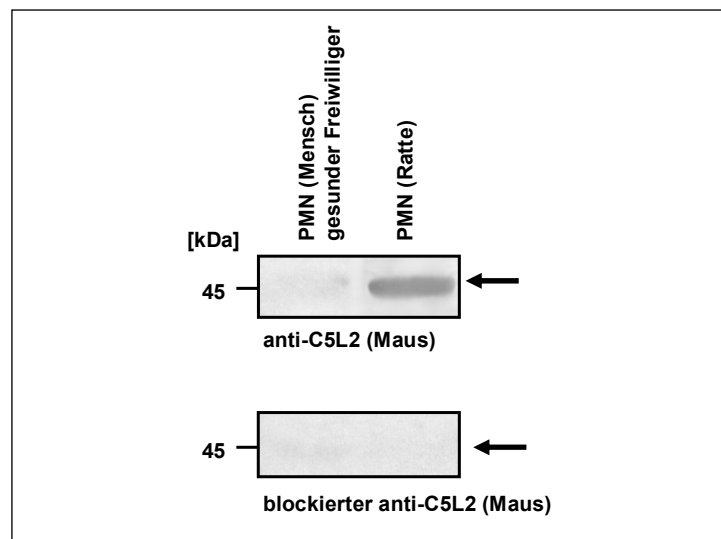
Anschließend wurden Lysate von isolierten neutrophilen Granulozyten (jeweils 12 µg Protein/Probe) von gesunden Freiwilligen mit dem kreuzreagierenden anti-C5L2 Antikörper (N-Peptid Sequenz, Mensch) im Western Blot untersucht. Abb. 9 (oben, rechte Bahn) zeigt eine deutliche Bande auf der Höhe von 45 kDa. Zur weiteren Charakterisierung dieser Bande wurde der anti-C5L2 Antikörper mit dem spezifischen C5L2-Peptid vorinkubiert. In der anschließenden Western Blot Analyse verschwand die Bande an erwarteter Position nahezu vollständig (Abb. 9 unten). Dies deutet auf die Spezifität der Bande für C5L2 hin. Der verwendete Antikörper reagierte auch mit dem C5L2-Protein der Ratte (Abb. 9 oben, linke Bahn), allerdings deutlich schwächer verglichen mit der Reaktion mit menschlichem C5L2 (trotz Ladung gleicher Proteinmengen).

#### **Nachweis von C5L2 im Lysat von neutrophilen Granulozyten der Ratte**

Da sich aus dem vorgenannten Versuch Hinweise für die Existenz von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten der Ratte ergaben, wurden Zelllysate von neutrophilen Granulozyten von Ratten (jeweils 15 µg Protein/Probe) der Western Blot Analyse zugeführt und diesmal mit einem Antikörper gegen C5L2 der Maus (N-Peptid Sequenz) untersucht. Wie Abb. 10 zeigt, fand sich eine deutliche Einzelbande auf der erwarteten Höhe (45 kDa), die nach Präinkubation des Antikörpers mit dem C5L2-Peptid verschwand. Der verwendete anti-Maus-C5L2 Antikörper reagierte sowohl deutlich mit dem C5L2-Protein der Ratte als auch mit dem der Maus (Daten nicht gezeigt), zeigte jedoch keine Kreuzreaktion mit dem Protein auf neutrophilen Granulozyten des Menschen (linke Bahn in Abb.10).



**Abb. 9:** Western Blot Analyse von Lysaten aus neutrophilen Granulozyten einer Ratte und eines gesunden Freiwilligen mit einem Antikörper gegen das C5L2-Protein des Menschen. Die untere Membran zeigt das Ergebnis des Western Blots für C5L2, nachdem der anti-C5L2 Antikörper mit dem entsprechenden C5L2-N-Peptid vorinkubiert wurde. Die Pfeile deuten jeweils auf die Position des dargestellten Proteins. PMN = neutrophile Granulozyten.

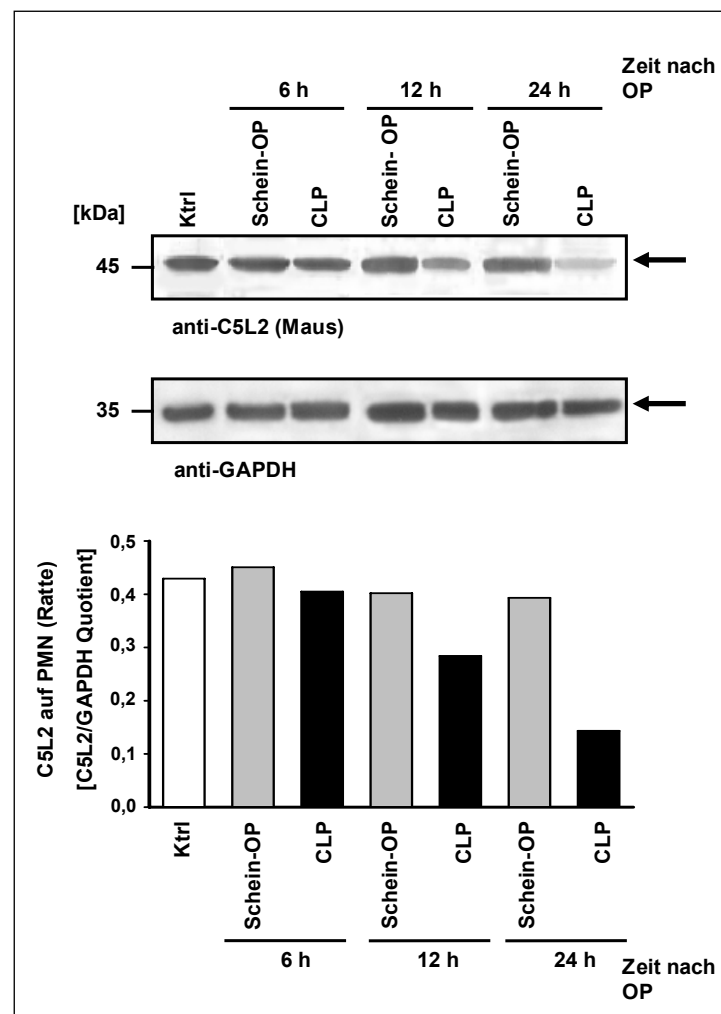


**Abb. 10:** Western Blot Analyse von Lysaten aus neutrophilen Granulozyten (PMN) eines gesunden Freiwilligen und einer Ratte mit einem Antikörper gegen das C5L2-Protein der Maus. Die untere Membran stellt das Ergebnis des Western Blots für C5L2 nach Vorinkubation mit dem entsprechenden C5L2-N-Peptid dar. PMN = neutrophile Granulozyten.

### 3.2 Verlust von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten während experimenteller Sepsis

#### Reduzierter C5L2-Gehalt während CLP-induzierter Sepsis

Um das Verhalten des Complementrezeptors C5L2 im Verlauf der Sepsis zu untersuchen, wurden neutrophile Granulozyten aus dem Blut von Ratten nach CLP-induzierter Sepsis isoliert und deren Lysate auf den Gehalt von C5L2 untersucht (Abb. 11). Unbehandelte Kontrolltiere (Ktrl) zeigten wie erwartet eine deutliche Bande bei 45 kDa. Auch 6 h nach CLP stellte sich die Bande für C5L2 unverändert dar. Lysate von CLP-Tieren mit beginnenden Zeichen der Sepsis (12 h nach CLP) zeigten einen moderat verminderten



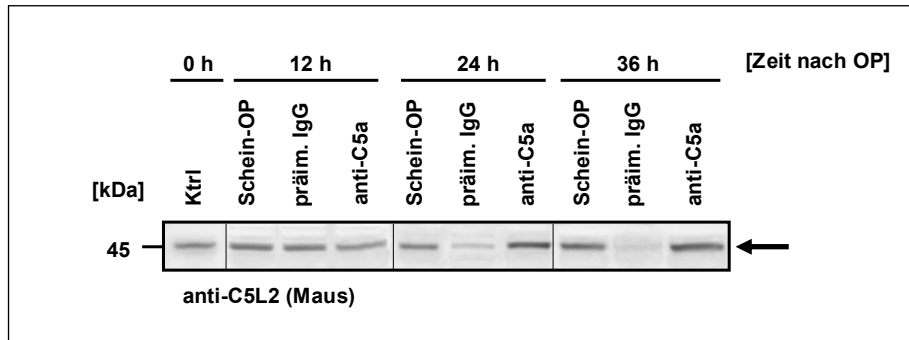
**Abb. 11:** Western Blot Analyse von Lysaten aus neutrophilen Granulozyten jeweils einer Ratte für C5L2 nach CLP bzw. Schein-OP (repräsentativ für n=4). Die Analyse mit anti-GAPDH (Mitte) weist auf das Beladen gleicher Proteinmengen hin. Unten ist das Ergebnis der Densitometrie als Quotient C5L2/GAPDH dargestellt. Ktrl = Kontrolle; PMN = neutrophile Granulozyten; GAPDH = Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase; CLP = Caecum-Ligatur und -Punktion; Schein-OP = Scheinoperation.

Gehalt des C5L2-Proteins im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren. Mit Fortschreiten der Sepsis (24 h nach CLP) wiesen die septischen Tiere schließlich nur noch eine schwache Bande für C5L2 auf, während die Gruppe der scheinoperierten Tiere eine erhaltene C5L2-Bande präsentierte. Diese Ergebnisse zeigen eine zeitabhängige Reduktion von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten im Verlauf der experimentellen Sepsis.

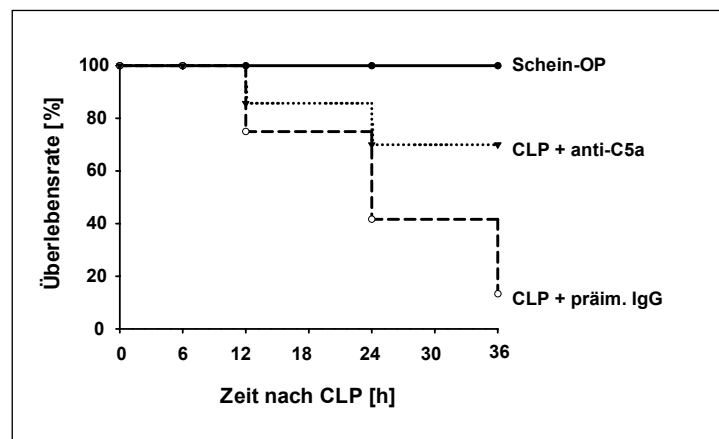
#### **C5a-Blockade bewahrt den C5L2-Gehalt neutrophiler Granulozyten während experimenteller Sepsis**

Aus vorausgegangen experimentellen Sepsisstudien ist bekannt, dass die Gabe von Antikörpern gegen C5a einerseits zu einer Retention des „klassischen“ C5aR auf neutrophilen Granulozyten und andererseits zu verbesserten zellulären Funktionen mit einer signifikant erhöhten Überlebensrate der septischen Versuchstiere führt. Daher wurde hier die Wirkung einer C5a-Blockade auf den C5L2-Gehalt neutrophiler Granulozyten von Tieren mit CLP-induzierter Sepsis (Abb. 12) untersucht. In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Ergebnissen (Abb. 11) zeigten die Tiere mit fortgeschrittener Sepsis (24 und 36 h nach CLP) und Behandlung mit dem präimmunen Antikörper ein zunehmend schwächer werdendes Signal der C5L2-Bande, das nach 36 h nahezu vollständig verschwand (Abb. 12). Im Gegensatz dazu blieb die Bande der Tiere, denen unmittelbar nach CLP der anti-C5a Antikörper verabreicht wurde, über den gesamten Verlauf in nahezu gleicher Intensität erhalten (vergleichbar mit den Banden der scheinoperierten Tiere oder der unbehandelten Kontrollgruppe).

Auch klinisch profitierten die CLP-Tiere mit Sepsis von einer anti-C5a Behandlung. Sie zeigten wesentlich geringer ausgeprägte klinische Sepsissymptome und eine deutliche Verbesserung der Überlebensrate (Abb. 13). Von den CLP-Tieren, die den unspezifischen Antikörper erhielten, überlebten nach 24 h 41% und nach 36 h schließlich nur 13% der Tiere. Unter C5a-Blockade durch den spezifischen Antikörper konnte ein Überleben von 70% der CLP-operierten Tiere sowohl nach 24 h als auch nach 36 h beobachtet werden. Von den scheinoperierten Tieren, die lediglich eine Laparotomie ohne weitere Manipulation erhielten, überlebten erwartungsgemäß alle Tiere.



**Abb. 12:** C5L2-Detektion (Western Blot) in Lysaten von neutrophilen Granulozyten von CLP-Ratten (n=5) mit bzw. ohne C5a-Blockade. Anti-C5a = intravenöse Injektion von 400 µg eines anti-C5a Antikörpers unmittelbar nach CLP; präim. IgG = intravenöse Injektion von 400 µg eines präimmun (unspezifischen) Antikörpers unmittelbar nach CLP. Ktrl = Kontrolle; CLP = Caecum-Ligatur und Punktion; Schein-OP = Scheinoperation.



**Abb. 13:** Überlebenskurve nach CLP mit bzw. ohne C5a-Blockade (n=12 pro Gruppe). Anti-C5a = intravenöse Injektion von 400 µg eines anti-C5a Antikörpers unmittelbar nach CLP; präim. IgG = intravenöse Injektion von 400 µg eines präimmun (unspezifischen) Antikörpers unmittelbar nach CLP. CLP = Caecum-Ligatur und -Punktion; Schein-OP = Scheinoperation.

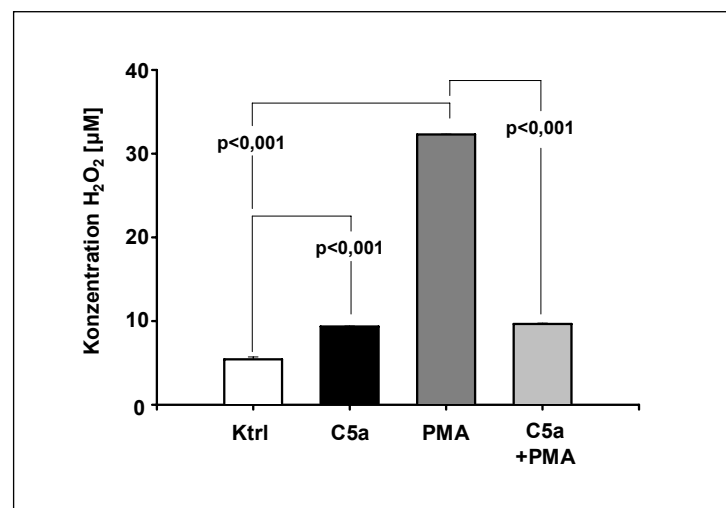
### 3.3 C5a-induzierte Reduktion von C5L2 nach in vitro Simulation einer Complement-aktivierung

Um spezifische Effekte von C5a auf das Verhalten von C5L2 zu untersuchen, wurde die unkontrollierte Complementaktivierung während der Sepsis in vitro simuliert, indem neutrophile Granulozyten von Ratten und von gesunden Freiwilligen mit rekombinant

hergestelltem C5a (bis zu 4 h bei 37°C) inkubiert wurden. Hierbei wurden Konzentrationen (10 nM) gewählt, wie sie auch bei Patienten mit Sepsis beschrieben wurden.

### Verminderte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ausschüttung von stimulierten neutrophilen Granulozyten des Menschen nach C5a-Exposition

Neutrophile Granulozyten ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) von gesunden Probanden, die in einem Kurzzeitmedium mit PMA (25 ng/ml, 15 min bei 37°) stimuliert wurden (Abb. 14), zeigten eine signifikante Steigerung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration im Überstand der Zellsuspension im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen (Ktrl). Wurden die neutrophilen Granulozyten zuvor mit C5a (10 nM für 1 h) exponiert, so war die Aktivierbarkeit durch PMA deutlich eingeschränkt. Durch C5a alleine konnte eine geringfügige Steigerung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion beobachtet werden (Abb. 14).



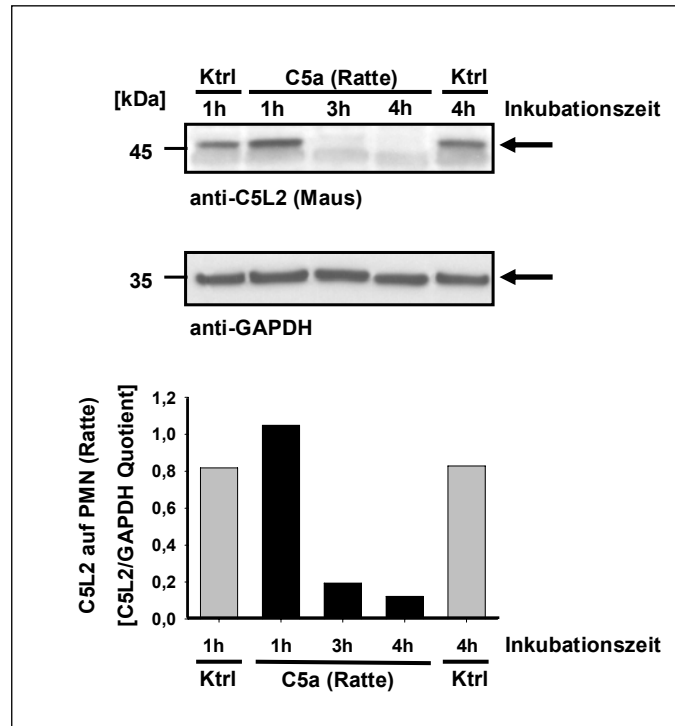
**Abb. 14:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Freisetzung von neutrophilen Granulozyten gesunder Freiwilliger in An- bzw. Abwesenheit von C5a. Der Einfluss von C5a (10 nM, 1 h) auf die Fähigkeit zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ausschüttung wurde sowohl mit als auch ohne nachfolgende PMA-Stimulation (25 ng/ml, 15 min) gemessen. Ktrl = Kontrolle; PMA = Phorbol-Myristat-Acetat.

### Reduzierter C5L2-Gehalt in Zelllysaten von neutrophilen Granulozyten der Ratte in Folge einer länger dauernden C5a-Exposition

In der ersten Stunde nach C5a-Exposition änderte sich der C5L2-Gehalt im Lysat, evaluiert durch Western Blot Analyse, nur unwesentlich (5, 10, 30, 45 min; Daten nicht gezeigt). Eine Inkubation von neutrophilen Granulozyten für 3 h oder 4 h mit Ratten-C5a (10 nM) ging dagegen mit einer deutlichen Abschwächung der Bande einher (Abb. 15), im Gegensatz zu den Lysaten ohne C5a-Exposition (Ktrl 4 h in Abb. 15). Die Western Blot



Analyse des Proteins GAPDH (sog. „Housekeeping“-Protein) belegt (Abb. 15 Mitte), dass jeweils gleiche Mengen der Zelllysate geladen wurden.

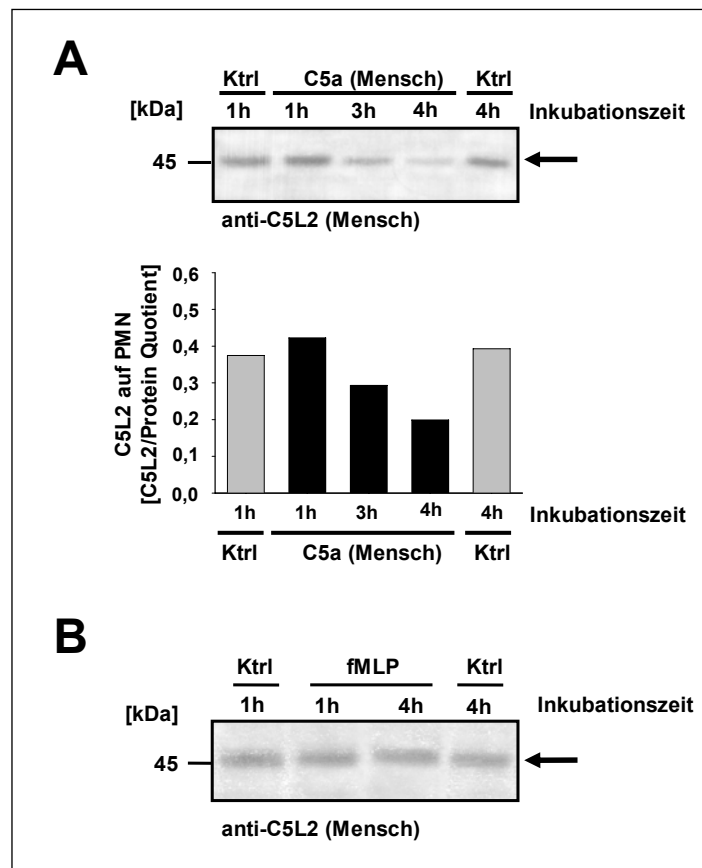


**Abb. 15:** Western Blot Analyse von Lysaten neutrophiler Granulozyten von Ratten, die für bis zu 4 h mit C5a (10 nM) inkubiert wurden. Die mittlere Abbildung zeigt die GAPDH-Banden als Marker für die Proteinbeladung in der Western Blot Untersuchung. Unten ist die densitometrische Analyse als Quotient C5L2/GAPDH dargestellt. Ktrl = Kontrolle; PMN = neutrophile Granulozyten; GAPDH = Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase.

### **Zeitabhängiger C5L2-Verlust im Lysat von neutrophilen Granulozyten des Menschen nach länger dauernder C5a-Exposition**

Die oben beschriebenen Ergebnisse wurden auf den Menschen übertragen, indem neutrophile Granulozyten von gesunden Freiwilligen ebenfalls *in vitro* mit 10 nM rekombinant hergestelltem C5a (des Menschen) inkubiert wurden. Bei der anschließenden Western Blot Analyse der Zelllysate wurde sorgfältig auf die Beladung der jeweils gleichen Proteinmengen (12 µg/Probe) geachtet. Abb. 16A zeigt die mit zunehmender Zeit abnehmende Intensität der Bande für C5L2 in Anwesenheit von C5a. Dagegen blieb die Bande der Zellen, die parallel in HBSS ohne C5a inkubiert wurden, auch nach 4 h in nahezu gleicher Stärke bestehen. Die parallel gemessene Zellvitalität (mittels Trypanblau

Extraktionstest) lag in allen Proben bei >98% (Daten nicht gezeigt). Unter gleichen Bedingungen wurden zusätzlich neutrophile Granulozyten mit fMLP (Konzentration von 10  $\mu$ M) inkubiert. In der Western Blot Analyse blieb die Bande für C5L2 auch bei längerer fMLP-Inkubation in annähernd gleicher Intensität bestehen (Abb. 16B).

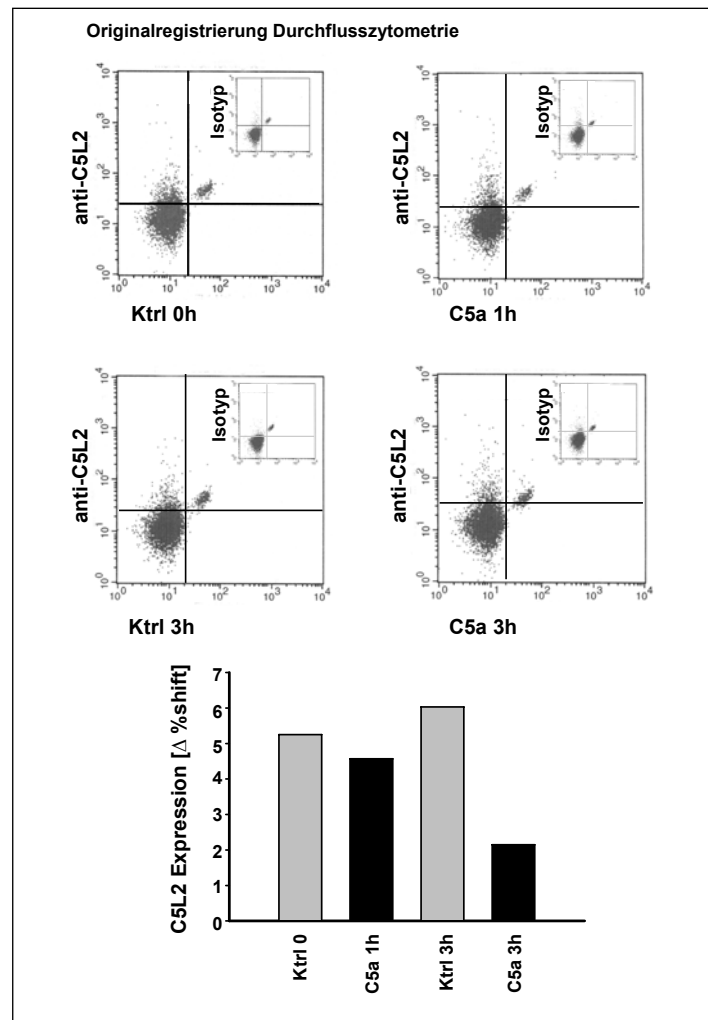


**Abb. 16:** Western Blot Analyse von Lysaten neutrophiler Granulozyten von gesunden Freiwilligen, die für bis zu 4 h mit C5a bzw. fMLP inkubiert worden waren. **A:** Effekt einer C5a-Exposition (10 nM) auf den C5L2-Gehalt. **B:** Parallele Inkubation mit fMLP (10  $\mu$ M). Ktrl = Kontrolle; PMN = neutrophile Granulozyten; fMLP = N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin.

### Reduzierte C5L2-Expression auf neutrophilen Granulozyten des Menschen durch C5a-Exposition

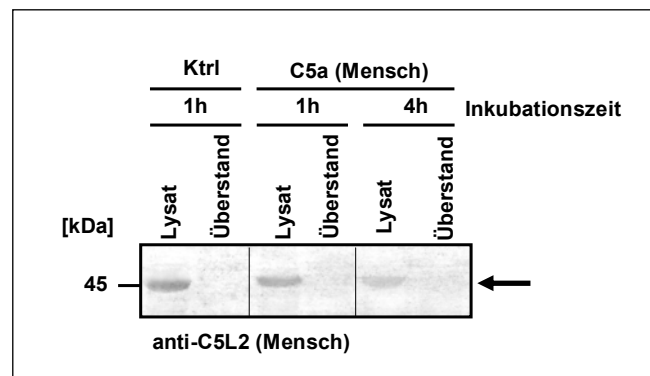
In weiteren Versuchen wurden neutrophile Granulozyten von gesunden Freiwilligen mit C5a inkubiert und anschließend die Oberflächenexpression von C5L2 durchflusszytometrisch untersucht. Bei Inkubation von bis zu 3 h (37°C) konnte nach 1 h eine tendentielle Reduktion von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Nach 3 h zeigte sich schließlich eine weitere Abnahme der C5L2-Expression im Vergleich

zur Kontrolle (Abb. 17). Diese Ergebnisse beschreiben eine Verminderung von C5L2 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten, die offensichtlich durch eine länger andauernde Exposition hoher C5a-Konzentrationen induziert werden kann.



**Abb. 17:** Durchflusszytometrie von neutrophilen Granulozyten eines gesunden Freiwilligen nach C5a-Inkubation (10 nM, bis zu 3 h). Die entsprechenden Isotyp IgG Kontrollen sind jeweils als Einsatz abgebildet. Die Darstellung der Differenz von anti-C5L2- zur Isotyp-Analyse (unten) verdeutlicht das Ergebnis. Ktrl = Kontrolle.

Um der Frage des weiteren „Schicksals“ von C5L2 nach Complementaktivierung nachzugehen, wurde der Überstand neutrophiler Granulozyten von gesunden Probanden nach C5a-Exposition (10 nM, bis zu 4 h) auf den C5L2-Gehalt untersucht. Wie in Abb. 18 dargestellt, fanden sich bei der Western Blot Untersuchung des Überstandes keine Hinweise auf die Existenz von C5L2 im extrazellulären Medium.



**Abb. 18:** Untersuchung des Überstandes mit anti-C5L2 im Western Blot nach Inkubation neutrophiler Granulozyten eines gesunden Freiwilligen mit C5a (10 nM, bis zu 4 h). Ktrl = Kontrolle.

### 3.4 Verlust von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten während klinischer Sepsis

#### Erhöhte C5a-Konzentrationen im Plasma von Patienten mit Sepsis

In den Seren von Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock (n=26) und von gesunden Freiwilligen (Kontrollgruppe, n=14) wurde die Konzentration des Complementaktivierungsproduktes C5a mittels ELISA bestimmt. Bei dem untersuchten Patientenkollektiv wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte C5a-Konzentration im Serum gemessen (annähernd 10-fach höher; Tab. 2).

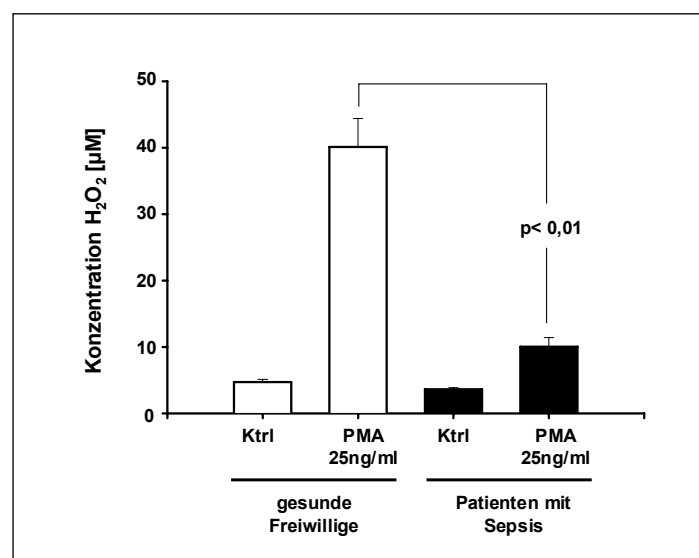
**Tab. 2:** Vergleich der C5a-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Sepsis und von gesunden Freiwilligen.

	gesunde Freiwillige (n=14)	Patienten mit Sepsis (n=26)	statistische Signifikanz
<b>C5a-Konzentration Mittelwert ± SEM [nM]</b>	1,8 ± 0,2	11,3 ± 2,6	p < 0,001

Messung mittels ELISA; Mittelwerte ± SEM.

### Abschwächung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von stimulierten neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit Sepsis

Analog zu den *in vitro* Versuchen (siehe 3.2) wurde die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu bilden, untersucht. Hierbei wurden neutrophile Granulozyten von gesunden Freiwilligen (n=14) mit denen von Patienten mit Sepsis (n=26) verglichen. Die Fähigkeit der Zellen zur Produktion und Freisetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> war bei Patienten mit Sepsis deutlich eingeschränkt (Abb. 19). Die Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Überstand nach PMA-Stimulation (25 ng/ml; 15 min) betrug bei Patienten mit Sepsis nur noch weniger als ein Viertel der Kapazität intakter Zellen gesunder Freiwilliger.

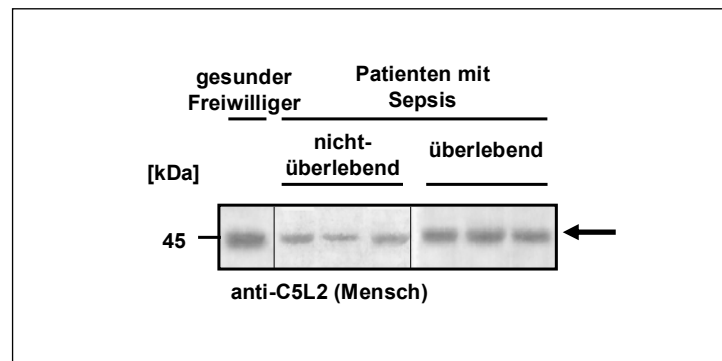


**Abb. 19:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Freisetzung neutrophiler Granulozyten von Patienten mit Sepsis (n=26) und gesunden Freiwilligen (n=14). Die Fähigkeit der Zellen beider Gruppen zur Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach PMA-Stimulation (25 ng/ml, 15 min) wurde miteinander verglichen. Ktrl = Kontrolle; PMA = Phorbol-Myristat-Acetat.

### Verlust von C5L2 in Lysaten von neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit Sepsis

Die beschriebenen Ergebnisse der *in vitro*- und *in vivo* simulierten septischen Bedingungen wurden auf den Menschen übertragen, indem neutrophile Granulozyten von 10 Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock isoliert und durch Western Blot Analyse auf ihren C5L2-Gehalt untersucht wurden (exemplarische Darstellung von 6 Patienten in Abb. 20). Hierfür wurden jeweils gleiche Proteinmengen (12 μg/Probe) von Zelllysaten elektrophoretisch aufgetrennt und mit anti-C5L2 per Western Blot Analyse untersucht. Das Lysat von gesunden Freiwilligen (Abb. 20 links) zeigte erwartungsgemäß eine deutliche Einzelbande bei 45 kDa. Im Vergleich dazu erschien die Bande der Zellen

von Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock weitaus schwächer ausgeprägt. Dabei zeigte sich eine deutliche Reduktion von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten bei 3/4 der Patienten, die den Folgen der Sepsis erlagen, wohingegen alle Patienten, die die systemische Entzündung überlebt hatten, eine nur geringfügige C5L2-Abnahme (6/6) darboten.



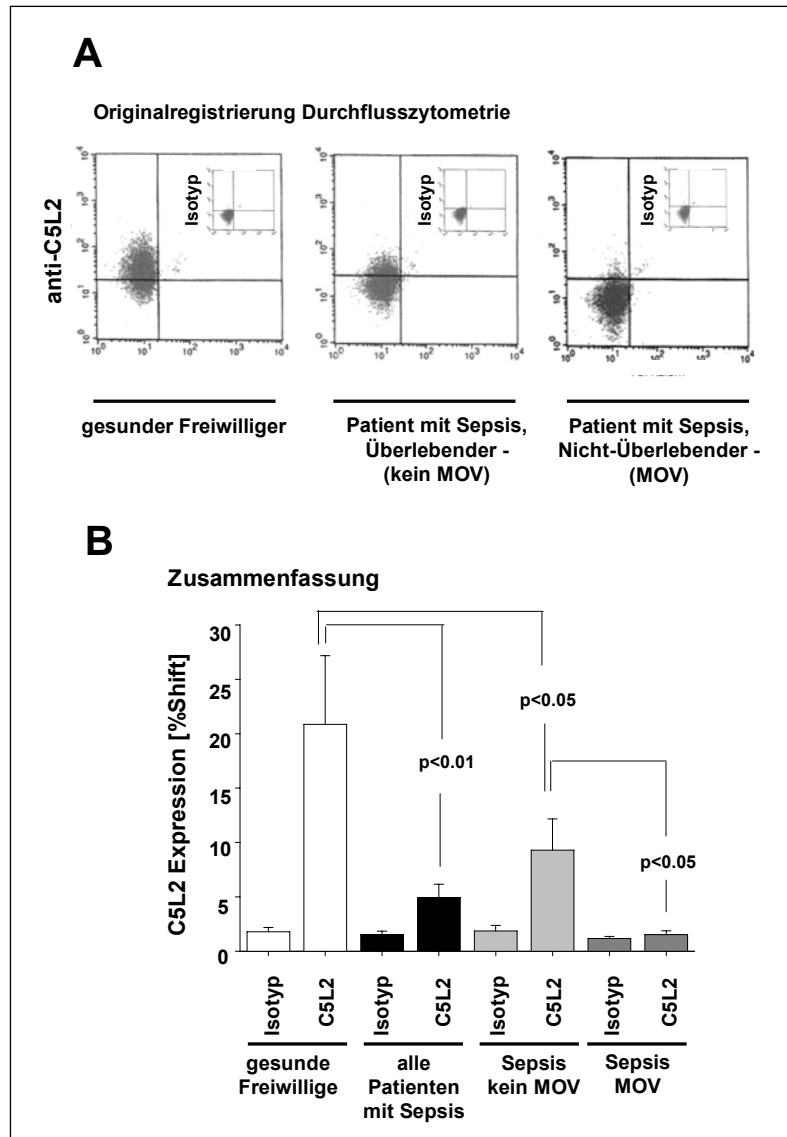
**Abb. 20:** C5L2-Detektion (Western Blot) in Lysaten aus neutrophilen Granulozyten von Patienten mit Sepsis und eines gesunden Freiwilligen im Vergleich. Die Gruppe der Patienten wurde weiter in Überlebende und Nicht-Überlebende unterteilt (exemplarisch 3 Patienten pro Gruppe).

### Verminderte C5L2-Expression auf neutrophilen Granulozyten während klinischer Sepsis

Die C5L2-Expression auf neutrophilen Granulozyten wurde bei insgesamt 14 gesunden Freiwilligen sowie 23 Patienten mit schwerer Sepsis oder im septischen Schock mittels Durchflusszytometrie untersucht. Beim Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Patienten konnte eine signifikant verminderte Vertikalverschiebung der Zellen der septischen Patienten festgestellt werden. Dieser Verlust von C5L2 während Sepsis ist exemplarisch in Abb. 21A für zwei Patienten im septischen Schock dargestellt. Hierbei wies die C5L2-Expression nicht nur im Vergleich zum gesunden Freiwilligen, sondern auch innerhalb der beiden Patienten mit Sepsis Unterschiede auf. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Western Blot Analyse (Abb. 20) zeigte die Originalregistrierung die Tendenz einer ausgeprägteren Rezeptorexpression bei demjenigen septischen Patienten, der überlebt hat, verglichen mit dem nicht-überlebenden Patienten, auf dessen neutrophilen Granulozyten ein nahezu kompletter Verlust von C5L2 beobachtet werden konnte (Abb. 21A).

Abb. 21B fasst die signifikant reduzierte Oberflächenexpression des C5L2-Proteins ( $p < 0,01$ ) bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock im Vergleich zur

Gruppe der gesunden Freiwilligen zusammen. Insbesondere fand sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich von denjenigen Patienten, die ein Multiorganversagen (MOV) entwickelten zu Patienten ohne MOV (Abb. 21B): während die neutrophilen Granulozyten von Patienten mit MOV einen nahezu vollständigen Verlust der C5L2-Expression zeigten, war die Oberflächenexpression von C5L2 bei Patienten ohne MOV höher, aber dennoch vermindert im Bezug auf den Status gesunder Freiwilliger (Abb. 21B).



**Abb. 21:** Durchflusszytometrie von neutrophilen Granulozyten von Patienten mit Sepsis im Vergleich zu gesunden Freiwilligen. **A:** Exemplarische Darstellung der C5L2-Oberflächenexpression eines gesunden Freiwilligen (links), eines überlebenden Patienten mit Sepsis (Mitte) und eines nicht-überlebenden Patienten mit Sepsis (rechts) **B:** Zusammenfassung der C5L2-Expression (Mittelwerte  $\pm$  SEM) von Zellen gesunder Freiwilliger (n=14) und von Patienten im septischem Schock (n=26). Innerhalb der Patienten wurde weiter zwischen der einer Gruppe mit (MOV; n=11) und einer Gruppe ohne Entwicklung eines Multiorganversagens (kein MOV, n=15) unterschieden.



## 4. Diskussion

Nach wie vor ist das Krankheitsbild der Sepsis mit einer hohen Letalität behaftet (40-60% für Patienten im septischen Schock) [1]. Obwohl neue Therapieansätze in die Behandlung der Sepsis Einzug hielten, konnte die Letalitätsrate in den letzten 20 Jahren nicht wesentlich gesenkt werden [55, 61, 65]. In zahlreichen klinischen Studien mit insgesamt mehr als 20.000 Patienten wurde mit unterschiedlichen Therapieansätzen versucht, den „Circulus vitiosus“ zwischen zellulärem Trauma und der nachfolgenden Entzündungsantwort zu durchbrechen [1, 66]. Mit Ausnahme der Gabe von aktiviertem Protein C bei schwerer Sepsis [3] konnte durch keine dieser Bemühungen eine statistisch signifikante Verbesserung der Überlebensrate bei Sepsis erzielt werden [1]. Offenbar findet sich bei Patienten mit Sepsis eine sehr viel kompliziertere und vielschichtiger Pathophysiologie, als dies in den nicht selten mangelhaft entworfenen Sepsis-Modellen nachgeahmt wurde [78].

Im CLP-Modell, das die immunologischen und molekularen Verhältnisse bei Patienten mit Sepsis wirklichkeitsnahe abbildet [16, 62, 83], wurde eine eingeschränkte C5a-Bindungskapazität von neutrophilen Granulozyten mit entsprechend verminderter Expression des C5aR gefunden [29, 39]. Erst kürzlich veröffentlichte klinische Studien zeigten auch bei Patienten mit Sepsis eine verminderte Expression von C5aR auf neutrophilen Granulozyten [22, 70]. Die unkontrollierte, überschüssige Bildung von C5a („too much of a good thing“ [24]) während Sepsis und der spezifische Verlust des C5a-Bindungsvermögens gehen mit einer Beeinträchtigung der Funktion der neutrophilen Granulozyten einher [73]. Bisher war für das Anaphylatoxin C5a nur ein spezifischer Rezeptor beschrieben (C5aR). Die bekannten vielseitigen biologischen Effekte von C5a sowie dessen Degradationsprodukt C5a<sub>desArg74</sub> ließen jedoch die Existenz weiterer Rezeptoren vermuten. So wurde unlängst der Complementrezeptor „C5a-like“ Rezeptor 2 (C5L2) gefunden, der in die Familie der 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren eingeordnet wird [57]. In der bisher bekannten Literatur finden sich über C5L2 widersprüchliche Aussagen bezüglich seiner Funktion und der Zellarten, die diesen Rezeptor exprimieren [47, 58, 59]. Weitgehende Einigkeit herrscht bezüglich des Vermögens von C5L2, sowohl C5a als auch C5a<sub>desArg74</sub> mit gleich hoher Affinität zu binden. Im Gegensatz dazu zeigt C5aR eine ca. 100-fach höhere Affinität für C5a als für C5a<sub>desArg74</sub> [9, 58]. Ob C5L2 ein Rezeptor für weitere Complementfaktoren (z. B. C3a,

C3a<sub>desArg</sub> und C4a) ist, wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert [9, 58]. Mit einer aktuellen Publikation scheint aber nun geklärt, dass C5L2 ausschließlich C5a und C5a<sub>desArg74</sub> bindet und nicht C3a und C3a<sub>desArg</sub> [46].

Bereits in den frühen 90er Jahren wurden Rezeptoren beschrieben, die Liganden mit hoher Spezifität und Affinität binden, aber strukturell oder funktionell nicht in der Lage sind, intrazelluläre Signalwege zu aktivieren [12, 54]. Verschiedenen „Decoy“-Rezeptoren für Zytokine und Chemokine (z. B. IL-10- und TNF-Rezeptorfamilie) wird eine wichtige Rolle bei Entzündungsvorgängen zugeschrieben [15, 20, 60, 69, 84]. Die biologische Funktion des neu identifizierten Complementrezeptors C5L2 insbesondere während Sepsis ist noch nicht geklärt. Aufgrund bisheriger Erkenntnisse liegt nahe, dass C5L2 als „Decoy“-Rezeptor für aktivierte Complementfaktoren und deren Spaltprodukte fungiert [9, 46, 58]. Eine erst kürzlich veröffentlichte experimentelle Arbeit sieht darüber hinaus die Rolle für C5L2 in der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes der biologischen Antwort auf C5a [23].

In der vorliegenden Studie zeigten Lysate von neutrophilen Granulozyten sowohl der Ratte als auch des Menschen in der Western Blot Analyse mit anti-C5L2 eine Bande bei etwa 45 kDa, was im Einklang zu dem berichteten Molekulargewicht des glykosylierten C5L2-Proteins steht [58]. Wurde der Antikörper gegen C5L2 mit dem entsprechenden Amino-terminalen Peptid blockiert, war diese Bande (Abb. 9, 10) nicht mehr detektierbar. Dies legt die Spezifität der Bande für C5L2 nahe. Auch mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass C5L2 auf neutrophilen Granulozyten des Menschen reichlich exprimiert wird (Abb. 8). Im Widerspruch hierzu konnte in einer anderen Publikation C5L2 auf neutrophilen Granulozyten nicht erkannt werden [59]. Die Ursache der diskrepanten Ergebnisse könnte in den Unterschieden der Antikörperpräparation liegen. Während in den vorliegenden Versuchen ein hochaffinitäts-gereinigter anti-C5L2 Antikörper verwendet wurde, kam in jener Studie ausschließlich anti-C5L2 angereichertes, nicht gereinigtes Serum zum Einsatz [59]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen mit zwei unterschiedlichen Methoden (Western Blot Analyse und Durchflusszytometrie) deutlich, dass C5L2 auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird.

Die überschüssige Bildung von C5a während der Sepsis [33, 73] wurde *in vitro* simuliert, indem neutrophile Granulozyten mit C5a-Konzentrationen (10 nM) exponiert wurden, wie sie bei Patienten während systemischer Inflammation in fremden [27, 32, 73] und in eigenen Messungen (n=26; C5a-Konzentration = 11,3 ± 2,6 nM; Tab. 2) gefunden wurden.

Dabei konnte in der Western Blot Analyse jeweils ein zeitabhängiger, C5a-induzierter Verlust des zellulären C5L2-Gehaltes beobachtet werden (Abb. 15, 16A). Die alleinige Inkubation der neutrophilen Granulozyten in ihrem Inkubationsmedium führte hingegen zu keiner sichtbaren Abnahme der Bandenstärke, und auch während der Inkubation der Zellen mit fMLP (Abb. 16B) änderte sich die Intensität der C5L2-Bande zu allen untersuchten Zeitpunkten nicht wesentlich. Der Verlust von C5L2 scheint daher ein spezifischer Effekt von C5a zu sein. Um die Expression von C5L2 auf der Zelloberfläche zu erfassen, wurden neutrophile Granulozyten mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hier konnte nach Exposition mit C5a ebenfalls eine zeitabhängige Abnahme des Rezeptorproteins auf der Zelloberfläche gefunden werden (Abb.17).

Da sowohl der Oberflächen- als auch der zelluläre Gesamtgehalt von C5L2 bei längerer C5a-Exposition abnimmt und eine Internalisierung von C5L2 nach Ligandenbindung - wie kürzlich beschrieben - mit nur langsamer Kinetik erfolgt [9, 58], kommt als Ursache der Reduktion von C5L2 nach Ligandenbindung am ehesten entweder eine Protease-abhängige Degradation oder ein Abstoßen des Rezeptors („Shedding“) in Frage. So ist z.B. für den heptahelikalen CC-Chemokin-Rezeptor D2 bekannt, dass er nach Bindung seines Liganden degradiert, ohne jedoch zuvor die klassischen G-Protein gekoppelten Signalwege zu aktivieren [74]. In vorliegender Studie wurden daher neutrophile Granulozyten von Ratten in An- bzw. Abwesenheit eines Proteaseinhibitor-Cocktails (Kombination aus Serin-, Cystein- und Metallo-Proteaseinhibitoren) inkubiert. Ohne Proteasehemmer wurde konstant deutlich weniger C5L2 gefunden. Dagegen blieb in Anwesenheit der Proteaseinhibitoren das C5L2-Protein gut detektierbar (Daten nicht gezeigt) [43]. Damit liegt nahe, dass dem Verlust von C5L2 eine Protease-abhängige Degradation zugrunde liegt. In weiteren Versuchen konnte C5L2 nach C5a-Exposition nach unterschiedlich langen Zeitintervallen im Überstand der Zellen nicht gefunden werden (Abb. 18). Dies lässt darauf schließen, dass der Rezeptor bzw. der Ligand-Rezeptorkomplex von den Zellen nicht in größerem Maß als lösliche Form sezerniert wird. Möglicherweise wird nach Bindung von C5a an C5L2, insbesondere unter den Bedingungen der Sepsis, eine Oberflächenprotease aktiviert, die eine proteolytische Spaltung der extrazellulären aminoterminalen Region des „Decoy“-Rezeptors zur Folge hat.

Eine kürzlich erschienene Arbeit von Gao et al. (Hochregulierung von C5L2 während Sepsis [23]) steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu vorliegender Studie [43]. Im Unterschied wurden dort auch Organe auf C5L2-Expression untersucht. Es ist durchaus denkbar, dass es während der Sepsis zu einer Hochregulierung von C5L2 in verschiedenen

Organen kommt, während auf neutrophilen Granulozyten eine Herunterregulierung stattfindet. Dies wurde z.B. auch für den C5aR gezeigt ([64]: Hochregulation von C5aR in Organen; [22]: Herunterregulation von C5aR auf PMN). Daher liegt die Diskrepanz der Daten beider Veröffentlichungen insbesondere in der Untersuchung von neutrophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie. Jedoch wurde bei der Arbeit von Gao et al. [23] C5L2 auf neutrophilen Granulozyten von Ratten nach CLP induzierter Sepsis (n=4-6) analysiert, während hier [43] neutrophile Granulozyten von Patienten im septischen Schock (n=26) untersucht wurden. Die Vergleichbarkeit ist u. a. deshalb eingeschränkt, weil ein Monitoring der CLP-Tiere nicht durchgeführt wurde und der Zeitpunkt des septischen Schocks der CLP-Tiere somit nicht festgelegt werden kann. Eine weitere Rolle könnte der verwendete Antikörper spielen: in der Studie von Gao et al. [23] wurde anti-C5L2 Serum verwendet, wohingegen für die hier präsentierten Versuche [43] ein affinitätsgereinigter Antikörper für Durchflusszytometrie und auch Western Blot Analyse benutzt wurde. Welchen Einfluss der verwendete Antikörper haben kann, zeigt das weiter oben angeführte Beispiel [59]. Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen Western Blot Daten [43] (verminderte Darstellung des zellulären Gesamtgehaltes des C5L2-Proteins während Sepsis) und PCR-Daten [23] (verstärkte Expression der C5L2-mRNA während Sepsis) könnte folgendermaßen sein: im Gegensatz zu C5aR wird C5L2 nicht bzw. nur sehr langsam internalisiert [9] und nach bisherigen Erkenntnissen findet auch kein „Shedding“ des Rezeptors statt (Abb. 18). Bei der oben erwähnten mutmaßlichen Degradation von C5L2 könnte das Epitop des hier verwendeten Antikörper in der extrazellulären (aminoterminalen) Domäne durch proteolytische Spaltung zerstört werden, so dass das Protein in Western Blot und Durchflusszytometrie vermindert zur Darstellung kommt. Dies könnte erklären, dass das intakte C5L2-Protein während der Sepsis vermindert ist [43], obwohl die Transkriptionsrate erhöht zu sein scheint [23]. Dies ist jedoch vorerst spekulativ und muss in zukünftigen Experimenten mit neuen, selektiven Antikörpern, die gegen unterschiedliche Regionen von C5L2 gerichtet sind und unter Verwendung von spezifischen Proteaseinhibitoren geklärt werden.

Nach Bindung von C5a an den „klassischen“ C5aR findet eine ausgeprägte Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten des intrazellulär gelegenen Carboxylendes innerhalb von Minuten statt [58]. Dadurch wird eine rasche Internalisierung von ca. 60% der Oberflächenrezeptoren (und C5a [34]) eingeleitet, die schließlich über ein intrazelluläres „Recycling“ nach ungefähr 80-90 min teilweise wieder in die Zellmembran

integriert werden [5, 8, 56]. Für C5L2 ist eine solche schnelle Internalisierung hingegen nicht beschrieben [9, 58]. Vermutlich ist dies auf eine andere Serin-/Threoninanordnung im Carboxylende des C5L2-Proteins zurückzuführen. C5L2 wird somit nach C5a-Exposition lediglich an vereinzelt Positionen phosphoryliert [9, 58]. Bisher wurde noch nicht untersucht, wie sich C5L2 bei länger anhaltender *in vivo* Exposition mit überschüssigem C5a bzw. C5a<sub>desArg74</sub> verhält.

In weiteren Experimenten wurde der C5L2-Gehalt während der Sepsis auf neutrophilen Granulozyten von Ratten im CLP-Modell untersucht. Die Sepsis entwickelt sich hier ausgehend von einem lokalen Trauma mit begleitender Infektion über eine Peritonitis und nachgewiesener Bakteriämie zum Vollbild der polymikrobiellen Sepsis mit weiteren Komplikationen (MOV) [39]. Während CLP-induzierter Sepsis zeigten die Tiere einen zeitabhängigen (im Verlauf zunehmenden) Verlust von C5L2, insbesondere in der Spätphase der Sepsis (Abb. 11, 12), die bekanntermaßen mit schwerwiegenden Organkomplikationen vergesellschaftet ist. Durch Behandlung mit einem anti-C5a Antikörper [41] oder einem C5aR-Antagonisten [32, 40] konnte in vorausgegangenen Studien das MOV abgeschwächt werden, wobei über einen wirksamen Rezeptorantagonisten berichtet wurde, dass er zwar C5aR, nicht aber C5L2 *in vivo* blockiert [59]. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Blockade von entweder C5a oder C5aR eine Schutzwirkung während Sepsis bezüglich der Funktion der neutrophilen Granulozyten sowie der Organfunktionen und eine Verbesserung der Überlebensrate erzielt werden kann [14, 40, 39]. Eine C5a-Blockade während experimenteller Sepsis konnte einerseits die reduzierte Bindungskapazität für C5a [39] und andererseits den verminderten Gehalt von C5aR auf neutrophilen Granulozyten [29] wiederherstellen. Folglich wurde in der vorliegenden Studie die Wirkung einer C5a-Blockade auf den Gehalt von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten im CLP-Modell untersucht. Der dabei verwendete anti-C5a Antikörper erkannte als antigene Determinante die mittlere Region des C5a-Moleküls und erwies sich in früheren Studien als hoch protektiv [41].

Auch in der vorliegenden Studie war die Überlebensrate der mit dem anti-C5a Antikörper behandelten CLP-Tiere im Vergleich zu Tieren, denen ein unspezifischer Antikörper (präimmunes IgG) verabreicht wurde, deutlich verbessert (70% Überlebensrate gegenüber 13% nach 36 h; Abb. 13). Neutrophile Granulozyten der CLP-Tiere, denen präimmunes IgG injiziert wurde, zeigten einen zeitabhängigen Verlust von C5L2 (Abb. 12). Septische Tiere, die mit dem anti-C5a Antikörper behandelt wurden, hatten nicht nur wesentlich

schwächer ausgeprägte klinische Symptome, sondern auch einen gleichsam unveränderten Gehalt von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten, vergleichbar mit dem von scheinoperierten Tieren (Abb. 12). Die Ergebnisse der in vivo- sowie auch der in vitro-Versuche deuten darauf hin, dass während Sepsis höhere C5a-Konzentrationen über einen längeren Zeitraum zu einem Verlust von C5L2 führen. Eine „externe“ Neutralisierung von C5a durch einen spezifischen Antikörper hält offensichtlich die C5L2-Expression auf neutrophilen Granulozyten aufrecht und ist mit einer verbesserten Überlebensrate und Prognose vergesellschaftet.

Um die gefundenen Ergebnisse auf den Menschen zu übertragen, wurden schließlich vergleichende Untersuchungen bei Patienten mit schwerer Sepsis bzw. septischem Schock durchgeführt. Der Patientenauswahl der vorliegenden Studie lagen die gebräuchlichen Konsensuskriterien zur Definition der Sepsis zugrunde, wie sie von Roger C. Bone et al. 1992 formuliert wurden [6] (s. Anhang 7.1.). Diese Kriterien werden jedoch von Kritikern als zu unspezifisch für die Diagnostik eines SIRS/Sepsis angesehen [77]. Im Jahr 2001 wurden die Sepsisdefinitionen von der „International Sepsis Definitions Conference“ mit der Zielsetzung überarbeitet, die gegenwärtige Vorstellung der Pathophysiologie der Sepsis einzubeziehen und ein nützliches Instrumentarium sowohl für Kliniker im täglichen Umgang mit Sepsis als auch für Wissenschaftler bei der Durchführung von Studien zu schaffen [52]. Diese Klassifikation der Sepsis wurde in Anlehnung an das TNM-System [17], das sich für die Klassifikation maligner Tumore etabliert hat, zur Stadieneinteilung und Prognosebeurteilung der Sepsis entwickelt. In dieses sog. PIRO-System werden folgende Faktoren einbezogen: *Prädisposition*; Ort, Art und Ausdehnung der *Infektion* (oder des *Insultes*); Antwort des Wirtes („Host *response*“); und das Vorliegen von *Organdysfunktionen* [52]. Obwohl spezifischer, scheinen diese modifizierten Kriterien in der Praxis schwerer handhabbar zu sein als die SIRS-/Sepsis-Kriterien von 1992. Das PIRO-System gilt daher derzeit noch allgemein als unausgereift und wird sich voraussichtlich erst durch Ergänzung von neuen Kriterien (z.B. Biomarker) zu einem „Staging“-System für Sepsis entwickeln [52].

Die vorliegende Studie zeigt - begleitet von einer Erhöhung der C5a-Serumkonzentration (Tab. 2) - eine signifikante Verminderung der C5L2-Expression auf neutrophilen Granulozyten von Patienten mit septischem Schock im Vergleich zu gesunden Freiwilligen (Abb. 20, 21). Parallel dazu offenbarten die Zellen der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe deutliche Defizite in ihrer Funktion, dargestellt durch die verminderte

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion nach PMA-Stimulation (Abb. 19). Einen vergleichbaren Verlust der „Oxidative burst“-Antwort zeigten auch die Ergebnisse der *in vitro* Versuche nach C5a-Exposition (Abb. 14).

Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass Patienten mit Sepsis, die länger als 30 Tage überlebt hatten, tendenziell eine höhere Expression von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten aufwiesen als diejenigen Patienten, die den Folgen der Sepsis erlagen (Abb. 20, 21A). Zusätzlich fand sich bei Patienten, die ein MOV entwickelten, eine signifikant niedrigere Expression von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu denjenigen Patienten, die vom MOV verschont blieben (Abb. 21B). Trotz den Altersunterschieden zwischen beiden Gruppen (Tab. 1B, überlebende Patienten  $57,4 \pm 3,9$  Jahre, nicht überlebende Patienten  $70,6 \pm 2,6$  Jahre) fand sich keine signifikante Korrelation des Patientenalters mit dem SOFA-Score bzw. der Entwicklung eines MOV (Daten nicht gezeigt). Die Expression von C5L2 scheint jedoch negativ mit dem Auftreten eines Sepsis-induzierten Multiorganversagens zusammenzuhängen. Diese Ergebnisse weisen möglicherweise darauf hin, dass Patienten mit Sepsis mit unveränderter oder nur leicht reduzierter C5L2-Expression in der Lage sind, das im Verlauf der Entzündungsantwort überschüssig gebildete C5a „abzufangen“. Insofern verfügten diese Patienten in einem Stadium, in dem C5a übermäßig produziert wird, die C5aR aber bereits gesättigt sind [27, 33] und zudem die zelluläre Bindungskapazität aufgrund der verminderten C5aR-Expression auf neutrophilen Granulozyten reduziert ist [22, 67, 70], über einen zusätzlichen internen „Clearance“-Mechanismus. Bei Patienten, bei denen jedoch die Expression des mutmasslichen „Decoy“-Rezeptors C5L2 während Sepsis stark vermindert ist, kann massiv erhöhtes C5a die für den Organismus schädliche Wirkung möglicherweise ungehemmt entfalten und das Auftreten der fatalen Folgen (z.B. MOV) mit verursachen [39]. Dass sich der Verlust von C5L2 (insbesondere in der Durchflusszytometrie) bei Sepsis deutlicher darstellt als in den *in vitro* Versuchen (mit alleiniger C5a-Inkubation) könnte ein Hinweis darauf sein, dass unter den komplexen Umgebungsbedingungen während Sepsis noch weitere Mediatoren bei der Regulation von C5L2 eine Rolle spielen. So beeinflusst z. B. auch IL-6 die Expression des „klassischen“ C5aR während experimenteller Sepsis [67].

Der schützende Effekt einer Blockade von C5a im CLP-Modell bei Bewahrung der C5L2-Expression auf neutrophilen Granulozyten kann als Fingerzeig für die zentrale Rolle von C5aR und C5L2 in der Entwicklung und Progression der Sepsis gewertet werden und rückt sie zudem in den Focus neuer Behandlungsstrategien. Wie auch schon für den IL-1 $\beta$

„Decoy“-Rezeptor bei rheumatoider Arthritis postuliert wurde [2], könnte C5L2 ein mögliches Ziel für gentherapeutische Ansätze sein. Hochregulierung des „Decoy“-Rezeptors könnte einen neuen Ansatz in der Behandlung der Sepsis darstellen, indem durch Steigerung der internen „Clearance“ verhindert würde, dass exzessiv gebildetes C5a seine „dunkle Seite“ [80] an den Zielzellen entfalten kann. Die positive Wirkung einer Blockade der C5a-C5aR-Interaktion in verschiedenen Tierstudien [14, 40, 39] lässt es sinnvoll und vielversprechend erscheinen, eine klinische Studie mit Gabe eines anti-C5a Antikörpers oder eines Rezeptorantagonisten durchzuführen. Im CLP-Modell zeigte sich, dass das Überleben und die Prognose umso besser sind, je früher die C5a-Blockade erfolgt [41]. Eine vor nicht allzu langer Zeit veröffentlichte Studie unterstreicht die Bedeutung des frühen Erkennens und Eingreifens: Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock profitierten offensichtlich von einer frühen zielgerichteten (symptomatischen) Therapie [68]. Hierfür müssen die diagnostischen Kriterien durch möglichst spezifische Marker ergänzt und ein System zur Stadieneinteilung etabliert werden [52], um davon ausgehend je nach Risikoprofil und Stadium verschiedene Behandlungsstrategien verfolgen zu können [37, 52]. Die Expression von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten während systemischer Entzündung könnte einen solchen diagnostischen Marker hinsichtlich Prognose und Schwere der Erkrankung darstellen.



## 5. Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der Sepsis mit seiner hohen Letalitätsrate stellt trotz neuer Therapiestrategien ein Hauptproblem der modernen Chirurgie und Intensivmedizin dar. Die unkontrollierte Aktivierung des Complementsystems während der Sepsis führt zur übermäßigen Bildung des Anaphylatoxins C5a und in Folge zur Funktionsbeeinträchtigung der neutrophilen Granulozyten als Vertreter der frühen zellulären Abwehr. Erst kürzlich wurde ein neuer Complementrezeptor („C5a-like“-Rezeptor 2, C5L2) beschrieben, nach dessen Interaktion mit C5a offensichtlich keine Signalübertragung erfolgt und dessen Funktion weitgehend unbekannt ist.

Daher wurden mögliche Veränderungen von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten als Hinweis für die Rolle von C5L2 während der systemischen Entzündungsantwort (in vitro, während experimenteller sowie klinischer Sepsis) näher untersucht.

Die unkontrollierte Freisetzung von C5a während Sepsis wurde in vitro simuliert, indem neutrophile Granulozyten mit C5a für unterschiedliche Zeitspannen inkubiert wurden. Die experimentelle Sepsis wurde durch Caecum-Ligatur und anschließende -Punktion (CLP) in An- oder Abwesenheit einer C5a-Blockade induziert. Zudem wurden neutrophile Granulozyten von Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock mittels Western Blot Analyse und Durchflusszytometrie bezüglich der C5L2-Expression analysiert.

Die in vitro Exposition neutrophiler Granulozyten mit C5a hatte eine zeitabhängige Verminderung der C5L2-Expression zur Folge. Neutrophile Granulozyten von Ratten mit CLP-induzierter Sepsis zeigten im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren im Zeitverlauf einen deutlichen Verlust von C5L2. Durch C5a-Blockade konnte nicht nur die C5L2-Expression aufrechterhalten, sondern auch eine verbesserte Überlebensrate der septischen Versuchstiere beobachtet werden. In Übereinstimmung dazu präsentierten neutrophile Granulozyten von Patienten im septischem Schock (n=26) im Vergleich zu gesunden Freiwilligen (n=14) eine signifikant verminderte Expression von C5L2. Das Ausmaß des Verlustes von C5L2 stand dabei in Zusammenhang mit dem Auftreten eines Multiorganversagens (MOV). Bei Patienten mit MOV fand sich ein nahezu vollständiger Verlust von C5L2 auf neutrophilen Granulozyten. Die Ergebnisse liefern Hinweise, dass C5L2 während der Sepsis einer C5a-abhängigen Regulation unterliegt und als sog. „Decoy“-Rezeptor für C5a agiert. C5L2 könnte somit nicht nur Ziel zukünftiger immunmodulatorischer Behandlungsstrategien sein, sondern möglicherweise auch als diagnostischer Marker der Sepsis und deren Prognose dienen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Astiz M E, Rackow E C: Septic shock. *Lancet* 351: 1501-5 (1998)
2. Attur M G, Dave M N, Clancy R M, Patel I R, Abramson S B, Amin A R: Functional genomic analysis in arthritis-affected cartilage: yin-yang regulation of inflammatory mediators by alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3 integrins. *J Immunol* 164: 2684-91 (2000)
3. Bernard G R, Vincent J L, Laterre P F, LaRosa S P, Dhainaut J F, Lopez-Rodriguez A, Steingrub J S, Garber G E, Helterbrand J D, Ely E W, Fisher C J, Jr.: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344: 699-709 (2001)
4. Bhole D, Stahl G L: Therapeutic potential of targeting the complement cascade in critical care medicine. *Crit Care Med* 31: S97-104 (2003)
5. Bock D, Martin U, Gartner S, Rheinheimer C, Raffetseder U, Arseniev L, Barker M D, Monk P N, Bautsch W, Kohl J, Klos A: The C terminus of the human C5a receptor (CD88) is required for normal ligand-dependent receptor internalization. *Eur J Immunol* 27: 1522-9 (1997)
6. Bone R C, Balk R A, Cerra F B, Dellinger R P, Fein A M, Knaus W A, Schein R M, Sibbald W J: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644-55 (1992)
7. Botha A J, Moore F A, Moore E E, Fontes B, Banerjee A, Peterson V M: Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges. *Shock* 3: 157-66 (1995)
8. Braun L, Christophe T, Boulay F: Phosphorylation of key serine residues is required for internalization of the complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor via a beta-arrestin, dynamin, and clathrin-dependent pathway. *J Biol Chem* 278: 4277-85 (2003)

9. Cain S A, Monk P N: The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *J Biol Chem* 277: 7165-9 (2002)
10. Christophe T, Rabiet M J, Tardif M, Milcent M D, Boulay F: Human complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor (CD88) phosphorylation sites and their specific role in receptor phosphorylation and attenuation of G protein-mediated responses. Desensitization of C5a receptor controls superoxide production but not receptor sequestration in HL-60 cells. *J Biol Chem* 275: 1656-64 (2000)
11. Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885-91 (2002)
12. Colotta F, Dower S K, Sims J E, Mantovani A: The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* 15: 562-6 (1994)
13. Crass T, Raffetseder U, Martin U, Grove M, Klos A, Kohl J, Bautsch W: Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U-937 cells. *Eur J Immunol* 26: 1944-50 (1996)
14. Czermak B J, Sarma V, Pierson C L, Warner R L, Huber-Lang M, Bless N M, Schmal H, Friedl H P, Ward P A: Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat Med* 5: 788-92 (1999)
15. D'Amico G, Frascaroli G, Bianchi G, Transidico P, Doni A, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P, Mantovani A: Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nat Immunol* 1: 387-91 (2000)
16. Deitch E A: Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 9: 1-11 (1998)
17. Denoix P X: Enquete dans les centres nti cancreaux *Bull Inst Natl Hyg* 1: 70-75 (1946)

18. Drouin S M, Kildsgaard J, Haviland J, Zabner J, Jia H P, McCray P B, Jr., Tack B F, Wetsel R A: Expression of the complement anaphylatoxin C3a and C5a receptors on bronchial epithelial and smooth muscle cells in models of sepsis and asthma. *J Immunol* 166: 2025-32 (2001)
19. Faist E, Wichmann M W: Immunologie bei Schwerverletzten. *Chirurg* 68: 1066-70 (1997)
20. Fra A M, Locati M, Otero K, Sironi M, Signorelli P, Massardi M L, Gobbi M, Vecchi A, Sozzani S, Mantovani A: Cutting edge: scavenging of inflammatory CC chemokines by the promiscuous putatively silent chemokine receptor D6. *J Immunol* 170: 2279-82 (2003)
21. Frank M M, Fries L F: The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* 12: 322-6 (1991)
22. Furebring M, Hakansson L D, Venge P, Nilsson B, Sjolín J: Expression of the C5a receptor (CD88) on granulocytes and monocytes in patients with severe sepsis. *Crit Care* 6: 363-70 (2002)
23. Gao H, Neff T A, Guo R F, Speyer C L, Sarma J V, Tomlins S, Man Y, Riedemann N C, Hoesel L M, Younkin E, Zetoune F S, Ward P A: Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. *Faseb J* 19: 1003-5 (2005)
24. Gerard C: Complement C5a in the sepsis syndrome--too much of a good thing? *N Engl J Med* 348: 167-9 (2003)
25. Gerard C, Gerard N P: C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu Rev Immunol* 12: 775-808 (1994)
26. Gerard N P, Gerard C: The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* 349: 614-7 (1991)

27. Goya T, Morisaki T, Torisu M: Immunologic assessment of host defense impairment in patients with septic multiple organ failure: relationship between complement activation and changes in neutrophil function. *Surgery* 115: 145-55 (1994)
28. Greer J: Model structure for the inflammatory protein C5a. *Science* 228: 1055-60 (1985)
29. Guo R F, Riedemann N C, Bernacki K D, Sarma V J, Laudes I J, Reuben J S, Younkin E M, Neff T A, Paulauskis J D, Zetoune F S, Ward P A: Neutrophil C5a receptor and the outcome in a rat model of sepsis. *Faseb J* 17: 1889-91 (2003)
30. Guo R F, Riedemann N C, Ward P A: Role of C5a-C5aR interaction in sepsis. *Shock* 21: 1-7 (2004)
31. Haeney M R: The role of the complement cascade in sepsis. *J Antimicrob Chemother* 41 Suppl A: 41-6 (1998)
32. Harkin D W, Romaschin A, Taylor S M, Rubin B B, Lindsay T F: Complement C5a receptor antagonist attenuates multiple organ injury in a model of ruptured abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 39: 196-206 (2004)
33. Hecke F, Schmidt U, Kola A, Bautsch W, Klos A, Kohl J: Circulating complement proteins in multiple trauma patients--correlation with injury severity, development of sepsis, and outcome. *Crit Care Med* 25: 2015-24 (1997)
34. Hetland G, Pfeifer P H, Hugli T E: Processing of C5a by human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 63: 456-62 (1998)
35. Holers V M: The complement system as a therapeutic target in autoimmunity. *Clin Immunol* 107: 140-51 (2003)
36. Horner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth P P, Martin E, Bardenheuer H J, Weigand M A: Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Anaesthesist* 53: 10-28 (2004)

37. Hotchkiss R S, Karl I E: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348: 138-50 (2003)
38. Huber-Lang M, Sarma J V, Zetoune F S, Rittirsch D, Neff T A, McGuire S R, Lambris J D, Warner R L, Flierl M A, Hoesel L M, Gebhard F, Younger J G, Drouin S M, Wetsel R A, Ward P A: Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 12: 682-7 (2006)
39. Huber-Lang M, Sarma V J, Lu K T, McGuire S R, Padgaonkar V A, Guo R F, Younkin E M, Kunkel R G, Ding J, Erickson R, Curnutte J T, Ward P A: Role of C5a in multiorgan failure during sepsis. *J Immunol* 166: 1193-9 (2001)
40. Huber-Lang M S, Riedeman N C, Sarma J V, Younkin E M, McGuire S R, Laudes I J, Lu K T, Guo R F, Neff T A, Padgaonkar V A, Lambris J D, Spruce L, Mastellos D, Zetoune F S, Ward P A: Protection of innate immunity by C5aR antagonist in septic mice. *Faseb J* 16: 1567-74 (2002)
41. Huber-Lang M S, Sarma J V, McGuire S R, Lu K T, Guo R F, Padgaonkar V A, Younkin E M, Laudes I J, Riedemann N C, Younger J G, Ward P A: Protective effects of anti-C5a peptide antibodies in experimental sepsis. *Faseb J* 15: 568-70 (2001)
42. Huber-Lang M S, Sarma J V, McGuire S R, Lu K T, Padgaonkar V A, Younkin E M, Guo R F, Weber C H, Zuiderweg E R, Zetoune F S, Ward P A: Structure-function relationships of human C5a and C5aR. *J Immunol* 170: 6115-24 (2003)
43. Huber-Lang M S, Sarma J V, Rittirsch D, Schreiber H, Weiss M, Flierl M, Younkin E, Schneider M, Suger-Wiedeck H, Gebhard F, McClintock S D, Neff T, Zetoune F, Bruckner U, Guo R F, Monk P N, Ward P A: Changes in the novel orphan, C5a receptor (C5L2), during experimental sepsis and sepsis in humans. *J Immunol* 174: 1104-10 (2005)
44. Huber-Lang M S, Younkin E M, Sarma J V, McGuire S R, Lu K T, Guo R F, Padgaonkar V A, Curnutte J T, Erickson R, Ward P A: Complement-induced impairment of innate immunity during sepsis. *J Immunol* 169: 3223-31 (2002)

45. Janeway C A, Jr., Medzhitov R: Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 10: 349-50 (1998)
46. Johswich K, Martin M, Thalmann J, Rheinheimer C, Monk P N, Klos A: Ligand specificity of the anaphylatoxin C5L2 receptor and its regulation on myeloid and epithelial cell lines. *J Biol Chem* 281: 39088-95 (2006)
47. Kalant D, Cain S A, Maslowska M, Sniderman A D, Cianflone K, Monk P N: The chemoattractant receptor-like protein C5L2 binds the C3a des-Arg77/acylation-stimulating protein. *J Biol Chem* 278: 11123-9 (2003)
48. Karlsson A, Nixon J B, McPhail L C: Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol* 67: 396-404 (2000)
49. Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5 (1970)
50. Lambris J D, Reid K B, Volanakis J E: The evolution, structure, biology and pathophysiology of complement. *Immunol Today* 20: 207-11 (1999)
51. Lee D K, George S R, Cheng R, Nguyen T, Liu Y, Brown M, Lynch K R, O'Dowd B F: Identification of four novel human G protein-coupled receptors expressed in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 86: 13-22 (2001)
52. Levy M M, Fink M P, Marshall J C, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal S M, Vincent J L, Ramsay G: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31: 1250-6 (2003)
53. Majetschak M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D, Schade F U: Mediatorenmodulation bei Sepsis und Multiorganversagen. *Unfallchirurg* 103: 903-7 (2000)

54. Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P: Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol* 22: 328-36 (2001)
55. Martin G S, Mannino D M, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348: 1546-54 (2003)
56. Naik N, Giannini E, Brouchon L, Boulay F: Internalization and recycling of the C5a anaphylatoxin receptor: evidence that the agonist-mediated internalization is modulated by phosphorylation of the C-terminal domain. *J Cell Sci* 110 ( Pt 19): 2381-90 (1997)
57. Ohno M, Hirata T, Enomoto M, Araki T, Ishimaru H, Takahashi T A: A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol Immunol* 37: 407-12 (2000)
58. Okinaga S, Slattery D, Humbles A, Zsengeller Z, Morteau O, Kinrade M B, Brodbeck R M, Krause J E, Choe H R, Gerard N P, Gerard C: C5L2, a nonsignaling C5A binding protein. *Biochemistry* 42: 9406-15 (2003)
59. Otto M, Hawlisch H, Monk P N, Muller M, Klos A, Karp C L, Kohl J: C5a mutants are potent antagonists of the C5a receptor (CD88) and of C5L2: position 69 is the locus that determines agonism or antagonism. *J Biol Chem* 279: 142-51 (2004)
60. Penton-Rol G, Orlando S, Polentarutti N, Bernasconi S, Muzio M, Introna M, Mantovani A: Bacterial lipopolysaccharide causes rapid shedding, followed by inhibition of mRNA expression, of the IL-1 type II receptor, with concomitant up-regulation of the type I receptor and induction of incompletely spliced transcripts. *J Immunol* 162: 2931-8 (1999)
61. Rangel-Frausto M S, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis C S, Wenzel R P: The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *Jama* 273: 117-23 (1995)



62. Remick D G, Newcomb D E, Bolgos G L, Call D R: Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 13: 110-6 (2000)
63. Ren G, Dewald O, Frangogiannis N G: Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2: 242-56 (2003)
64. Riedemann N C, Guo R F, Neff T A, Laudes I J, Keller K A, Sarma V J, Markiewski M M, Mastellos D, Strey C W, Pierson C L, Lambris J D, Zetoune F S, Ward P A: Increased C5a receptor expression in sepsis. *J Clin Invest* 110: 101-8 (2002)
65. Riedemann N C, Guo R F, Ward P A: The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 112: 460-7 (2003)
66. Riedemann N C, Guo R F, Ward P A: Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 9: 517-24 (2003)
67. Riedemann N C, Neff T A, Guo R F, Bernacki K D, Laudes I J, Sarma J V, Lambris J D, Ward P A: Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *J Immunol* 170: 503-7 (2003)
68. Rivers E P, Nguyen H B, Huang D T, Donnino M: Early goal-directed therapy. *Crit Care Med* 32: 314-5; author reply 315 (2004)
69. Sakurai A, Okahashi N, Nakagawa I, Kawabata S, Amano A, Ooshima T, Hamada S: *Streptococcus pyogenes* infection induces septic arthritis with increased production of the receptor activator of the NF-kappaB ligand. *Infect Immun* 71: 6019-26 (2003)
70. Seely A J, Naud J F, Campisi G, Giannias B, Liu S, DiCarlo A, Ferri L E, Pascual J L, Tchervenkov J, Christou N V: Alteration of chemoattractant receptor expression regulates human neutrophil chemotaxis in vivo. *Ann Surg* 235: 550-9 (2002)
71. Siciliano S J, Rollins T E, DeMartino J, Konteatis Z, Malkowitz L, Van Riper G, Bondy S, Rosen H, Springer M S: Two-site binding of C5a by its receptor: an alternative

- binding paradigm for G protein-coupled receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 1214-8 (1994)
72. Solomkin J S, Cotta L A, Satoh P S, Hurst J M, Nelson R D: Complement activation and clearance in acute illness and injury: evidence for C5a as a cell-directed mediator of the adult respiratory distress syndrome in man. Surgery 97: 668-78 (1985)
73. Solomkin J S, Jenkins M K, Nelson R D, Chenoweth D, Simmons R L: Neutrophil dysfunction in sepsis. II. Evidence for the role of complement activation products in cellular deactivation. Surgery 90: 319-27 (1981)
74. Thelen M: Dancing to the tune of chemokines. Nat Immunol 2: 129-34 (2001)
75. Thurman R G, Ley H G, Scholz R: Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. Eur J Biochem 25: 420-30 (1972)
76. Tracey K J: The inflammatory reflex. Nature 420: 853-9 (2002)
77. Vincent J L: Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. Crit Care Med 25: 372-4 (1997)
78. Vincent J L: Search for effective immunomodulating strategies against sepsis. Lancet 351: 922-3 (1998)
79. Vincent J L, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart C K, Suter P M, Thijs L G: The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med 22: 707-10 (1996)
80. Ward P A: The dark side of C5a in sepsis. Nat Rev Immunol 4: 133-42 (2004)
81. Weigand M A, Bardenheuer H J, Bottiger B W: Klinisches Management bei Patienten mit Sepsis. Anaesthesist 52: 3-22 (2003)

82. Wetsel R A, Kildsgaard J, Haviland D L: Complement anaphylatoxins (C3a, C4a, C5a) and their receptors (C3aR, C4aR, C5aR/CD88) as therapeutic targets in inflammation. In: Lambris J D, Holers V M (Hrsg) Contemporary immunology: therapeutic interventions in the complement system, Bd. 9, 1. Aufl, Humana Press Totowa NJ, S. 113-153 (2000)
83. Wichterman K A, Baue A E, Chaudry I H: Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29: 189-201 (1980)
84. Wortinger M A, Foley J W, Larocque P, Witcher D R, Lahn M, Jakubowski J A, Glasebrook A, Song H Y: Fas ligand-induced murine pulmonary inflammation is reduced by a stable decoy receptor 3 analogue. *Immunology* 110: 225-33 (2003)
85. Yao Y M, Redl H, Bahrami S, Schlag G: The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm Res* 47: 201-10 (1998)

## 7. Anhang

### 7.1 Konsensuskriterien zur Definition der Sepsis

**Tab. 3:** Definitionskriterien für SIRS und Sepsis nach Bone *et al.* [6].

<b>SIRS:</b> mindestens zwei der nachfolgend genannten Punkte müssen erfüllt sein	
Hyperthermie <i>oder</i> Hypothermie	maximale Körpertemperatur > 38°C <i>oder</i> minimale Körpertemperatur < 36°C
Tachykardie	maximale Herzfrequenz > 90 Schläge/min
Tachypnoe	maximale Atemfrequenz > 20/min <i>oder</i> minimaler $P_aCO_2$ < 32 mmHg <i>oder</i> künstliche Beatmung
Leukozytose <i>oder</i> Leukopenie	maximale Leukozytenzahl > 12 G/l <i>oder</i> minimale Leukozytenzahl < 4 G/l
<b>Sepsis:</b> SIRS + mikrobiologisch nachgewiesene Infektion <i>oder</i> klinisch gesicherter Infektionsherd	
<b>schwere Sepsis:</b> Sepsis + Zeichen eines Organversagens (mindestens ein Punkt muss erfüllt sein)	
Laktazidose	minimaler Blut-pH < 7,35 <i>und</i> maximale Laktatkonzentration > 2 mmol/l
Nierenversagen	Urinausscheidung < 500 ml/24 h <i>oder</i> maximale Kreatininkonzentration $\geq 171$ $\mu\text{mol/l}$ <i>oder</i> Hämodialyse bei Niereninsuffizienz
Lungenversagen	minimaler Quotient: $P_aO_2/FiO_2$ < 200 <i>oder</i> maximaler PEEP > 10 cmH <sub>2</sub> O
Leberversagen	maximale Bilirubinkonzentration $\geq 33$ $\mu\text{mol/l}$ <i>oder</i> maximale Konzentration der AST $\geq 25$ U/l
Thrombozytopenie	minimale Thrombozytenzahl < 50 G/l
<b>septischer Schock:</b> zusätzlich Zeichen des Schocks	
Hypotension	systolischer Blutdruck anhaltend < 90 mmHg trotz adäquater Volumensubstitution <i>oder</i> kontinuierliche Gabe vasoaktiver Medikamente, außer wenn sie in anderer Indikation verabreicht wurden: Dopamin $\geq 5$ $\mu\text{g/kg x min}$ , Adrenalin, Noradrenalin

$P_{aCO_2}$  = arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck;  $P_{aO_2}$  = arterieller Sauerstoffpartialdruck;  $F_{iO_2}$  = inspiratorische Sauerstoffkonzentration; PEEP = positiver endexpiratorischer Druck; AST = Aspartataminotransferase

## 7.2 SOFA-Score

Tab. 4: SOFA-Score, modifiziert nach Vincent *et al.* [79]

SOFA Score	1	2	3	4
Atmung: P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> /F <sub>i</sub> O <sub>2</sub> [mmHg]	< 400	< 300	< 200*	< 100*
Gerinnung: Thrombozyten [G/l]	< 150	< 100	< 50	< 20
Leber: Bilirubin [µmol/l]	20 - 32	33 - 101	102 - 204	> 204
Kreislauf:	Hypotension: MAP < 70 mmHg	Dopamin > 0 ≤ 5 µg/kg x min	Dopamin > 5 oder Adrenalin ≤ 0,1 oder Noradrenalin ≤ 0,1 µg/kg x min	Dopamin > 15 oder Adrenalin > 0,1 oder Noradrenalin > 0,1 µg/kg x min
Niere: Kreatininkonzentration oder Urinausscheidung	110 - 170 µmol/l	171 - 299 µmol/l	300 - 440 µmol/l oder < 500 ml/d	> 440 µmol/l oder < 200 ml/d

\* = mit Beatmungsunterstützung

P<sub>a</sub>O<sub>2</sub> = arterieller Sauerstoffpartialdruck; F<sub>i</sub>O<sub>2</sub> = inspiratorische Sauerstoffkonzentration; MAP = arterieller Mitteldruck

## 7.3 Votum der Ethikkommission



# UNIVERSITÄT ULM

## Ethikkommission

Universität Ulm • Ethikkommission • 89069 Ulm

**Vorsitzender: Prof. Dr. U.B. Brückner**  
**Sekretariat Frau I. Seitz**

Herrn  
 Dr. med. Markus Huber-Lang  
 Abteilung Chirurgie III  
 Steinhövelstr. 9

Hausadresse:  
 Helmholtzstraße 20 (Oberer Eselsberg)  
 D-89081 Ulm  
 Telefon: (0731) 50-22052  
 Telefax: (0731) 50-22036  
 Email: [ethik-kommission@rektoramt.uni-ulm.de](mailto:ethik-kommission@rektoramt.uni-ulm.de)  
<http://www.uni-ulm.de/ethikkommission>

89075 Ulm

Ihr Zeichen	Ihre Nachricht vom	Unser Zeichen UBB/se.	Durchwahl 22052	Datum 10.10.2003
-------------	--------------------	--------------------------	--------------------	---------------------

n/an die Mitglieder der Ethikkommission der Universität Ulm

**Antrag-Nr. 163/2003 – Complement-Rezeptor Status und Neutrophilendysfunktion während dem septischen Schock**

Sehr geehrter Herr Kollege Huber-Lang,

bei dem oben genannten Antrag handelt es sich ausschließlich um wissenschaftliche Untersuchungen an Blut zur Bestimmung von Zelloberflächenstrukturen auf weißen Blutkörperchen und der Funktion von bakterienabtötenden Eiweißkörpern im Blutserum.

Der für die Untersuchungen notwendige Übereignungsvertrag entspricht den Empfehlungen der Ethikkommission der Universität Ulm. Weiterhin geben sowohl die Probanden als auch die Patienten ihr schriftliches Einverständnis, nachdem sie über Zweck und Inhalt der Untersuchung schriftlich informiert wurden.

**Damit können wir die Begutachtung durch die Ethikkommission der Universität Ulm mit einem positiven Votum abschließen.** Es bestehen keine ethisch begründbaren Bedenken gegen die Durchführung der Untersuchungen.

Entsprechend der ausschließlich beratenden Funktion der Ethikkommission betrifft dieses Votum nur die ethische Beurteilung der Konzeption, der vorgesehenen Methoden, der Durchführung und Überwachung des betreffenden Projektes sowie der beabsichtigten Patienten- und Probandenaufklärung. **Die ärztliche und juristische Verantwortung verbleibt jedoch uneingeschränkt beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern.**

Für die Ethikkommission der Universität Ulm

Prof. Dr. med. U.B. Brückner  
 Vorsitzender

**Mitglieder der Kommission:**

Prof. Dr. U.B. Brückner (Vorsitzender), Prof. Dr. J. Fegert, Pfarrer H. Herberg, PD Dr. J. Högel, Prof. Dr. P. Kern, Dr. iur. H.-D. Lippert (Stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. H. Schrezenmeier, Frau Prof. Dr. H. Suger-Wiedeck

## 7.4 Patienteninformation



## Universitätsklinikum Ulm

Chirurgische Universitätsklinik  
Abteilung für Unfallchirurgie,  
Hand- u. Wiederherstellungschirurgie

Ärztlicher Direktor  
Prof. Dr. med. L. Kinzl  
Steinhövelstraße 9, 89075 Ulm  
Telefon: 0731/500-27261

**PATIENTENINFORMATION****Funktionszustand weißer Blutkörperchen während dem septischen Schock**

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir haben während Ihres Aufenthaltes auf der Anästhesiologischen Intensivstation Blut abgenommen, um den Funktionszustand Ihrer weißen Blutkörperchen erfassen zu können. Nach schweren Verletzungen oder großen Operationen besteht aufgrund einer Beeinträchtigung der Funktion der weißen Blutkörperchen die große Gefahr, dass sich in verletzten bzw. operierten Organen Bakterien explosionsartig vermehren können. Reagiert unser Körper auf diese Bakterien überschießend, so kommt es zu einer generalisierten Entzündungsreaktion, einer Sepsis. Eine Sepsis ist oft mit dem Versagen von mehreren Organen (wie z.B. Lunge, Niere, Leber, Herz- Kreislaufsystem) verbunden. Die Sepsis und ihre Komplikationen führen trotz moderner Intensivtherapie häufig zum Tode.

Daher haben wir eine kleine Menge (insgesamt 15ml) Ihres Blutes untersucht, um herauszufinden, ob sich die weißen Blutkörperchen von Patienten, die eine schwere Sepsis entwickeln, von weißen Blutkörperchen gesunder Probanden unterscheiden. Wir bitten Sie hiermit darum, auch die aus Ihrem Blut gewonnenen Daten in anonymisierter Form in eine Gesamtauswertung einfließen lassen zu können.

Sie können jederzeit und ohne Angabe von Gründen die Verwertung Ihrer bereits erfassten Resultate verweigern. Dieser eventuelle Widerruf hat keine Auswirkungen auf Ihre weitere Behandlung.

**Versicherung:**

Ihnen ist bekannt, daß Sie während der Teilnahme an dem Forschungsprojekt Versicherungsschutz genießen. Es gelten die allgemeinen Haftungsbedingungen. Einen Schaden, der Ihrer Meinung nach auf die klinische Prüfung zurückzuführen ist, melden Sie bitte unverzüglich dem Prüfarzt.

**Erreichbarkeit des Prüfarztes:**

Sollten während des Verlaufes des Forschungsprojektes Fragen auftauchen, so können Sie jederzeit einen Ansprechpartner unter folgender Telefonnummer erreichen:

Herrn Dr. med. M. Huber-Lang, 0731-500-27350 (privat. 0162-7311928)

Herrn PD Dr. med. F. Gebhard, 0731-500-27352 (privat 0172-7325008)

Frau Prof. Dr. med. H. Suger-Wiedeck, 0731-500-27910 (privat 07302-6242)

**Vertraulichkeit/Datenschutz:**

Alle Personen, welche Sie im Rahmen dieses Forschungsprojektes betreuen, unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht und sind auf das Datengeheimnis verpflichtet. Die Untersuchungsergebnisse werden in speziellen Laborbüchern ohne Ihre Namensnennung festgehalten. Die Daten sollen in anonymisierter Form in wissenschaftlichen Veröffentlichungen verwendet werden.

**Für Ihre Bereitschaft und Mithilfe danken wir Ihnen sehr.**

Ulm, den

Name des/der aufklärenden Arztes/Ärztin

Universitätsklinikum Ulm  
Anstalt des Öffentlichen Rechts  
Stz Ulm

Vorsitzender des Aufsichtsrates:  
Hans-Jürgen Müller-Arens

Vorstand: Prof. Dr. Richard Hautmann (Vors.),  
Prof. Dr. Guido Adler (Stellv.), Albert Schira,  
Prof. Dr. Peter Gierschik, Anna Maria Eisenschink

Baden-Württembergische Bank Ulm  
Kto.-Nr. 110 130 0000, BLZ 630 201 30  
Sparkasse Ulm  
Kto.-Nr. 106 478, BLZ 630 500 00

## 7.5 Einwilligungserklärung



## Universitätsklinikum Ulm

Chirurgische Universitätsklinik  
Abteilung für Unfallchirurgie,  
Hand- u. Wiederherstellungschirurgie

Ärztlicher Direktor  
Prof. Dr. med. L. Kinzl  
Steinhövelstraße 9, 89075 Ulm  
Telefon: 0731/500-27261

## EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG

**Funktionszustand weißer Blutkörperchen während dem septischen Schock**

**Kann durch die Bestimmung von Complementrezeptoren auf der Oberfläche von weißen Blutkörperchen mittels Durchflußzytometrie eine beeinträchtigte Infektabwehr bei intensivpflichtigen, postoperativen/posttraumatischen Patienten erfasst werden?**

Inhalt, Vorgehensweise, Risiken und Ziel des obengenannten Forschungsprojektes hat mir Dr. .... ausreichend erklärt. Ich hatte Gelegenheit Fragen zu stellen und habe hierauf Antwort erhalten. Ich hatte ausreichend Zeit, mich für oder gegen die Teilnahme am Projekt zu entscheiden.

Eine Kopie der Probandeninformation habe ich erhalten.

Ich willige in die Teilnahme am Forschungsprojekt ein.

.....  
(Name des Probanden)

.....  
Ort, Datum

.....  
(Unterschrift des Probanden)

Mit der edv-mäßigen Bearbeitung der bei mir im Rahmen des obengenannten Forschungsprojektes erhobenen Daten bin ich einverstanden.

.....  
Ort, Datum

.....  
(Unterschrift des Probanden)

Universitätsklinikum Ulm  
Anstalt des Öffentlichen Rechts  
Sitz Ulm

Vorsitzender des Aufsichtsrates:  
Hans-Jürgen Müller-Arens

Vorstand: Prof. Dr. Richard Hautmann (Vors.),  
Prof. Dr. Guido Adler (Stellv.), Albert Schira,  
Prof. Dr. Peter Gierschik, Anna Maria Eisenschink

Baden-Württembergische Bank Ulm  
Kto.-Nr. 110 130 0000, BLZ 630 201 30  
Sparkasse Ulm  
Kto.-Nr. 106 478, BLZ 630 500 00



## 7.6 Übereignungsvertrag



## Universitätsklinikum Ulm

Chirurgische Universitätsklinik  
Abteilung für Unfallchirurgie,  
Hand- u. Wiederherstellungschirurgie

Ärztlicher Direktor  
Prof. Dr. med. L. Kinzl  
Steinhövelstraße 9, 89075 Ulm  
Telefon: 0731/500-27261

**ÜBEREIGNUNGSVERTRAG**

Zwischen der **Universität Ulm**, handelnd für die Abteilung für Unfallchirurgie, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, vertreten durch Herrn Dr. med. M. Huber-Lang, Abteilung für Unfallchirurgie, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Und Frau/Herr

wird Folgendes vereinbart:

1. Frau/Herr  
überträgt der Universität Ulm das Eigentum an folgendem Körpermaterial unentgeltlich:  
**Blut**
2. Die Universität wird das Körpermaterial zu wissenschaftlichen Zwecken, insbesondere zur Bestimmung von Zelloberflächenstrukturen auf weißen Blutkörperchen und zur Bestimmung der Produktion von bakterienabtötenden Substanzen (Sauerstoffsuperradikale) verwenden.

Eine kommerzielle Verwendung ist ausgeschlossen. Die Anonymität des Spenders bleibt gewahrt.

Ulm, den

Unterschrift des Patienten/Probanden

Unterschrift des Arztes

Universitätsklinikum Ulm  
Anstalt des Öffentlichen Rechts  
Sitz Ulm

Vorsitzender des Aufsichtsrates:  
Hans-Jürgen Müller-Arens

Vorstand: Prof. Dr. Richard Hautmann (Vors.),  
Prof. Dr. Guido Adler (Stellv.), Albert Schira,  
Prof. Dr. Peter Gierschik, Anna Maria Eisenschink

Baden-Württembergische Bank Ulm  
Kto.-Nr. 110 130 0000, BLZ 630 201 30  
Sparkasse Ulm  
Kto.-Nr. 106 478, BLZ 630 500 00

## 8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Huber-Lang für die Bereitstellung des Themas, die Übernahme der Doktorvaterschaft sowie für die hervorragende und intensive Betreuung des Projektes danken. Des Weiteren danke ich ihm für die Förderung meiner klinischen und wissenschaftlichen Ausbildung.

Bei Prof. Dr. Kinzl und Prof. Dr. Gebhard möchte ich mich für die Bereitstellung der Ressourcen zur Durchführung der Arbeit bedanken.

Ebenso danke ich Dr. Monk, University of Sheffield, Großbritannien, für die freundliche Gabe des Antikörpers sowie bei Prof. Dr. Ward, University of Michigan, USA, für die Kooperation, die Bereitstellung der Materialien und für die Möglichkeit, die tierexperimentellen Experimente in seiner Abteilung durchführen zu dürfen.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Traumalabors Sonja Albers und Barbara Acker wie auch meinen Mitdoktoranden Heike Schreiber und Michael Flierl für ihre Hilfe, die exzellente Zusammenarbeit und die schöne gemeinsame Zeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner gesamten Familie für ihre Unterstützung und schließlich allen, die mich auf meinem bisherigen Weg begleitet haben.